

ISSN 2227-2925 (print)
ISSN 2500-1558 (online)

12+

Том 11 N 1

2021



ИЗВЕСТИЯ ВУЗОВ

**Прикладная химия
и биотехнология**

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ

ИРКУТСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

ИЗВЕСТИЯ ВУЗОВ
Прикладная химия
и биотехнология

Том 11 N 1 2021



ИЗДАТЕЛЬСТВО
Иркутского национального исследовательского
технического университета



ИЗВЕСТИЯ ВУЗОВ
Прикладная химия и биотехнология
Том 11 N 1 2021

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор:

Евстафьев С.Н. д.х.н., профессор, заведующий кафедрой химии и пищевой технологии Иркутского национального исследовательского технического университета (г. Иркутск, Россия)

Заместитель главного редактора:

Пожидаев Ю.В. д.х.н., профессор кафедры химии и пищевой технологии Иркутского национального исследовательского технического университета (г. Иркутск, Россия)

Члены редакционной коллегии:

Боровский Г.Б. д.б.н., профессор, заместитель директора Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск, Россия)

Братская С.Ю. д.х.н., профессор, член-корреспондент РАН, заведующая лабораторией сорбционных процессов Института химии ДВО РАН (г. Владивосток, Россия)

Варфоломеев С.Д. д.х.н., профессор, член-корреспондент РАН, директор Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН (г. Москва, Россия)

Верпоорт Фрэнсис доктор наук, профессор кафедры экологических технологий, пищевых технологий и молекулярной биотехнологии, Гентский Университет Глобал Кампус (филиал в Корее), (г. Инчхон, Корея)

Воронов В.К. д.х.н., профессор, Заслуженный деятель науки РФ, профессор кафедры информатики Иркутского национального исследовательского технического университета (г. Иркутск, Россия)

Го Эн-зюнь профессор, заведующий лабораторией координационной химии Шеньянского института химической технологии (г. Шеньян, Китай)

Дадашев М.Н. д.т.н., профессор, главный научный сотрудник кафедры физической и коллоидной химии Российского государственного университета нефти и газа им. И.М. Губкина (г. Москва, Россия)

Иоелович М.Я. д.х.н., профессор, руководитель химического отдела биотехнологической компании "Celdesigner" (г. Реховот, Израиль)

Метнер Франк-Юрген доктор наук, профессор, заведующий кафедрой пивоварения Берлинского технического университета (г. Берлин, Германия)

Непомнящих А.И. д.ф.-м.н., профессор, Заслуженный деятель науки РФ, заместитель директора Института геохимии им. А.П. Виноградова СО РАН (г. Иркутск, Россия)

Пуревсурен Б. доктор наук, академик АН Монголии, заведующий лабораторией химии угля Института химии и химической технологии АН Монголии (г. Улан-Батор, Монголия)

Рогожин В.В. д.б.н., профессор, заведующий лабораторией исследования биологически активных веществ Якутской государственной сельскохозяйственной академии (г. Якутск, Россия)

Саловарова В.П. д.б.н., профессор, заведующая кафедрой физико-химической биологии Иркутского государственного университета (г. Иркутск, Россия)

Санжиб Кумар Панда доктор наук, профессор, профессор кафедры наук о жизни и биоинформатики Университета Ассам, (г. Силчар, Индия)

Ульянов Б.А. д.т.н., профессор кафедры химической технологии топлива Ангарского государственного технического университета (г. Ангарск, Россия)

Хуторянский В.В. к.х.н., профессор фармацевтической школы Университета Рединга (г. Лондон, Великобритания)

Цыренов В.Ж. д.б.н., профессор, Заслуженный деятель науки и техники РФ, заведующий кафедрой биотехнологии Восточно-Сибирского государственного университета технологии и управления (г. Улан-Удэ, Россия)

Чхенкели В.А. д.б.н., профессор, заведующая кафедрой анатомии, физиологии и микробиологии Иркутского государственного аграрного университета (г. Иркутск, Россия)

Шен Янминг профессор, заместитель декана факультета химической инженерии, Шеньянский институт химической технологии, (г. Шеньян, Китай)

Ответственный секретарь:

Чеснокова А.Н. к.х.н., Иркутский национальный исследовательский технический университет (г. Иркутск, Россия)

Журнал основан в 2011 г.

Периодичность издания – 4 раза в год.

Журнал зарегистрирован Федеральной службой по надзору
в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор).

Свидетельство ПИ №ФС77-62814 от 18 августа 2015 г.

Учредитель Иркутский национальный исследовательский технический университет

Подписной индекс в Каталоге российской прессы «Почта России» – 24682

Адрес учредителя и издателя:

664074, Россия, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83

Адрес редакции:

664074, Россия, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83, ауд. Д-215

E-mail: biochem@istu.edu

© ФГБОУ ВО «ИРНИТУ», 2021

PROCEEDINGS OF UNIVERSITIES
Applied chemistry and biotechnology
IZVESTIYA VUZOV.
Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya
Volume 11 N 1 2021
EDITORIAL BOARD

Editor in Chief :

Sergei N. Evstaf'ev

Dr. Sci. (Chemistry), Professor, Irkutsk National Research Technical University, Head of Chemistry and Food Technology Department (Irkutsk, Russia)

Deputy Editor:

Yuriy N. Pozhidaev

Dr. Sci. (Chemistry), Professor, Irkutsk National Research Technical University, Professor of Chemistry and Food Technology Department (Irkutsk, Russia)

Editorial council:

Gennadiy B. Borovskii

Dr. Sci. (Biology), Professor, Deputy Head of the Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, (Irkutsk, Russia)

Svetlana Yu. Bratskaya

Dr. Sci. (Chemistry), Professor, Correspondent member of RAS, Institute of Chemistry FEB RAS, Head of the Laboratory of Sorption Processes, (Vladivostok, Russia)

Sergey D. Varfolomeyev

Dr. Sci. (Chemistry), Professor, Correspondent member of RAS, Director of N.M. Emmanuel Institute of Biochemical Physics (Moscow, Russia)

Francis Verpoort

Dr., Professor, Department of Environmental Technology, Food Technology and Molecular Biotechnology, Ghent University Global Campus, (Incheon, Korea)

Vladimir K. Voronov

Dr. Sci. (Chemistry), Professor, Honored Worker of Science of the Russian Federation, Irkutsk National Research Technical University, Professor of Mathematics Department (Irkutsk, Russia)

Enjun Gao

Professor, Head of the Laboratory of Coordination Chemistry, Shenyang Institute of Chemical Technology (Shenyang, China)

Mirali N. Dadashev

Dr. Sci. (Engineering), Professor, Gubkin Russian State University of Oil and Gas, Senior research associate of Physical and Colloid Chemistry Department (Moscow, Russia)

Mikhail Ya. Ioelovich

Dr. Sci. (Chemistry), Professor, Head of Chemical Department, Biotechnology Company "Celdesigner" (Rehovot, Israel)

Frank-Juergen Methner

Dr., Professor, Berlin Institute of Technology, Head of Brewing Science Department (Berlin, Germany)

Alexander I.

Nepomnyashchikh

Dr. Sci. (Phys.-Math.), Professor, Honored Worker of Science of the Russian Federation, Deputy Director of Vinogradov Institute of Geochemistry SB RAS (Irkutsk, Russia)

Purevsuren Barnasan

Dr. Sci. (Chemistry), Academician of Mongolian AS, Institute of Chemistry and Chemical Technology of Mongolian AS, Head of the Laboratory of Coal Chemistry (Ulan Bator, Mongolia)

Vasily V. Rogozhin

Dr. Sci. (Biology), Professor, Yakutsk State Agricultural Academy, Head of the Laboratory for bioactive substance studies (Yakutsk, Russia)

Valentina P. Salovarova

Dr. Sci. (Biology), Professor, Irkutsk State University, Head of Physical and Chemical Biology Department (Irkutsk, Russia)

Sanjib Kumar Panda

Dr., Professor, Assam University, Department of Life Science & Bioinformatics (Silchar, India)

Boris A. Ulyanov

Dr. Sci. (Engineering), Professor, Angarsk State Technical University, Head of Chemical Technology of Fuels Department (Angarsk, Russia)

Vitaliy V. Khutoryanskiy

Ph.D. (Chemistry), Professor of Pharmaceutical School of University of Reading (London, Great Britain)

Vladimir Zh. Tsyrenov

Dr. Sci. (Biology), Professor, Honored Worker of Science and Engineering of the Russian Federation, East Siberia State University of Technology and Management, Head of Biotechnology Department (Ulan-Ude, Russia)

Vera A. Chkhenkeli

Dr. Sci. (Biology), Professor, Irkutsk State Agricultural University, Head of Anatomy, Physiology and Microbiology Department (Irkutsk, Russia)

Yanming Shen

Professor, Vice-Dean of Department of Chemical Engineering, Shenyang Institute of Chemical Technology (Shenyang, China)

Executive Secretary:

Alexandra N. Chesnokova

Cand. Sci. (Chemistry), Irkutsk National Research Technical University (Irkutsk, Russia)

The journal was founded in 2011. The journal is issued 4 times a year.

The journal is registered with the Federal Agency for Supervision of Communications, Information Technologies and Mass Media.

Certificate of registration FS 77-62814 of 18 August, 2015

The journal is included in Ulrich's Periodicals Directory Founder and Publisher:

the Federal State Budget Educational Institution of Higher Education

Irkutsk National Research Technical University

The subscription index in the Catalogue of the Russian Press "Pochta Rossii" is – 24682.

Address of the founder and publisher:

83, Lermontov St., Irkutsk, 664074, Russian Federation

Editorial address:

D-215, 83, Lermontov St., Irkutsk, 664074, Russian Federation,

E-mail: biochem@istu.edu

СОДЕРЖАНИЕ

ХИМИЧЕСКИЕ НАУКИ

Алтынникова Е.Е., Грабельных В.А., Руссавская Н.В., Синеговская Л.М., Абдикалыков Е.Н., Налибаева А.М., Бишимбаева Г.К., Розенцвейг И.Б. Влияние природы атома халькогена на экстракционные и адсорбционные характеристики халькогенсодержащих олигомеров на основе хлорекса.....	6
Уромичева М.А., Кузнецова Ю.Л., Валетова Н.Б., Митин А.В., Семенычева Л.Л., Смирнова О.Н. Синтез привитого сополимера полибутилакрилата на рыбный коллаген.....	16
Танганов Б.Б. Применение логарифмических диаграмм при оценке равновесных концентраций всех частиц в кислотно-основной системе.....	26

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

Калашникова О.Б., Кашевский А.В., Варданян Н.С., Эрдэнэчимэг Д., Жданова Г.О., Топчий И.А., Понаморева О.Н., Вятчина О.Ф., Стом Д.И. Ацидофильные хемолитотрофные микроорганизмы: перспективы применения в биогидрометаллургии и в микробных топливных элементах.....	34
Костикова В.А., Бобокалонов К.А., Кузнецов А.А. Фенольные соединения листьев и соцветий <i>Spiraea baldshuanica</i> B. Fedtsch.	53
Кульков В.Н., Солопанов Е.Ю. Очистка сточных вод в биореакторе с переменным количеством носителей иммобилизованного ила.....	61
Миндубаев А.З., Федосимова С.В., Григорьева Т.В., Романова В.А., Бабаев В.М., Бузюрова Д.Н., Бабынин Э.В., Бадеева Е.К., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Акосах Й.А., Караева Ю.В. Влияние белого фосфора на клеточную морфологию и белковый профиль штаммов гриба <i>Aspergillus niger</i>	69
Боровский Г.Б., Горностаев Т.Г., Полякова М.С., Боровская М.К., Хаснатинов М.А., Соловаров И.С., Данчинова Г.А. Влияние синего света при культивировании мицелия <i>Inonotus rheades</i> на биологические свойства водных экстрактов.....	80
Черепанов И.С., Журавлева А.А. Образование первичных метаболитов и хлорофилла в растениях <i>Cucumis sativus</i> L. при воздействии конъюгата <i>l</i> -рамнозы с <i>m</i> -аминобензойной кислотой.....	90
Шавыркина Н.А., Скиба Е.А. Получение молочной кислоты из шелухи овса.....	99
Макарова Л.Е., Мориц А.С., Соколова Н.А. Образование фталатов при деградации <i>N</i> -фенил-2-нафтиламина почвенными бактериями.....	107
Иванчиков Е.А., Бубеев А.Т., Цыренов В.Ж., Арбатская А.В. Молекулярно-генетическая идентификация штаммов микроорганизмов, выделенных из активного ила, на основе анализа нуклеотидных последовательностей 16s rRNA гена.....	116
Омельченко А.В., Ржевская В.С., Крыжко А.В., Панов Д.А., Бугара И.А. Влияние наноселена как компонента питательной среды на основные параметры культивирования и антагонистическую активность бактерий рода <i>Lactobacillus</i>	125

ХИМИЧЕСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ

Михайлова Н.Н., Мамлиева А.В., Тептерева Г.А., Шавшукова С.Ю., Злотский С.С. Успехи и достижения научной школы академика АН Республики Башкортостан Д.Л. Рахманкулова в области прикладной и нефтепромысловой химии.....	136
Третьяков Н.Ю., Паничева Л.П., Турнаева Е.А., Волкова С.С., Адаховский Д.С., Матвеев М.Р., Кольцов И.Н., Громан А.А. Синтез и изучение свойств алкилфосфатов как поверхностно-активных компонентов щелочно-ПАВ-полимерного состава для повышения нефтеотдачи пласта.....	147

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Рыбарчук О.В., Дударев В.И., Дударева Г.Н. Процесс адсорбционного извлечения ионов хрома(VI) из агрессивных водных растворов.....	159
Иванова А.А., Емельянов А.И., Коржова С.А., Поздняков А.С. Исследование металлополимерных нанокомпозитов меди методом УФ-спектроскопии.....	165

CONTENTS

CHEMICAL SCIENCES

Altynnikova E.E., Grabel'nyh V.A., Russavskaya N.V., Sinegovskaya L.M., Abdikalykov Y.N., Nalibayeva A.M., Bishimbayeva G.K., Rozentsveig I.B. The effect of the nature of the chalcogen atom on the extraction and adsorption characteristics of chalcogen-containing oligomers based on chlorex.....	6
Uromicheva M.A., Kuznetsova Y.L., Valetova N.B., Mitin A.V., Semenycheva L.L., Smirnova O.N. Synthesis of grafted polybutyl acrylate copolymer on fish collagen.....	16
Tanganov B.B. The application of logarithmic charts when evaluating the equilibrium concentrations of all particles in acid-base systems.....	26

PHYSICAL-CHEMICAL BIOLOGY

Kalashnikova O.B., Kashevskii A.V., Vardanyan N.S., Erdenechimeg D., Zhdanova G.O., Topchiy I.A., Ponamoreva O.N., Vyatchina O.F., Stom D.I. Acidophilic chemolithotrophic microorganisms: prospects for use in biohydrometallurgy and microbial fuel cells.....	34
Kostikova V.A., Bobokalonov K.A., Kuznetsov A.A. Phenolic compounds in the leaves and inflorescences of <i>Spiraea baldshuanica</i> B. Fedtsch.	53
Kulkov V.N., Solopanov E.Yu. Wastewater treatment in a bioreactor with a variable number of immobilized sludge carriers.....	61
Mindubaev A.Z., Fedosimova S.V., Grigoryeva T.V., Romanova V.A., Babaev V.M., Buzurova D.N., Babynin E.V., Badeeva E.K., Minzanova S.T., Mironova L.G., Akosah Y.A., Karaeva J.V. Effects of white phosphorus on the cellular morphology and protein profile of <i>Aspergillus niger</i>	69
Borovskii G.B., Gornostai T.G., Polyakova M.S., Borovskaja M.K., Khasnatinov M.A., Solovarov I.S., Danchinova G.A. Impact of blue light on the biological properties of aqueous extracts during the cultivation of the <i>Inonotus rheades</i> mycelium.....	80
Cherepanov I.S., Zhuravleva A.A. Formation of primary metabolites and chlorophyll in the plants of <i>Cucumis sativus</i> L. when exposed to <i>l</i> -ramnose conjugated with <i>m</i> -aminobenzoic acid.....	90
Shavyrkina N.A., Skiba E.A. Obtaining lactic acid from oat husks.....	99
Makarova L.E., Morits A.S., Sokolova N.A. Formation of phthalates during the degradation of N-phenyl-2-naphthylamine by soil bacteria.....	107
Ivanchikov E.A., Bubeev A.T., Tsyrenov V.Zh., Arbatsksaya A.V. Molecular-genetic identification of microorganism strains isolated from activated sludge based on an analysis of nucleotide sequences of the 16s rRNA gene.....	116
Omelchenko A.V., Rzhetskaya V.S., Kryzhko A.V., Panov D.A., Bugara I.A. Effects of nanoselenium as a nutrient medium component on the main cultivation parameters and antagonistic activity of <i>Lactobacillus</i> strains.....	125

CHEMICAL TECHNOLOGY

Mikhailova N.N., Mamlieva A.V., Teptereva G.A., Shavshukova S.Yu., Zlotskii S.S. Advances and achievements of Academician D.L. Rakhmankulov's scientific school in the field of applied and oilfield chemistry.....	136
Tret'yakov N.Yu., Panicheva L.P., Turnaeva E.A., Volkova S.S., Adakhovskii D.S., Matveev M.R., Kol'tsov I.N., Groman A.A. Synthesis of alkyl phosphates and investigation of their surface-active properties in an alkaline surfactant polymer system for enhanced oil recovery.....	147

BRIEF COMMUNICATION

Rybarchuk O.V., Dudarev V.I., Dudareva G.N. Adsorptive extraction of chromium (VI) ions from corrosive aqueous solutions.....	159
Ivanova A.A., Emel'yanov A.I., Korzhova S.A., Pozdnyakov A.S. Study of metal-polymer copper nanocomposites using the method of UV spectroscopy.....	165

Оригинальная статья / Original article

УДК 547.431+541.183

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-6-15>



Влияние природы атома халькогена на экстракционные и адсорбционные характеристики халькогенсодержащих олигомеров на основе хлорекса

© Е.Е. Алтынникова*, В.А. Грабельных**, Н.В. Руссавская*,
Л.М. Синеговская***, Е.Н. Абдикалыков***, А.М. Налибаева***,
Г.К. Бишимбаева***, И.Б. Розенцвейг**

*Иркутский государственный университет путей сообщения,
г. Иркутск, Российская Федерация

**Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН,
г. Иркутск, Российская Федерация

***Институт топлива, катализа и электрохимии им. Д.В. Сокольского,
г. Алматы, Казахстан

Резюме: Исследованы экстракционные и адсорбционные характеристики халькогенсодержащих олигомеров, полученных из хлорекса и элементных халькогенов в системах гидразингидрат–основание. Сера- и селенсодержащие олигомеры, синтезированные в системе гидразингидрат–моноэтаноламин, растворимы в органических растворителях, полученные растворы способны экстрагировать ионы Hg^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} и Ni^{2+} из водных растворов. Олигомеры, синтезированные в системе гидразингидрат–вода–KOH (сера- и селенсодержащие олигомеры), а также теллурсодержащий олигомер, полученный в системе гидразингидрат–KOH, использованы в качестве адсорбентов. Предполагается, что экстракция и адсорбция ионов металлов халькогенсодержащими олигомерами осуществляется путем формирования комплексов, в которых атомы халькогенов выступают в качестве лигандов. Влияние природы атома халькогена на возможность образования комплексов, то есть на экстракционные и адсорбционные свойства используемых олигомеров, рассмотрено с позиции принципа жестких и мягких кислот и оснований, согласно которому катионы Hg^{2+} и Cd^{2+} относятся к мягким кислотам, а катионы Zn^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} и Ni^{2+} – к кислотам промежуточной жесткости. Атомы халькогенов относятся к мягким основаниям. Эксперимент показал, что ионы Hg^{2+} и Cd^{2+} легко экстрагируются и адсорбируются всеми использованными олигомерами, тогда как катионы промежуточной жесткости легче всего вступают во взаимодействие с серасодержащими олигомерами. Подтверждение образования комплексов олигомер–металл получено на основании анализа ИК-спектров и спектров ЯМР ^{77}Se , зарегистрированных для сера- и селенсодержащих олигомеров до и после экстракции. В ИК-спектрах наблюдаются четкие изменения характера полос поглощения, обусловленные валентными колебаниями связей C–S и C–Se. В спектре ЯМР ^{77}Se появляется дополнительный сигнал дезэкранированных ядер селена. Незначительное изменение характера ИК-спектров в области валентных колебаний C–O указывает на слабое участие кислорода в формировании комплексов. Его роль в обеспечении высоких показателей по экстракции и адсорбции сводится, по-видимому, к увеличению гибкости макромолекул, которая обеспечивает формирование благоприятной геометрии для комплексообразования.

Ключевые слова: хлорекс, олигомеры, сера, селен, теллур, ионы тяжелых металлов, экстракция, адсорбция, принцип ЖМКО, ИК-спектроскопия, ЯМР ^{77}Se

Благодарности: Спектральные и аналитические данные были получены с использованием оборудования Байкальского аналитического центра коллективного пользования Иркутского института химии им. А.Е. Фаворского СО РАН.

Для цитирования: Алтынникова Е.Е., Грабельных В.А., Руссавская Н.В., Синеговская Л.М., Абдикалыков Е.Н., Налибаева А.М., Бишимбаева Г.К., Розенцвейг И.Б. Влияние природы атома халькогена на экстракционные и адсорбционные характеристики халькогенсодержащих олигомеров на основе хлорекса. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2021. Т. 11. N 1. С. 6–15. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-6-15>

The effect of the nature of the chalcogen atom on the extraction and adsorption characteristics of chalcogen-containing oligomers based on chlorex

Ekaterina E. Altynnikova*, Valentina A. Grabel'nykh**, Natalya V. Russavskaya*, Lidiya M. Sinegovskaya***, Yerlan N. Abdikalykov***, Arailym M. Nalibayeva***, Gauhar K. Bishimbayeva***, Igor B. Rozentsveig**

*Irkutsk State Transport University,
Irkutsk, Russian Federation

**A.E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry SB RAS,
Irkutsk, Russian Federation

***D.V. Sokolsky Institute of Fuel, Catalysis and Electrochemistry,
Almaty, Kazakhstan

Abstract. The extraction and adsorption characteristics of chalcogen-containing oligomers derived from chlorex and elemental chalcogens in the hydrazine hydrate–base systems were studied. Sulphur- and selenium-containing oligomers synthesised in hydrazine hydrate–monoethanolamine systems are soluble in organic solvents. The as-obtained solutions are capable of extracting the following ions from water solutions: Hg^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} and Ni^{2+} . Oligomers synthesised in the hydrazine hydrate–water–KOH system (sulphur- and selenium-containing oligomers) and a tellurium-containing oligomer obtained in the hydrazine hydrate–KOH system were used as adsorbents. It was assumed that the extraction and adsorption of metal ions by chalcogen-containing oligomers is carried out through the formation of complexes in which the chalcogen atoms act as ligands. The effect of the nature of chalcogen atoms on the possibility of forming complexes, i.e. on the extraction and adsorption properties of the oligomers used, was considered using the theory of hard and soft acids and bases (HSAB). According to this theory, the cations Hg^{2+} and Cd^{2+} belong to soft acids, while the cations Zn^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} and Ni^{2+} belong to acids of intermediate hardness. Chalcogen atoms are classified as soft bases. The conducted experiment showed that Hg^{2+} and Cd^{2+} ions are easily extracted and adsorbed by all the oligomers used, while the intermediate-hardness cations most easily interact with the sulphur-containing oligomers. The formation of oligomer–metal complexes was confirmed by analysing IR and ^{77}Se NMR spectra recorded for sulphur- and selenium-containing oligomers before and after the extraction. The recorded IR spectra contained obvious changes in the nature of the absorption bands due to the stretching vibrations of the C–S and C–Se bonds. An additional signal of de-screened selenium nuclei was observed in the ^{77}Se NMR spectrum. An insignificant change in the nature of the IR spectra in the region of stretching C–O vibrations indicated a weak participation of oxygen in the formation of complexes. It can be assumed that the role of oxygen in maintaining the high rates of extraction and adsorption is associated with an increase in the flexibility of macromolecules, which ensures a more favourable geometry for complex formation.

Keywords: chlorex, oligomers, sulphur, selenium, tellurium, heavy metal ions, extraction, adsorption, HSAB theory, IR spectroscopy, NMR ^{77}Se

Acknowledgments: Spectral and analytical data were obtained using the facilities of the Baikal Analytical Center for Collective Use of the A.E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry SB RAS.

For citation: Altynnikova EE, Grabel'nyh VA, Russavskaya NV, Sinegovskaya LM, Abdikalykov YN, Nalibayeva AM, Bishimbayeva GK, Rozentsveig IB. The effect of the nature of the chalcogen atom on the extraction and adsorption characteristics of chalcogen-containing oligomers based on chlorex. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(1):6–15. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-6-15>

ВВЕДЕНИЕ

Атомы халькогенов (S, Se, Te) в составе органических молекул выступают в качестве доноров электронных пар, обеспечивая тем самым образование комплексных соединений с ионами переходных металлов. Термодинамика и кинетика формирования таких комплексов базируется

на принципе «жестких и мягких кислот и оснований» (ЖМКО) [1], согласно которому атомы халькогенов, относящиеся к мягким основаниям, легко координируют с мягкими кислотами – ионами переходных металлов. Использование этого принципа лежит в основе разработок новых экстрагентов [2, 3], сорбентов¹, катализаторов [4] и

¹Лейкин Ю.А. Физико-химические основы синтеза полимерных сорбентов: учеб. пособие. М.: БИ-НОМ. Лаборатория знаний, 2011. 413 с.

аналитических реагентов², отвечающих потребностям химической технологии и аналитической химии. Этот же принцип позволяет решать важную экологическую задачу современности – загрязнение окружающей среды тяжелыми металлами³. Для очистки сточных вод от тяжелых металлов разработано несколько технологических подходов: реагентная обработка, электрохимические методы, адсорбция и др.⁴, при этом в качестве эффективных сорбентов предлагаются хелатообразующие полимеры с серасодержащими функциональными группами (мягкими основными центрами) [5].

Согласно анализу литературных данных, из халькогенидных производных практическое применение пока нашли только органические соединения серы [2, 3, 5], причем эффективность использования, например, серасодержащих полимерных сорбентов [6] не уступает эффективности широко применяемых ионообменных смол [7], но серасодержащие сорбенты зачастую выгодно отличаются от них по стоимости. Кроме указанных областей использования олигомерные продукты, содержащие халькогены, нашли применение в качестве герметиков (сerasодержащие олигомеры) [8], они весьма перспективны для создания парамагнитных материалов (теллурсодержащие олигомеры) [9] и могут применяться в халькогенорганическом синтезе [10–12].

Халькогенорганические олигомеры ранее были получены на основе β,β-дихлордиэтилового эфира (хлорекса) **1** с использованием систем гидразингидрат–основание и элементарных халькогенов. Для получения сера- и селенсодержащих олигомеров были использованы три

основно-восстановительные системы: гидразингидрат–моноэтанолламин (МЭА), (получены олигомеры **2a** и **3a**) [12, 13], гидразингидрат–вода–KOH (получены олигомеры **2b** и **3b**) [13], гидразингидрат–KOH, без добавления воды (олигомер **4**) [14]. Было также обнаружено, что сера- и селенсодержащие олигомеры **2a** и **3a** хорошо растворяются в таких органических растворителях, как хлороформ, ацетон, диоксан и др. Это позволило использовать данные олигомеры в качестве экстрагентов для извлечения соединений токсичных тяжелых металлов из сточных вод [15].

Цель настоящей работы заключалась в получении олигомеров **2a, б**, **3a, б** и **4** по описанным методикам, сравнительный анализ их характеристик, сопоставление экстракционной (олигомеры **2a** и **3a**) и сорбционной способности (олигомеры **2b**, **3b** и **4**) по отношению к ионам тяжелых металлов (Hg^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+}), а также выявление влияния природы атома халькогена на эффективность извлечения солей металлов из водных растворов. Кроме того, необходимо было уточнить роль атома кислорода в координационном взаимодействии с ионами исследованных металлов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Олигомеры **2a** и **3a** получены в системе гидразингидрат–МЭА, олигомеры **2b** и **3b** – в системе водный гидразин–KOH, теллурсодержащий олигомер **4** – в системе гидразингидрат–KOH по методикам, изложенным в работах [12–14]. В табл. 1 приведены характеристики полученных в данном исследовании олигомеров.

Таблица 1. Характеристика полученных олигомеров (Y=S, Se, Te)

Table 1. Characteristics of oligomers obtained (Y=S, Se, Te)

Номер олигомера	Выход, %	Найдено, %				M ^a	Молекулярная формула
		C	H	Y	Cl		
2a	82	34,23	5,80	41,37	6,45	1100 ^b	C ₃₂ H ₆₄ S ₁₄ O ₈ Cl ₂
2b	74	35,23	5,58	44,37	2,34	3034 ^b	C ₈₈ H ₁₇₆ S ₄₂ O ₂₂ Cl ₂
3a	91	22,12	3,52	64,43	4,04	1715 ^г	C ₃₂ H ₆₄ Se ₁₄ O ₈ Cl ₂
3b	73	20,95	3,00	65,80	1,36	5500 ^a	C ₉₆ H ₁₉₂ Se ₄₆ O ₂₄ Cl ₂
4	74	14,81	2,52	76,60	1,10	6450 ^e	C ₈₀ H ₁₆₀ Te ₃₈ O ₂₀ Cl ₂
Номер олигомера	Вычислено, %				Агрегатное состояние; температура разложения		
	C	H	Y	Cl			
2a	35,07	5,84	40,91	6,48	Вязкое масло Вязкое масло Высоковязкое масло 103°C – начало разложения 110°C – начало разложения		
2b	35,21	5,87	44,81	2,37			
3a	21,90	3,65	63,09	4,05			
3b	21,20	3,53	66,89	1,31			
4	15,08	2,52	76,23	1,12			

Примечание. ^aM – средняя молекулярная масса, определенная методом концевых групп по содержанию остаточного хлора, атомы которого располагаются на концах макромолекулы [16]; ^bM=800 [12]; ^bM=2800 [13, 14] ^гM=2200 [15]; ^aM=3750 [15]; ^eM=9100 [15].

²Коренман И.М. Органические реагенты в неорганическом анализе: справочник. М.: Химия, 1990. 448 с.

²Давыдова С.Л., Тарасов В.И. Тяжелые металлы как супертоксиканты XXI века: учеб. пособие. М.: изд-во РУДН, 2002. 140 с. <http://eb.arsu.kz:81/pdf/foreign/magzhan190.pdf>

³Родионов А.И., Клушин В.Н., Торочешников Н.С. Техника защиты окружающей среды: учебник для вузов; 2-е изд., перераб и доп. М.: Химия, 1989. 512 с.

Как видно из данных, представленных в табл. 1, полученные олигомеры имеют достаточно однородный состав, их характеристики удовлетворительно воспроизводятся.

Для исследования экстракционных свойств 0,2 г олигомера **2a** или **3a** растворяли в 5 мл хлороформа. Полученный раствор выливали в 20 мл раствора соли изучаемого металла определенной концентрации и перемешивали на магнитной мешалке в течение 4 ч. Для исследований использовали модельные растворы нитратов металлов. По окончании извлечения хлороформный слой отделяли на делительной воронке, а в остаточном растворе соли определяли концентрацию ионов металла фотометрическим методом [17].

Для концентрации извлекаемого металла 5000 мг/дм³ эффективность экстракции оценивалась по количеству металла, поглощенного экстрагентом, которое определялось по формуле:

$$A = \frac{(C_0 - C_k) \cdot V}{m},$$

где A – экстракционная способность, мг/г; C_0 и C_k – начальная и конечная концентрация ионов металла в растворе соответственно, мг/дм³; V – объем используемого раствора соли металла, дм³; m – масса используемого экстрагента (олигомера).

При концентрации металла в растворе 10 мг/дм³ эффективность экстракции оценивалась по степени извлечения I металла из раствора, которая определялась по формуле:

$$I = \frac{(C_0 - C_k)}{C_0} 100\%.$$

Полученные данные по экстракции металлов из модельных растворов представлены в табл. 2.

Сорбцию ионов из растворов проводили в статических условиях. Для этого навеску сорбента (0,2 г) встряхивали с раствором соли (20 мл) определенной концентрации на шейкере S-3.02.08M в течение 4 ч. Эффективность сорбентов и степень извлечения металла определяли по снижению концентрации используемого раствора. Расчеты проводили с использованием формул, представленных для обработки процессов экстракции. В табл. 3 приведены данные по сорбционной эффективности полученных олигомеров.

Координационный механизм извлечения металлов подтвержден для серасодержащего сорбента **2b** и олигомера **3a** методом ИК-спектроскопии. Спектры зарегистрированы для исходных олигомеров **2b** и **3a** и для этих олигомеров после сорбции ионов Pb^{2+} из раствора, содержащего 5000 мг свинца в 1 дм³ модельного раствора. Спектры записаны в тонком слое на спектрофотометре Bruker IFS-25, диапазон записи спектра – 400–4000 см⁻¹.

Учитывая растворимость олигомера **3a** в $CDCl_3$, впервые для него были сняты спектры ЯМР ^{77}Se , а также для продукта, полученного после экстракции этим олигомером ионов свинца из модельного раствора, содержащего 5000 мг Pb^{2+} в 1 дм³ раствора. Спектры ЯМР записаны на спектрометре Bruker DPX-400 при рабочей частоте 76,31 МГц (внутренний стандарт – Me_2Se).

Таблица 2. Экстракционные свойства полученных олигомеров 2a и 3a
Table 2. Extractive properties of oligomers 2a and 3a

Экстрагент	Экстракционная активность, мг/г, по отношению к ионам металлов, $C_0 = 5000$ мг/дм ³					
	Hg ²⁺	Cd ²⁺	Zn ²⁺	Pb ²⁺	Cu ²⁺	Ni ²⁺
2a	430	414 (408)*	280 (340)	327 (345)	298 (306)	315 (270)
3a	446	437	273	318	264	335
Степень извлечения, %, $C_0 = 10$ мг/дм ³						
2a	100 (100)	100	100	97 (98)	96	100
3a	100	100	97	97	95	98

Примечание. * – в скобках представлены данные из работы [17].

Таблица 3. Адсорбционные свойства олигомеров 2b, 3b, 4
Table 3. Adsorption properties of oligomers 2b, 3b and 4

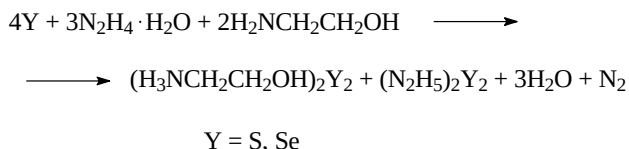
Сорбент	Адсорбционная активность, мг/г, по отношению к ионам металлов, $C_0 = 5000$ мг/дм ³					
	Hg ²⁺	Cd ²⁺	Zn ²⁺	Pb ²⁺	Cu ²⁺	Ni ²⁺
2b	380	227	370	344	176	417
3b	410	338	363	350	125	370
4	395	337	340	340	135	273
Степень извлечения, %, $C_0 = 10$ мг/дм ³						
2b	87	73	100	100	64	100
3b	98	84	98	100	57	97
4	96	83	97	99	61	87

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Получение халькогенсодержащих олигомеров на основе хлорекса **1** с использованием элементарных халькогенов осуществляется в одном реакционном сосуде в две стадии [12–15]:

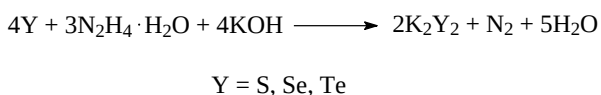
1. Восстановительная активация халькогенов [18]:

а) в системе гидразингидрат–МЭА:

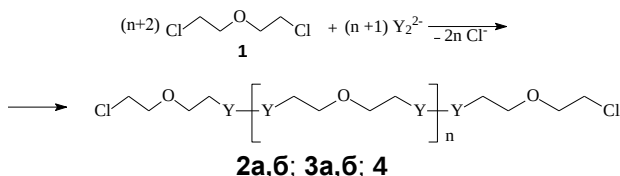


По данным, приведенным в работе [19], активация селена в этой системе проходит менее селективно по сравнению с серой: наряду с анионами Se_2^{2-} образуются также анионы Se^{2-} , Se_3^{2-} и даже Se_4^{2-} .

б) в системе гидразингидрат–КОН:



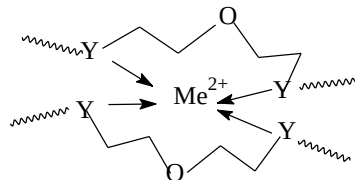
2. Поликонденсация халькогенид-анионов Y_2^{2-} с хлорексом:



Величина n в полученных олигомерах соответствует средней молекулярной формуле, представленной в табл. 1. Предполагаемая структура олигомеров **2–4** подтверждена спектральными методами (ИК, ЯМР 1H и ^{13}C), которые полностью соответствуют данным, приведенным в работах [12–14]. Для олигомера **3а** впервые записан спектр ЯМР ^{77}Se . Достаточно сложный вид этого спектра хорошо согласуется с широким интервалом (около 1500 м.д.) проявления резонанса ядер ^{77}Se и их высокой чувствительностью даже к незначительному изменению характера заместителей у атома селена [20], а также с полимерным характером молекул образца. По данным авторов работы [20], на основании предполагаемой структуры олигомера группа сигналов в спектре в области 277–292 м.д. отнесена к резонансу ядер селена фрагментов CSe_2C , группа сигналов 442–444 м.д. – к фрагментам $CSeC$, и группа сигналов 452–454 м.д. – к фрагментам CSe_3C . Имеется также слабый сигнал 481 м.д., который отнесен нами к фрагменту CSe_4C . Сигналы 542 и 577 м.д. соответствуют резонансу ядер селена, находящихся внутри цепочек Se_3 и Se_4 .

В соответствии с принципом ЖМКО катионы Hg^{2+} и Cd^{2+} относятся к мягким кислотам, а кати-

оны Zn^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} и Ni^{2+} – к кислотам промежуточной жесткости. Атомы S, Se и Te выступают в качестве мягких оснований, причем их «мягкость» возрастает с увеличением радиуса атома и его поляризуемости [1]. На основании теории ЖМКО наиболее эффективные координационные взаимодействия могут наблюдаться для ионов ртути и кадмия. В то же время катионы промежуточной жесткости легче всего должны координировать с серасодержащими олигомерами, координация с атомами селена и теллура может быть менее эффективной. Полученные результаты качественно подтверждают данные заключения: 100%-я эффективность экстракции ионов ртути и кадмия (концентрация 10 мг/дм³) наблюдается как для сера- так и для селенсодержащего олигомеров (см. табл. 2 и 3). Подобная эффективность для катионов цинка и никеля отмечается только для серасодержащего олигомера **2а**. Это позволяет с достаточной уверенностью предположить, что экстракционное и сорбционное извлечение ионов тяжелых металлов при использовании синтезированных олигомеров осуществляется, наиболее вероятно, путем образования полимерных комплексов, формирование которых происходит за счет координации донорных атомов халькогенов около иона металла, выступающего в роли комплексообразователя. Схематично это можно представить следующим образом:



Структуры комплексов подобного типа обсуждаются в литературе для полимерных сорбентов, содержащих гетероатомы [21, 22].

Для подтверждения участия атомов серы и селена в координационном взаимодействии с ионами металлов использованы методы ИК- и ЯМР-спектроскопии. Наблюдаемые в ИК-спектре олигомера **2а** две сильные полосы ν_{C-S} (755 и 666 см⁻¹) при комплексообразовании с ионами свинца снижают интенсивность и смещаются в низкочастотную область (600 и 520 см⁻¹). Это связано с ослаблением связи C–S при координации ионов металла с атомами серы. В области проявления валентных колебаний C–O (1110–1000 см⁻¹) в спектре наблюдаются только незначительные изменения (максимальное смещение 5 см⁻¹), что может свидетельствовать о слабом участии атомов кислорода в координационном взаимодействии. В ИК-спектрах селенсодержащего олигомера изменение спектра наблюдается только при частоте 454 см⁻¹, которая соответствует валентным колебаниям C–Se. При координации

эта полоса практически исчезает и проявляется в виде небольшого плеча на полосе, находящейся за пределом записи прибора, которая существенно интенсивнее, чем полоса исходного олигомера **3a**. В области 1110–1000 см⁻¹ изменений не происходит, следовательно, участие кислорода в координации для селенсодержащего олигомера практически не проявляется.

Спектр ЯМР ⁷⁷Se олигомера **3a** после экстракции также имеет сложный характер. Однако наряду с сигналами, которые наблюдаются в исходном олигомере, появляется новый сигнал в слабом поле невысокой интенсивности при 640 м.д., который однозначно свидетельствует о дезэкранировании части атомов селена за счет координации с ионами металла. В спектрах ¹H и ¹³C заметных изменений не наблюдается.

Участие атомов кислорода, входящих в состав олигомера и относящихся к жестким основным центрам, в координации с мягкими кислотами – ионами тяжелых металлов, достаточно проблематично. Тем не менее, присутствие этих атомов увеличивает гибкость макромолекулы (особенно в растворе), что способствует формированию благоприятной геометрии для комплексобразования. Из химии высокомолекулярных соединений⁵ известно, что полимеры, содержащие связи С–С и С–О, обладают повышенной гибкостью, которая может быть обусловлена пониженным барьером внутреннего вращения относительно одинарных связей С–С и С–О. Экспериментально барьеры внутреннего вращения относительно этих связей определены только для некоторых низкомолекулярных соединений⁶. При этом показано, что барьер вращения относительно связи С–С в пропане в 1,2 раза больше барьера вращения относительно связи С–О в

диметиловом эфире. Это свидетельствует о повышении гибкости молекул при введении в них кислорода.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Халькогенсодержащие олигомеры, синтезированные из хлорекса и элементарных халькогенов в системах гидразингидрат–основание, проявляют высокую эффективность по извлечению ионов тяжелых металлов из водных растворов. Получаемые в разных основно-восстановительных системах олигомеры могут быть использованы либо в качестве экстрагентов, либо – сорбентов.

С позиции принципа ЖМКО рассмотрено влияние природы халькогена на экстракционные и адсорбционные характеристики олигомеров. Ионы, относящиеся к мягким кислотам, эффективно извлекаются олигомерами любого состава, тогда как ионы, имеющие промежуточную жесткость, полнее извлекаются серасодержащими олигомерами.

Координация атомов халькогенов относительно ионов металлов подтверждена методами ИК-спектроскопии и ЯМР ⁷⁷Se.

Атомы кислорода в полимерной цепи принимают слабое участие в комплексобразовании. По-видимому, их роль в получении высоких показателей по экстракции и адсорбции сводится к увеличению гибкости макромолекул, которая обеспечивает благоприятную геометрию для комплексобразования.

Полученные результаты показывают возможность практического использования олигомеров, получаемых из доступного сырья, для извлечения токсичных тяжелых металлов из технологических растворов и для очистки сточных вод металлоперерабатывающих предприятий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гарновский А.Д., Садименко А.П., Осипов О.А., Цинцадзе Г.В. Жестко-мягкие взаимодействия в координационной химии. Ростов н/Д: Изд-во Ростовского университета, 1986. 272 с.
2. Муринов Ю.И., Майстренко В.Н., Афзалетдинова Н.Г. Экстракция металлов S,N-органическими соединениями. М.: Наука, 1993. 193 с.
3. Чекушин В.С., Борбат В.Ф. Экстракция благородных металлов сульфидами и сульфоксидами: монография. М.: Наука, 1984. 152 с.
4. Bayon J.C., Claver C., Masdeu-Bulto A.M. Homogeneous catalysis with transition metal complexes containing sulfur ligands // Coordination Chemistry Reviews. 1999. Vol. 193–195. P. 73–145. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(99\)00169-1](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(99)00169-1)
5. Херинг Р. Хелатообразующие сорбенты / пер. с нем. В.А. Барабанова; под ред. В.А. Каргина, С.Л. Давыдовой. М.: Мир, 1971. 280 с.
6. Чернышева Е.А., Грабельных В.А., Леванова Е.П., Руссавская Н.В., Розенцвейг И.Б., Корчевин Н.А. Новый подход к реализации адсорбционных свойств лигнина: получение серасодержащих сорбентов для ионов тяжелых металлов // Химия в интересах устойчивого развития. 2017. Т. 25. N 3. С. 327–332. <https://doi.org/10.15372/KhUR20170312>
7. Dabrowski A., Hubicki Z., Podkoscielny P., Robens E. Selective removal of the heavy metal ions from waters and industrial wastewaters by ion-exchange method // Chemosphere. 2004. Vol. 56.

⁵Тагер А.А. Физикохимия полимеров: учеб. пособие для хим. фак. ун-тов; 4-е изд., перераб. и доп. / под ред. А.А. Аскадского. М.: Научный мир, 2007. 573 с.

⁶Гордон А., Форд Р. Спутник химика. Физико-химические свойства, методики, библиография (справочник) / пер. с англ. Е.Л. Розенберга. М.: Мир, 1976. 604 с.

Issue 2. P. 91–106. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.03.006>

8. Хакимуллин Ю.Н., Минкин В.С., Палютин Ф.М., Дебердеев Т.Р. Герметики на основе полисульфидных олигомеров: синтез, свойства, применение. М.: Наука, 2007. 301 с.

9. Елаев А.В., Вакульская Т.И., Леванова Е.П., Грабельных В.А., Сухомазова Э.Н., Руссавская Н.В. [и др.]. Парамагнитные свойства олигомерных политриметилендителлуридов // III Международная школа по химии и физикохимии олигомеров: тезисы докладов (Петрозаводск, 17–23 июня 2007). Петрозаводск, 2007. С. 70.

10. Deryagina E.N., Russavskaya N.V., Alekminskaya O.V., Korchevin N.A., Trofimov B.A. A new facile route to 1,2-ethanedithiol and its derivatives // *Sulfur Letters*. 1999. Vol. 22. Issue 3. P. 85–88.

11. Vshivtsev V.Yu., Levanova E.P., Grabel'nykh V.A., Sukhomazova E.N., Zhanchipova E.R., Klyba L.V., et al. 3-Oxapentane-1,5-diselenol // *Russian Journal of Organic Chemistry*. 2007. Vol. 43. Issue 10. P. 1561–1562. <https://doi.org/10.1134/S1070428007100272>

12. Levanova E.P., Vil'ms A.I., Bezborodov V.A., Babenko I.A., Sosnovskaya N.G., Istomina N.V., et al. Synthesis of polydentate chalcogen-containing ligands using the system hydrazine hydrate–base // *Russian Journal of General Chemistry*. 2017. Vol. 87. Issue 3. P. 396–401. <https://doi.org/10.1134/S1070363217030069>

13. Deryagina E.N., Levanova E.P., Grabel'nykh V.A., Sukhomazova E.N., Russavskaya N.V., Korchevin N.A. Thiylation of polyelectrophiles with sulfur in hydrazine hydrate-amine systems // *Russian Journal of General Chemistry*. 2005. Vol. 75. Issue 2. P. 194–199. <https://doi.org/10.1007/s11176-005-0197-y>

14. Korchevin N.A., Russavskaya N.V., Alekminskaya O.V., Deryagina E.N. Reactions of Bielectrophiles $(ClCH_2CH_2)_2Y$ with Sulfur in Basic Reducing Systems // *Russian Journal of General Chemistry*. 2002. Vol. 72, Issue 2. P. 240–243. <https://doi.org/10.1023/A:1015425702523>

15. Vshivtsev V.Yu., Levanova E.P., Grabel'nykh V.A., Klyba L.V., Zhanchipova E.R., Sukhomazova E.N., et al. Reactions of β, β' -dichlorodiethyl ether with elemental chalcogens and

dimethyl dichalcogenides in the system hydrazine hydrate-base // *Russian Journal of Organic Chemistry*. 2008. Vol. 44. Issue 1. P. 43–51. <https://doi.org/10.1007/s11178-008-1005-z>

16. Сёренсон У., Кемпбел Т. Препаративные методы химии полимеров / пер. с англ.; под ред С.Р. Рафикова. М.: Изд-во иностранной литературы, 1963. 363 с.

17. Пат. № 2590537, Российская Федерация. Использование поли(3-оксапентилendisulfida) для извлечения тяжелых металлов из водных растворов / А.В. Хаташкеев, О.Н. Игнатова, А.Р. Калиев, Е.П. Леванова, В.А. Грабельных, Л.М. Синеговская [и др.]; заявитель и патентообладатель Иркутский государственный университет путей сообщения, Иркутский институт химии СО РАН; заявл. 05.02.2015, опубл. 10.07.2016. Бюл. № 19.

18. Розенцвейг И.Б., Никонова В.С., Корчевин Н.А. Халькогенирование ненасыщенных галогенорганических соединений элементарными халькогенами и их металлическими производными // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2019. Т. 9. N 4. С. 576–589. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-4-576-589>

19. Russavskaya N.V., Levanova E.P., Sukhomazova E.N., Grabel'nykh V.A., Klyba L.V., Zhanchipova E.R. Synthesis and oxidative cleavage of poly(trimethylene diselenides) // *Russian Journal of General Chemistry*. 2006. Vol. 76. Issue 2. P. 229–234. <https://doi.org/10.1134/S1070363206020125>

20. Luthra N.P., Odom J.D. Nuclear magnetic resonance and electron spin resonance studies of organic selenium and tellurium compounds. In: Patai S., Rappoport Z. (Eds.). *The chemistry of selenium and tellurium compounds*. Vol. 1. New-York: John Wiley and Sons Ltd., 1986. P. 189–241.

21. Дербишер Е.В., Овдиенко Е.Н., Габитов Р.И., Дербишер В.Е., Черткова М.В. Доочистка воды с применением полимерных гидразидов карбоновых кислот // *Водоочистка*. 2011. N 6. С. 17–22.

22. Рединова А.В., Грабельных В.А., Леванова Е.П., Корчевин Н.А. Извлечение ионов тяжелых металлов из водных растворов серасодержащими полимерными сорбентами. // *Вестник Иркутского государственного технического университета*. 2013. N 1 (72). С. 113–116.

REFERENCES

1. Garnovskii AD, Sadimenko AP, Osipov OA, Tsintsadze GV. *Hard-soft Interaction in Coordination Chemistry*. Rostov-na-Donu: Izdatel'stvo Rostovskogo universiteta; 1986. 272 p. (In Russian)

2. Murinov Yul, Maistrenko VN, Afzaletdinova NG. *Metal extraction with S,N-organic compounds*. Moscow: Nauka; 1993. 192 p. (In Russian)

3. Chekushin VS, Borbat VF. *Extraction of noble metals by sulfides and sulfoxides*. Moscow: Nauka; 1984. 152 p. (In Russian)

4. Bayon JC, Claver C, Masdeu-Bulto AM. Homogeneous catalysis with transition metal complexes containing sulfur ligands. *Coordination Chemistry Reviews*. 1999;193–195:73–145. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(99\)00169-1](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(99)00169-1)

5. Hering R. *Chelatbildende Ionenaustauscher*. Berlin: Akademie-Verlag, 1967. – 267 s. (Russ. ed.: Khering R. *Khelatoobrazuyushchie sorbenty*. Moscow: Mir, 1971. 280 p.)

6. Chernysheva EA, Grabel'nyh VA, Levanova

EP, Russavskaja NV, Rozencvejg IB, Korchevin NA. New Approach to the Realisation of Adsorption Properties of Lignin: Preparation of Sulphur-Containing Sorbents for Heavy Metal Ions. *Khimiya v interesakh ustoichivogo razvitiya = Chemistry for Sustainable Development*. 2017;25(3):327–332. (In Russian) <https://doi.org/10.15372/KhUR20170312>

7. Dabrowski A, Hubicki Z, Podkoscielny P, Robens E. Selective removal of the heavy metal ions from waters and industrial wastewaters by ion-exchange method. *Chemosphere*. 2004;56(2):91–106. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.03.006>

8. Khakimullin YuN, Minkin VS, Palyutin FM, Deberdeev TR. *Sealants based on polysulfide oligomers. Synthesis, properties, application*. Moscow: Nauka; 2007. 301 p. (In Russian)

9. Elayev AV, Vakul'skaya TI, Levanova EP, Grabel'nykh VA, Sukhomazova EN, Russavskaya NV, et al. Paramagnetic properties of oligomeric polytrimethylenedisulfides. In: *III International School of Chemistry and Physicochemistry of Oligomers: Abstracts*. 17–23 June 2017, Petrozavodsk. Petrozavodsk; 2007, p. 70. (In Russian)

10. Deryagina EN, Russavskaya NV, Alekminskaya OV, Korchevin NA, Trofimov BA. A new facile route to 1,2-ethanedithiol and its derivatives. *Sulfur Letters*. 1999;22(3):85–88.

11. Vshivtsev VYu, Levanova EP, Grabel'nykh VA, Sukhomazova EN, Zhanchipova ER, Klyba LV, et al. 3-Oxapentane-1,5-diselenol. *Russian Journal of Organic Chemistry*. 2007;43(10):1561–1562. <https://doi.org/10.1134/S1070428007100272>

12. Levanova EP, Vil'ms AI, Bezborodov VA, Babenko IA, Sosnovskaya NG, Istomina NV, et al. Synthesis of polydentate chalcogen-containing ligands using the system hydrazine hydrate–base. *Russian Journal of General Chemistry*. 2017;87(3):396–401. <https://doi.org/10.1134/S1070363217030069>

13. Deryagina EN, Levanova EP, Grabel'nykh VA, Sukhomazova EN, Russavskaya NV, Korchevin NA. Thiylation of polyelectrophiles with sulfur in hydrazine hydrate-amine systems. *Russian Journal of General Chemistry*. 2005;75(2):194–199. <https://doi.org/10.1007/s11176-005-0197-y>

14. Korchevin NA, Russavskaya NV, Alekminskaya OV, Deryagina EN. Reactions of Bielectrophiles (ClCH₂CH₂)₂Y with Sulfur in Basic Reducing Systems. *Russian Journal of General Chemistry*. 2002;72(2):240–243 <https://doi.org/10.1023/A:1015425702523>

2002;72(2):240–243 <https://doi.org/10.1023/A:1015425702523>

15. Vshivtsev VYu, Levanova EP, Grabel'nykh VA, Klyba LV, Zhanchipova ER, Sukhomazova EN, et al. Reactions of β,β'-dichlorodiethyl ether with elemental chalcogens and dimethyl dichalcogenides in the system hydrazine hydrate-base. *Russian Journal of Organic Chemistry*. 2008;(1):43–51. <https://doi.org/10.1007/s11178-008-1005-z>

16. Sorenson WR, Campbell TW. *Preparative methods of polymer chemistry*. New York–London, Interscience publ., 1961. (Russ. ed.: Serenson U, Kempbel T. *Preparativnye metody khimii polimerov*. Moscow: Izdatel'stvo inostrannoi literatury; 1963. 363 p.)

17. Khatashkeyev AV, Ignatova ON, Kaliyev AR, Levanova EP, Grabel'nykh VA, Sinegovskaya LM, et al. *The use of poly (3-oxapentylene disulfide) for the extraction of heavy metals from aqueous*. Patent RF, no. 2590537, 2015.

18. Rozentsveig IB, Nikonova VS, Korchevin NA. Chalcogenisation of unsaturated organohalogen compounds by elemental chalcogens and their metal derivatives. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2019;9(4):576–589. (In English) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-4-576-589>

19. Russavskaya NV, Levanova EP, Sukhomazova EN, Grabel'nykh VA, Klyba LV, Zhanchipova ER. Synthesis and oxidative cleavage of poly(trimethylene diselenides). *Russian Journal of General Chemistry*. 2006;76(2):229–234. <https://doi.org/10.1134/S1070363206020125>

20. Luthra NP, Odom JD. Nuclear magnetic resonance and electron spin resonance studies of organic selenium and tellurium compounds. In: Patai S, Rappoport Z (eds.). *The chemistry of selenium and tellurium compounds*. Vol. 1. New-York: John Wiley and Sons Ltd.; 1986. p.189–241.

21. Derbisher EV, Ovdienko EN, Gabitov RI, Derbisher VE, Chertkova MV. Water purification using polymeric hydrazides of carboxylic acids. *Vodoochistka*. 2011;6:17–22. (In Russian)

22. Redinova AV, Grabel'nykh VA, Levanova EP, Korchevin NA. Extraction of heavy metal ions from water solutions by sulfur-containing polymer sorbents. *Vestnik Irkutskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta = Proceedings of Irkutsk State Technical University*. 2013;1:113–116. (In Russian)

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Алтынникова Екатерина Евгеньевна,
аспирант,
Иркутский государственный университет
путей сообщения,
664074, г. Иркутск, ул. Чернышевского, 15,
Российская Федерация,
e-mail: altynnikova_ee@irgups.ru

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Ekaterina E. Altynnikova,
Postgraduate Student,
Irkutsk State Transport University,
15, Chernyshevsky St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
e-mail: altynnikova_ee@irgups.ru

Грабельных Валентина Александровна,
к.х.н., научный сотрудник,
Иркутский институт химии
им. А.Е. Фаворского СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Фаворского, 1,
Российская Федерация,
✉ e-mail: venk@irioch.irk.ru

Руссавская Наталья Владимировна,
д.х.н., доцент, профессор,
Иркутский государственный университет
путей сообщения.
664074, г. Иркутск, ул. Чернышевского, 15,
Российская Федерация,
e-mail: rusnatali64@yandex.ru

Синеговская Лидия Михайловна,
д.х.н., профессор,
ведущий научный сотрудник,
Иркутский государственный университет
путей сообщения.
664074, г. Иркутск, ул. Чернышевского, 15,
Российская Федерация,
e-mail: sinegovskaya@irioch.irk.ru

Абдикалыков Ерлан Нуржанулы,
магистрант, инженер,
Институт топлива, катализа и электрохимии
им. Д.В. Сокольского,
050010, г. Алматы, ул. Кунаева, 142,
Казахстан,
e-mail: y.abdikalykov@ifce.kz

Налибаева Арайлым Муратовна,
научный сотрудник,
Институт топлива, катализа и электрохимии
им. Д.В. Сокольского,
050010, г. Алматы, ул. Кунаева, 142,
Казахстан,
e-mail: a.nalibayeva@ifce.kz

Бишимбаева Гаухар Козыкеевна,
д.т.н., профессор, главный научный сотрудник,
Институт топлива, катализа и электрохимии
им. Д.В. Сокольского,
050010, г. Алматы, ул. Кунаева, 142,
Казахстан,
e-mail: g.bishimbayeva@ifce.kz

Розенцвейг Игорь Борисович,
д.х.н., доцент,
заместитель директора по научной работе,
Иркутский институт химии
им. А.Е. Фаворского СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Фаворского, 1,
Российская Федерация,
e-mail: i_roz@irioch.irk.ru

Valentina A. Grabel'nykh,
Cand. Sci. (Chemistry), Researcher,
A.E. Favorsky Irkutsk Institute
of Chemistry SB RAS,
1, Favorsky St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
✉ e-mail: venk@irioch.irk.ru

Natalya V. Russavskaya,
Dr. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Professor,
Irkutsk State Transport University,
15, Chernyshevsky St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
e-mail: rusnatali64@yandex.ru

Lidiya M. Sinegovskaya,
Dr. Sci. (Chemistry), Professor,
Leading Researcher,
A.E. Favorsky Irkutsk Institute
of Chemistry SB RAS,
1, Favorsky St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
e-mail: sinegovskaya@irioch.irk.ru

Yerlan N. Abdikalykov,
Master Student, Engineer,
D.V. Sokolsky Institute of Fuel, Catalysis
and Electrochemistry
142, Kunaeva St., Almaty, 050010,
Kazakhstan,
e-mail: y.abdikalykov@ifce.kz

Arailym M. Nalibayeva,
Researcher,
D.V. Sokolsky Institute of Fuel, Catalysis
and Electrochemistry
142, Kunaeva St., Almaty, 050010,
Kazakhstan,
e-mail: a.nalibayeva@ifce.kz

Gauhar K. Bishimbayeva,
Dr. Sci. (Engineering), Professor,
Chief Researcher,
D.V. Sokolsky Institute of Fuel, Catalysis
and Electrochemistry,
142, Kunaeva St., Almaty, 050010,
Kazakhstan,
e-mail: g.bishimbayeva@ifce.kz

Igor B. Rozentsveig,
Dr. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Deputy Director for Research,
A.E. Favorsky Irkutsk Institute
of Chemistry SB RAS,
1, Favorsky St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
e-mail: i_roz@irioch.irk.ru

Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

*Поступила в редакцию 23.09.2020.
Одобрена после рецензирования 04.11.2020.
Принята к публикации 28.02.2021.*

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

The final manuscript has been read and approved by all the co-authors.

*The article was submitted 23.09.2020.
Approved after reviewing 04.11.2020.
Accepted for publication 28.02.2021.*



Synthesis of grafted polybutyl acrylate copolymer on fish collagen

© Marina A. Uromicheva, Yulia L. Kuznetsova, Natalia B. Valetova,
Alexandr V. Mitin, Ludmila L. Semenycheva, Olga N. Smirnova

Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod,
Nizhny Novgorod, Russian Federation

Abstract: Increasingly, scientists are turning to the study of marine, or fish, collagen, which is increasingly replacing collagen of terrestrial animals, due to the fact that it is hypoallergenic, since it is 96% identical to human protein. Materials based on fish collagen have a number of advantages over their analogue of animal origin: it is not a carrier of infectious diseases of animals transmitted to humans, it has a greater structural similarity to human collagen, which provides a higher level of biocompatibility. Materials based on collagen copolymers with synthetic monomers are promising. The use of hybrid materials also helps to reduce the consumption of non-renewable natural resources. Synthesis of grafted collagen copolymers with polybutyl acrylate was carried out at azobisisobutyronitrile initiation and triethyl borane – oxygen system initiation under comparable conditions under intensive stirring of aqueous solution dispersion of collagen and butyl acrylate. After the synthesis, the aqueous and organic phases of the reaction mixture were analyzed by composition and molecular weight parameters using infrared spectroscopy and size-exclusion chromatography. Changes indicating the formation of a copolymer are observed in the copolymer isolated from the aqueous phase, more pronounced in the triethyl borane – oxygen system. It is assumed that the formation of copolymer macromolecules for azobisisobutyronitrile and organoelement initiator takes place according to different schemes. Schemes for the formation of copolymer macromolecules for AIBN and an organoelement initiator are proposed. Only polybutyl acrylate is present in the organic phase. Biological studies were carried out for fungal resistance and bactericidal activity of the obtained copolymers.

Keywords: collagen, triethyl borane, butyl acrylate, bactericidal properties, grafted copolymerization

Acknowledgement: The work was carried out on the equipment provided by New Materials and Resource-Saving Technologies Core Facilities Centre, Lobachevsky Nizhny Novgorod State University's R&D Chemistry Institute.

For citation: Uromicheva MA, Kuznetsova YL, Valetova NB, Mitin AV, Semenycheva LL, Smirnova ON. Synthesis of grafted polybutyl acrylate copolymer on fish collagen. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(1):16–25. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-16-25>

УДК 541.64:577.112.4

Синтез привитого сополимера полибутилакрилата на рыбный коллаген

М.А. Уромичева, Ю.Л. Кузнецова, Н.Б. Валетова,
А.В. Митин, Л.Л. Семеньева, О.Н. Смирнова

Нижегородский государственный университет им Н.И. Лобачевского,
Нижний Новгород, Российская Федерация

Резюме: Сегодня ученые все чаще обращаются к исследованию морского, или рыбного, коллагена, который уверенно вытесняет коллаген наземных животных, ввиду того что он является гипоаллергенным, так как на 96% идентичен человеческому белку. Материалы на основе рыбного коллагена имеют целый ряд преимуществ по сравнению с аналогом животного происхождения: он не является переносчиком инфекционных заболеваний животных, передающихся человеку; имеет большее структурное сходство с коллагеном человека, обеспечивающее более высокий уровень биосовместимости. Перспективны материалы на основе сополимеров коллагена с синтетическими мономерами. Использование гибридных материалов, кроме того, позволяет снизить потребление невозобновляемых природных ресурсов. Синтез привитого сополимера полибутилакрилата на коллаген проводили при иницировании динитрилом азоизомасляной кислоты и иницирующей системы триэтилборан–кислород в сравнимых условиях при интенсивном перемешивании

дисперсии водного раствора рыбного коллагена и бутилакрилата. После проведения синтеза водную и органическую фазу реакционной смеси анализировали по составу и молекулярно-массовым параметрам методами инфракрасной спектроскопии и гель-проникающей хроматографии. В выделенном из водной фазы сополимере наблюдались изменения, свидетельствующие об образовании сополимера, в случае системы триэтилборан–кислород более ярко выраженные. Выдвинуто предположение, что формирование макромолекул сополимера для динитрила азоизомасляной кислоты и элементарного органического инициатора проходит по разным схемам. Предложены схемы формирования макромолекул сополимера для динитрила азоизомасляной кислоты и элементарного органического инициатора. В выделенной органической фазе присутствует только полибутилакрилат. Также были проведены биологические исследования полученных сополимеров на фунгицидные свойства и бактерицидную активность.

Ключевые слова: коллаген, триэтилборан, бутилакрилат, бактерицидный полимер, привитая сополимеризация

Благодарности: Работа проводилась на оборудовании, предоставленном Центром коллективного пользования «Новые материалы и ресурсосберегающие технологии» Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского.

Для цитирования: Уромичева М.А., Кузнецова Ю.Л., Валетова Н.Б., Митин А.В., Семенычева Л.Л., Смирнова О.Н. Синтез привитого сополимера полибутилакрилата на рыбный коллаген. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2021. Т. 11. N 1. С. 16–25. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-16-25>

INTRODUCTION

The use of secondary resources of the food industry is an important task. Waste from the fishing industry: skin, fins, tail contains collagen [1, 2]. Materials based on fish collagen have a number of advantages compared to the analogue of animal origin: first of all, it is a greater structural similarity with human collagen, providing a higher level of biocompatibility [1, 3–5].

Hybrid materials with the inclusion of collagen and polymers of another nature are widely used in medicine [6, 7], pharmacy [8], cosmetology [9, 10]. To obtain copolymers of collagen and its denaturant – gelatin with synthetic monomers, radical initiators of various nature are most often used [11–13], including trialkyl borane [14–16]. Grafted copolymers [17] of polymethyl methacrylate and gelatin in aqueous dispersion were synthesized and characterized in the presence of tributyl borane and traces of oxygen. In terms of practical use, it is important that samples of the new material are biodecomposed, i.e. have the destruction prospect in the presence of microorganisms.

The aim of this work is the synthesis of grafted copolymer of polybutyl acrylate (PBA) with fish collagen in the presence of various initiators: azobisisobutyronitrile (AIBN) and the initiating triethyl borane (TEB) – oxygen system. The main task of the research is to determine the composition of grafted copolymers and molecular weight characteristics.

EXPERIMENTAL PART

Preparation of initial materials for the experiment. The initial collagen was isolated from cod skin in the form of acetic dispersion by the method [18].

Butyl acrylate (BA) for purification from the inhibitor was washed with 5% soda solution and then with distilled water to a neutral medium. The washed

butyl acrylate was dried with anhydrous sodium sulfate and further purified by vacuum distillation.

AIBN was purified from impurities by recrystallization of this initiator from alcohol solution. To do this, it was dissolved in ethyl alcohol at 40 °C in a water bath. The hot solution was filtered and then cooled to recrystallize AIBN. The laid-down crystals were dried in a vacuum at 25 °C.

To improve the safety of operation and storage, TEB was used in combination with hexamethylene diamine, which releases the initiator in the acidic reaction medium.

Fish collagen extraction method. Collagen was extracted from the cod skin, which was cleaned of scales, lumps of muscle tissue and fat, washed with distilled water, frozen. The raw cod skin was cleaned of scales, lumps of muscle tissue and fat, washed with water and frozen. Prepared and frozen raw material was crushed with scissors and placed in 3% acetic acid for a day at 25 °C, after which the resulting collagen dispersion was separated using a filter with a pore size of 1 µm from parts of the crushed fish skin and other impurities. We used the isolated aqueous solution of collagen in 3% acetic acid. The mass fraction of collagen in the resulting solution is 8%.

Method of butyl acrylate copolymer synthesis with collagen. Synthesis of collagen and butyl acrylate copolymers with both initiators was carried out, as follows. The mixture of aqueous 3% solution of collagen and butyl acrylate in a weight ratio of 1:1 was bubbled by argon for 15 minutes at room temperature and intensive stirring before synthesis. The initiator in amount of 1% from weight of collagen was added to mixture and quickly heated to 50 °C, without ceasing to stir intensively. The synthesis was carried out for 1 hour in an argon atmosphere. The organic phase was separated from the aqueous

layer by decantation. The copolymer is in the aqueous phase.

Method of composition determining of the aqueous phase of butyl acrylate copolymer with collagen. The composition of the obtained materials was studied using infrared (IR) spectroscopy. IR spectrophotometer "IRPrestige-21" manufactured by Shimadzu, Japan, was used to record IR spectra of absorption. Films on the KBr plate were prepared to record the IR spectrum. The spectra interpretation was carried out independently.

Method of composition determining of the organic phase of butyl acrylate copolymer with collagen. The organic layer of the synthesized copolymers was investigated in a chloroform solution by IR-Fourier-transform spectrophotometer Shimadzu FTIR-8400S in KBr cells with an optical path length of 0.26 mm in the wave number range 5500–550 cm^{-1} , the error in the determination did not exceed $\pm 0.05 \text{ cm}^{-1}$. The copolymer composition was determined using a calibration graph on the characteristic peak area of the analytical band at 1726 cm^{-1} , which corresponds to the presence of a carbonyl group. The proportion of butyl acrylate was calculated according to the intensity of this band.

The calibration curve was plotted in the absorption intensity (optical density) – concentration axes (Fig. 1) by absorption of poly methyl methacrylate (PMMA) solution. This method used MMA, not BA due to polybutyl acrylate is insoluble.

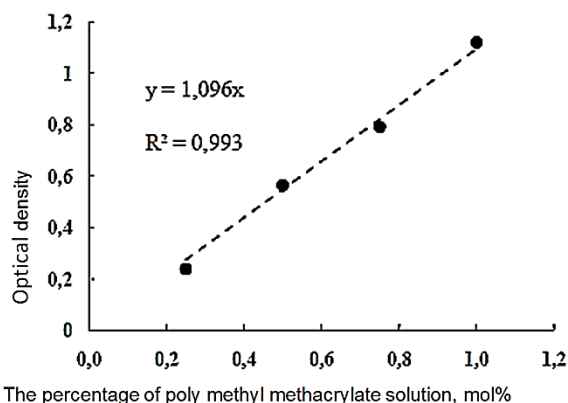


Fig. 1. Calibration curve for determining the copolymers composition

Рис. 1. Градуировочный график для определения состава сополимеров

Spectra of PMMA solutions in chloroform of precisely known concentration (0.2–1.0% PMMA) were integrated to plot the curve. Absorption intensity was determined by the "baseline" method [19]. The error in determining the concentration of fragments in the copolymer was $\pm 5\%$.

The calculation of PBA mass fraction in the copolymer organic layer was carried out according to the formula:

$$\omega(\text{BA}) = \frac{M(\text{BA})}{M(\text{MMA})} \times \frac{D}{1.095} \times \frac{m(\text{BA})}{m(\text{CHCl}_3)}, \text{ were.}$$

D is the optical density of polymethyl methacrylate, $M(\text{BA})$ is the molar mass of butyl acrylate, $m(\text{BA})$ is the mass of butyl acrylate, $M(\text{MMA})$ is the molar mass of methyl methacrylate, according to which the calibration graph was used, $m(\text{CHCl}_3)$ is the mass of chloroform in which the solution was prepared, 1.096 is the slope of the calibration curve.

The experiment showed that 100% PBA is formed in the organic layer when both initiators are used.

Analysis of molecular weight characteristics of the copolymer of butyl acrylate with collagen. The molecular weight characteristics of collagen and collagen-containing copolymers were studied by size-exclusion chromatography (SEC). This method is based on the molecule separation by volume sizes. Sample preparation was carried out by filtration using nozzle membranes Millipore Millex-LCR (PTFE 0.45 μm). To do this, a disposable syringe filled with a collagen aqueous solution was fitted with a nozzle membrane Millipore Millex-LCR and filtered at a rate of about 1.2 ml/min.

Method for determining fungal resistance and bactericidal activity. Tests for fungal resistance were carried out in accordance with GOST 9.049-91 "Unified system of corrosion and ageing protection. Polymer materials and their components. Methods of laboratory tests for mould resistance". Microscopic fungi, active destructors of polymeric materials, were used as test cultures: *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus oryzae*, *Chaetomium globosum*, *Paecilomyces variotium*, *Penicillium cyclospium*, *Penicillium funiculosum*, *Trichoderma viride*. Samples were placed in Petri dishes. Then the surface of the samples was inoculated with a suspension of micromycete spores and the Petri dishes with the samples were placed in a thermostat. The test duration is 28 days at a temperature of $29 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ and a humidity of more than 90%.

The bactericidal activity was determined in relation to the association of test cultures of bacteria: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*. The presence of bactericidal properties was assessed by the size of the zone of inhibition of bacterial growth around the test object placed on an agar MPA medium. Cultivation conditions – in a thermostat at $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Exposure time – 24 hours.

RESULTS AND DISCUSSION

In connection with stated objective, the synthesis of grafted collagen copolymers with PBA was carried out at the AIBN initiation and the TEB-oxygen initiating system under comparable conditions. After the synthesis, the resulting copolymer was separated by decantation into an organic viscous layer and a liquid aqueous layer. 100% of homopolybutyl acrylate was found in the viscous organic phase.

The IR spectra of the samples isolated from the aqueous phase for the studied initiators are shown in Fig. 2 and Fig. 3 in comparison with the IR spectra of collagen and PBA. For the sample from the reaction mixture using the AIBN initiator, as in the case of the TEB initiator, a change is observed compared to the IR spectra of the original collagen and PBA.

Molecular weight (MW) characteristics of samples with different initiators isolated from the aqueous phase are presented in the form of molecular weight distribution MWD curves (Fig. 4, 5) and MW values in Table.

The MWD curves for samples obtained under different conditions are offset with respect to the collagen MWD curve. In the case of copolymerization initiation by the TEB – oxygen system, this offset is more noticeable. Presumably this indicates a

greater proportion of PBA grafting to collagen when initiated by an organometallic initiator. These data are confirmed by the values of MW of grafted copolymer, obtained using the TEB – oxygen system: they are higher than the original collagen by a greater amount than in the case of AIBN.

The obtained data testify that BA grafting to collagen in the presence of the TEB – oxygen system is more visible than for AIBN. This may be due to the fact that both upon initiation with a metal-containing initiator and AIBN, grafting is carried out (2) due to the abstraction of a hydrogen atom by an active radical ($R\bullet$, $RO\bullet$) from a collagen macromolecule (1) by active radicals formed in the case of AIBN due to thermal decomposition of the initiator, or due to the oxidation of thermopile according to the known scheme [20].

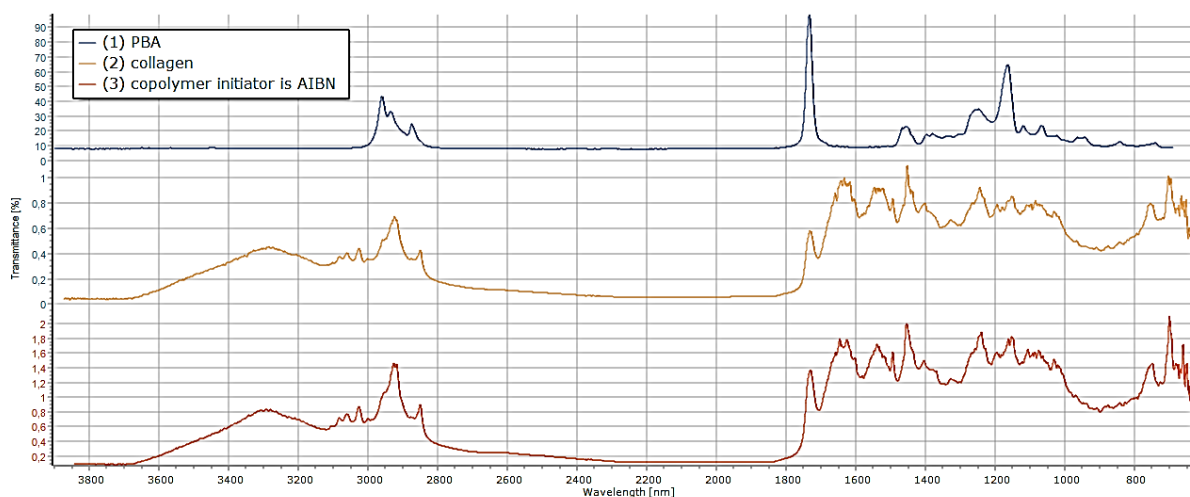


Fig. 2. Infrared spectra of collagen (1), collagen and BA copolymer initiated by azobisisobutyronitrile (2), and polybutyl acrylate (3)

Рис. 2. Инфракрасные спектры коллагена (1); сополимера, иницированного динитрилом азоизомасляной кислоты (2); полибутилакрилат (3)

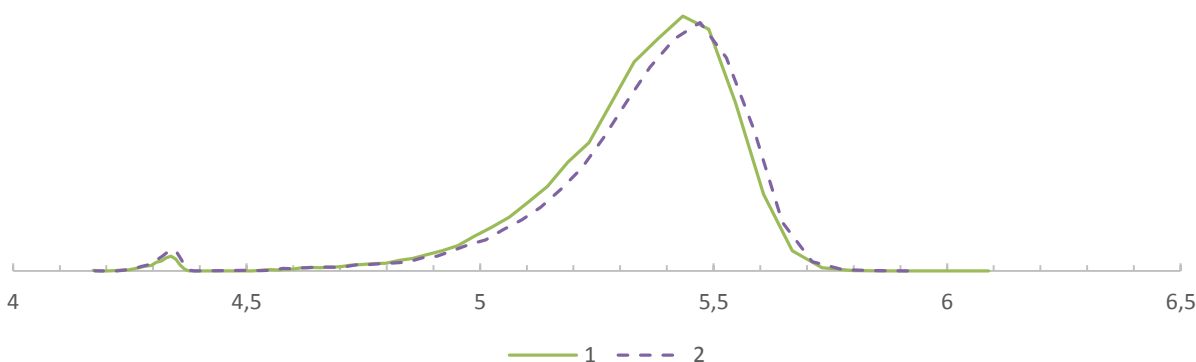


Fig. 3. Infrared spectra of collagen (1), collagen and BA copolymer initiated by the system triethyl borane – oxygen (2), and poly butyl acrylate (3)

Рис. 3. Инфракрасные спектры коллагена (1), сополимера, иницированного системой триэтилборан – кислород (2), и полибутилакрилат(3)

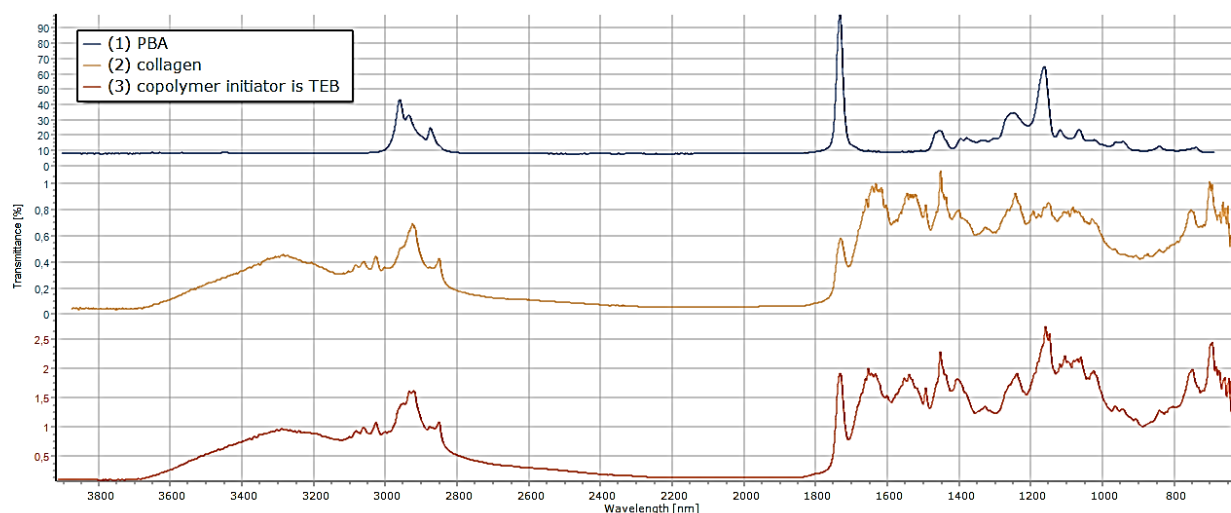


Fig. 4. Collagen (1) weight distribution and copolymer of collagen and butyl acrylate in the presence of azobisisobutyronitrile (2)

Рис. 4. Молекулярно-массовое распределение коллагена (1) и сополимера коллагена и бутилакрилата в присутствии динитрила азоизомасляной кислоты (2)

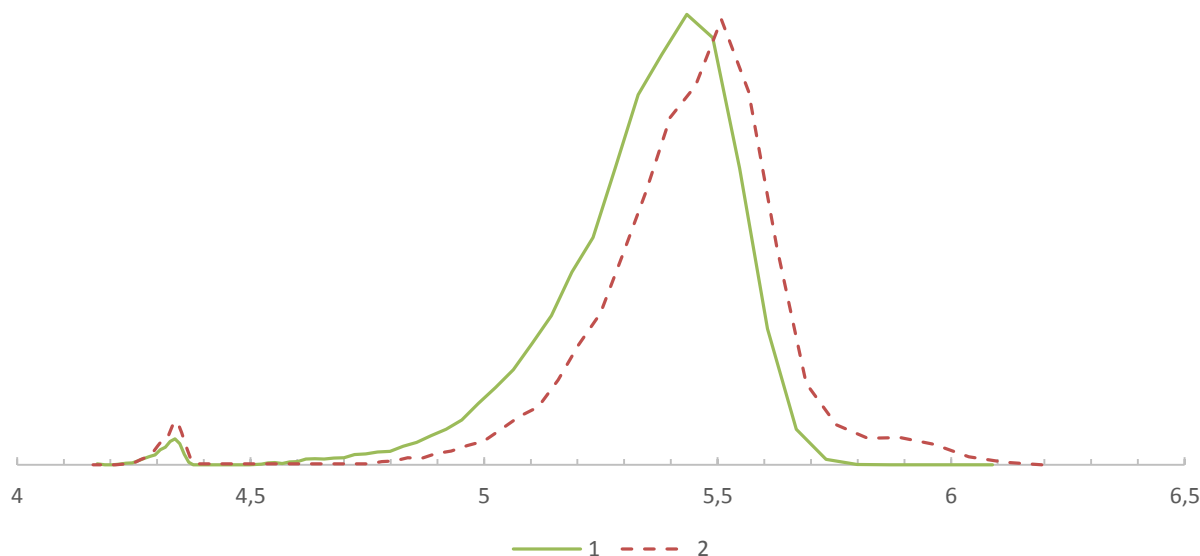


Fig. 5. Collagen (1) weight distribution and copolymer of collagen and BA in the presence of the system triethyl borane – oxygen (2)

Рис. 5. Молекулярно-массовое распределение коллагена (1) и сополимера коллагена и БА в присутствии системы триэтилборан – кислород (2)

Collagen molecular weight characteristics and copolymers of collagen and butyl acrylate in the presence of azobisisobutyronitrile and the system triethyl borane – oxygen

Молекулярно-массовые характеристики коллагена и сополимеров коллагена и бутилакрилата в присутствии динитрила азоизомасляной кислоты и системы триэтилборан – кислород

Polymer	MWD		
	$M_n \cdot 10^{-3}$	$M_w \cdot 10^{-3}$	M_w/M_n
Collagen	182	228	1.3
Copolymer with azobisisobutyronitrile initiator	189	238	1.3
Copolymer with the system triethyl borane – oxygen initiator	239	291	1.2

REFERENCES

1. Radhika Rajasree SR, Gobalakrishnan M, Aranganathan L, Karthih MG. Fabrication and characterization of chitosan based collagen gelatin composite scaffolds from big eye snapper *Priacanthus hamrur* skin for antimicrobial and anti oxidant applications. *Materials Science and Engineering: C*. 2020;107:110270. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110270>
2. Pattanaik SS, Sawant PB, Xavier KAM, Dube K, Srivastava PP, Dhanabalan V, et al. Characterization of carotenoprotein from different shrimp shell waste for possible use as supplementary nutritive feed ingredient in animal diets. *Aquaculture*. 2020;515: 734594. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734594>
3. Dale HF, Madsen L, Lied GA. Fish-derived proteins and their potential to improve human health. *Nutrition Reviews*. 2019;77(8):572–583. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuz016>
4. Eshar D, Wyre NR, Schoster JV. Use of collagen shields for treatment of chronic bilateral corneal ulcers in a pet rabbit. *Journal of Small Animal Practice*. 2011;52(7):380–383. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2011.01077.x>
5. Greenwald Y, Kleinmann G. Use of collagen shields for ocular-surface drug delivery. *Expert Review of Ophthalmology*. 2008;3(6):627–633. <https://doi.org/10.1586/17469899.3.6.627>
6. Fitzpatrick SD, Mazumber MAJ, Lasowski F, Fitzpatrick LE, Sheardown H. PNIPAAm-grafted-collagen as an injectable, in situ gelling cell delivery scaffold. *Biomacromolecules*. 2010;11(9):2261–2267. <https://doi.org/10.1021/bm100299j>
7. Ma Z, Gao C, Gong Y, Shen J. Cartilage tissue engineering PLLA scaffold with surface immobilized collagen and basic fibroblast growth factor. *Biomaterials*. 2005;26(11):1253–1259. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.04.031>
8. Muthukumar T, Sreekumar G, Sastry TP, Chamundeeswari M. Collagen as a potential biomaterial in biomedical applications. *Reviews on Advanced Materials Science*. 2018;53(1):29–39. <https://doi.org/10.1515/rams-2018-0002>
9. Khanna ND, Kaur I, Bhalla TC, Gautam N. Effect of biogradation on thermal and crystalline behavior of polypropylene-gelatin based copolymers. *Journal of Applied Polymer Science*. 2010;118(3): 1476–1488. <https://doi.org/10.1002/app.32434>
10. Bas O, de Juan-Pardo EM, Chhaya MP, Wunner FM, Jeon JE, Klein TJ, et al. Enhancing structural integrity of hydrogels by using highly organised melt electrospun fibre constructs. *European Polymer Journal*. 2015;72:451–463. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.07.034>
11. Ohya S, Matsuda T. Poly(N-iso-propylacrylamide) (PNIPAM)-grafted gelatin as thermoresponsive three-dimensional artificial extracellular matrix: Molecular and formulation parameters vs. cell proliferation potential. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2005;16(7):809–827. <https://doi.org/10.1163/1568562054255736>
12. Kojima K, Iguchi S, Kajima Y, Yoshikuni M. Grafting of methyl methacrylate onto collagen initiated by tributylborane. *Journal of Applied Polymer Science*. 1983;28(1):87–95. <https://doi.org/10.1002/app.1983.070280108>
13. Ollivier C, Renaud P. Organoboranes as a source of radicals. *Chemical Reviews*. 2001;101(11): 3415–3434. <https://doi.org/10.1021/cr010001p>
14. Fujisawa S, Yoshinori K. Tri-n-butylborane/watercomplex-mediated copolymerization of methyl methacrylate with proteinaceous materials and proteins: A review. *Polymers*. 2010;2(4):575–595. <https://doi.org/10.3390/polym2040575>
15. Mirviss SB. The air oxidation of trialkylboranes. *Journal of the American Chemical Society*. 1961;83(14):3051–3056. <https://doi.org/10.1021/ja01475a020>
16. Kuznetsova YuL, Abramova NA, Ludin DV. Synthesis of copolymers of methyl methacrylate and butyl vinyl ether in the presence of the system tributylboron – 2,5-di-tert-butyl-p-benzoquinone. *Bulletin of the South Ural State University. Ser. Chemistry*. 2016;8(1):26–33. <https://doi.org/10.14529/chem160104>
17. Kuznetsova YuL, Morozova EA, Vavilova AS, Markin AV, Smirnova ON, Zakharycheva NS, et al. Synthesis of biodegradable grafted copolymers of gelatin and polymethyl methacrylate. *Polymer Science. Series D*. 2020;13:453–459. <https://doi.org/10.1134/s1995421220040115>
18. Semenycheva LL, Astanina MV, Kuznetsova YuL, Valetova NB, Geraskina EV, Tarankova OA. A method for obtaining a vinegar dispersion of high molecular weight fish collagen. Patent RF, no. 2567171; 2014. (In Russian)
19. Zimmermann B, Baranović G. Thermal analysis of paracetamol polymorphs by FT-IR spectroscopies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2011;54(2):295–302. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.08.023>
20. Okamura H, Sudo A, Endo T. Generation of radical species on polypropylene by alkylborane-oxygen system and its application to graft polymerization. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*. 2009;48(22):6163–6167. <https://doi.org/10.1002/pola.23659>
21. Semenycheva LL, Matkivskaia YO, Valetova NB, Chasova YO, Peguev NL, Eloyan AL, et al. Specific features of “compensating” copolymerization of butyl acrylate with vinyl butyl ether in the presence of triethylboron. *Russian Chemical Bulletin*. 2017;66(9): 1660–1664. <https://doi.org/10.1007/s11172-017-1938-x>
22. Chung T-C, Janvikul W, Lu HL. A novel “stable” radical initiator based on the oxidation adducts of alkyl-9-BBN. *Journal of the American Chemical Society*. 1996;118(3):705–706. <https://doi.org/10.1021/ja9527737>

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rajasree S.R.R., Gobalakrishnan M., Aranganathan L., Karthih M.G. Fabrication and characterization of chitosan based collagen gelatin composite scaffolds from big eye snapper *Priacanthus hamrur* skin for antimicrobial and anti oxidant applications // *Materials Science and Engineering: C*. 2020. Vol. 107. 110270. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110270>
2. Pattanaik S.S., Sawant P.B., Xavier K.A.M., Dube K., Srivastava P.P., Dhanabalan V., et al. Characterization of carotenoprotein from different shrimp shell waste for possible use as supplementary nutritive feed ingredient in animal diets // *Aquaculture*. 2020. Vol. 515. 734594. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734594>
3. Dale H.F., Madsen L., Lied G.A. Fish-derived proteins and their potential to improve human health // *Nutrition Reviews*. 2019. Vol. 77. Issue 8. P. 572–583. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuz016>
4. Eshar D., Wyre N.R., Schoster J.V. Use of collagen shields for treatment of chronic bilateral corneal ulcers in a pet rabbit // *Journal of Small Animal Practice*. 2011. Vol. 52. Issue 7. P. 380–383. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2011.01077.x>
5. Greenwald Y., Kleinmann G. Use of collagen shields for ocular-surface drug delivery // *Expert Review of Ophthalmology*. 2008. Vol. 3. Issue 6. P. 627–633. <https://doi.org/10.1586/17469899.3.6.627>
6. Fitzpatrick S.D., Mazumber M.A.J., Lasowski F., Fitzpatrick L.E., Sheardown H. PNIPAAm-grafted-collagen as an injectable, in situ gelling cell delivery scaffold // *Biomacromolecules*. 2010. Vol. 11. Issue 9. P. 2261–2267. <https://doi.org/10.1021/bm100299j>
7. Ma Z., Gao C., Gong Y., Shen J. Cartilage tissue engineering PLLA scaffold with surface immobilized collagen and basic fibroblast growth factor // *Biomaterials*. 2005. Vol. 26. Issue 11. P. 1253–1259. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.04.031>
8. Muthukumar T., Sreekumar G., Sastry T.P., Chamundeeswari M. Collagen as a potential biomaterial in biomedical applications // *Reviews on Advanced Materials Science*. 2018. Vol. 53. Issue 1. P. 29–39. <https://doi.org/10.1515/rams-2018-0002>
9. Khanna N.D., Kaur I., Bhalla T.C., Gautam N. Effect of biogradation on thermal and crystalline behavior of polypropylene-gelatin based copolymers // *Journal of Applied Polymer Science*. 2010. Vol. 118. Issue 3. P. 1476–1488. <https://doi.org/10.1002/app.32434>
10. Bas O., de Juan-Pardo E.M., Chhaya M.P., Wunner F.M., Jeon J.E., Klein T.J., et al. Enhancing structural integrity of hydrogels by using highly organised melt electrospun fibre constructs // *European Polymer Journal*. 2015. Vol. 72. P. 451–463. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.07.034>
11. Ohya S., Matsuda T. Poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM)-grafted gelatin as thermorespon-
- sive three-dimensional artificial extracellular matrix: Molecular and formulation parameters vs. cell proliferation potential // *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2005. Vol. 16. Issue 7. P. 809–827. <https://doi.org/10.1163/1568562054255736>
12. Kojima K., Iguchi S., Kajima Y., Yoshikuni M. Grafting of methyl methacrylate onto collagen initiated by tributylborane // *Journal of Applied Polymer Science*. 1983. Vol. 28. Issue 1. P. 87–95. <https://doi.org/10.1002/app.1983.070280108>
13. Ollivier C., Renaud P. Organoboranes as a source of radicals // *Chemical Reviews*. 2001. Vol. 101. Issue 11. P. 3415–3434. <https://doi.org/10.1021/cr010001p>
14. Fujisawa S., Yoshinori K. Tri-n-butylborane/watercomplex-mediated copolymerization of methyl methacrylate with proteinaceous materials and proteins: A review // *Polymers*. 2010. Vol. 2. Issue 4. P. 575–595. <https://doi.org/10.3390/polym2040575>
15. Mirviss S.B. The air oxidation of trialkylboranes // *Journal of the American Chemical Society*. 1961. Vol. 83. Issue 14. P. 3051–3056. <https://doi.org/10.1021/ja01475a020>
16. Kuznetsova Yu.L., Abramova N.A., Ludin D.V. Synthesis of copolymers of methyl methacrylate and butyl vinyl ether in the presence of the system tributylboron – 2,5-di-tert-butyl-p-benzoquinone // *Bulletin of the South Ural State University. Ser. Chemistry*. 2016. Vol. 8. Issue 1. P. 26–33. <https://doi.org/10.14529/chem160104>
17. Kuznetsova Yu.L., Morozova E.A., Vavilova A.S., Markin A.V., Smirnova O.N., Zakharycheva N.S., et al. Synthesis of biodegradable grafted copolymers of gelatin and polymethyl methacrylate // *Polymer Science. Series D*. 2020. Vol. 13. P. 453–459. <https://doi.org/10.1134/s1995421220040115>
18. Пат. № 2567171, Российская Федерация. Способ получения уксусной дисперсии высокомолекулярного рыбьего коллагена / Л.Л. Семеньева, М.В. Астанина, Ю.Л. Кузнецова, Н.Б. Валетова, Е.В. Гераскина, Таранкова О.А.; патентообладатель ООО «Системы качества жизни»; заявл. 06.10.2014; опубл. 10.11.2015. Бюл. 31.
19. Zimmermann B., Baranović G. Thermal analysis of paracetamol polymorphs by FT-IR spectroscopies // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2011. Vol. 54. Issue 2. P. 295–302. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.08.023>
20. Okamura H., Sudo A., Endo T. Generation of radical species on polypropylene by alkylborane-oxygen system and its application to graft polymerization // *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*. 2009. Vol. 48. Issue 22. P. 6163–6167. <https://doi.org/10.1002/pola.23659>
21. Semenicheva L.L., Matkivskaia Y.O., Valetova N.B., Chasova Y.O., Pegeev N.L., Eloyan A.L., et al. Specific features of “compensating” copolymerization of butyl acrylate with vinyl butyl ether in the presence of triethylboron // *Russian Chemical*

Bulletin. 2017. Vol. 66. Issue 9. P. 1660–1664.
<https://doi.org/10.1007/s11172-017-1938-x>

22. Chung T.-C., Janvikul W., Lu H.L. A novel
“stable” radical initiator based on the oxidation ad-

ducts of alkyl-9-BBN // Journal of the American
Chemical Society. 1996. Vol. 118. Issue 3. P. 705–
706. <https://doi.org/10.1021/ja9527737>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Marina A. Uromicheva,
Undergraduate,
Lobachevsky State University
of Nizhny Novgorod,
23, Gagarin Ave., Nizhny Novgorod, 603022,
Russian Federation,
e-mail: kozinamarina1@yandex.ru

Yulia L. Kuznetsova,
Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Department of Organic Chemistry,
Lobachevsky State University
of Nizhny Novgorod,
23, Gagarin Ave., Nizhny Novgorod, 603022,
Russian Federation,
e-mail: kyul@yandex.ru

Natalia B. Valetova,
Cand. Sci. (Chemistry), Senior Scientist,
Laboratory of Petrochemistry,
Research Institute of Chemistry,
Lobachevsky State University
of Nizhny Novgorod,
23, Gagarin Ave., Nizhny Novgorod, 603022,
Russian Federation,
e-mail: nata-bor-2005@mail.ru

Alexandr V. Mitin,
Cand. Sci. (Chemistry),
Head of Laboratory of Chromatography,
Mass Spectroscopy and Elemental Analysis,
Research Institute of Chemistry,
Lobachevsky State University
of Nizhny Novgorod,
23, Gagarin Ave., Nizhny Novgorod, 603022,
Russian Federation,
e-mail: ckp@ichem.unn.ru

Ludmila L. Semenycheva,
Dr. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Head of Laboratory of Petrochemistry,
Research Institute of Chemistry,
Lobachevsky State University
of Nizhny Novgorod,
23, Gagarin Ave., Nizhny Novgorod, 603022,
Russian Federation,
✉ e-mail: llsem@yandex.ru

Olga N. Smirnova,
Cand. Sci. (Biology), Assistant Professor,
Senior Scientist,
Laboratory of Microbiological analysis,
Research Institute of Chemistry,

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Уромичева Марина Алексеевна,
магистрант,
Нижегородский государственный университет
им. Н.И. Лобачевского,
603022, г. Нижний Новгород, пр-т Гагарина, 23,
Российская Федерация,
e-mail: kozinamarina1@yandex.ru

Кузнецова Юлия Леонидовна,
к.х.н., доцент кафедры органической химии,
Нижегородский государственный университет
им. Н.И. Лобачевского,
603022, г. Нижний Новгород, пр-т Гагарина, 23,
Российская Федерация,
e-mail: kyul@yandex.ru

Валетова Наталья Борисовна,
к.х.н., старший научный сотрудник
лаборатории нефтехимии,
Научно-исследовательский институт химии,
Нижегородский государственный университет
им. Н.И. Лобачевского,
603022, г. Нижний Новгород, пр-т Гагарина, 23,
Российская Федерация,
e-mail: nata-bor-2005@mail.ru

Митин Александр Вячеславович,
к.х.н., заведующий лабораторией
хроматографии, масс-спектрометрии
и элементного анализа,
Научно-исследовательский институт химии,
Нижегородский государственный университет
им. Н.И. Лобачевского,
603022, г. Нижний Новгород, пр-т Гагарина, 23,
Российская Федерация,
e-mail: ckp@ichem.unn.ru

Семеньева Людмила Леонидовна,
д.х.н., доцент,
заведующая лабораторией нефтехимии,
Научно-исследовательский институт химии,
Нижегородский государственный университет
им. Н.И. Лобачевского,
603022, г. Нижний Новгород, пр-т Гагарина, 23,
Российская Федерация,
✉ e-mail: llsem@yandex.ru

Смирнова Ольга Николаевна,
к.б.н., доцент, старший научный сотрудник
лаборатории микробиологического анализа,
Научно-исследовательский институт химии,
Нижегородский государственный университет

Lobachevsky State University
of Nizhny Novgorod,
23, Gagarin Ave., Nizhny Novgorod, 603022,
Russian Federation,
e-mail: protectfun@mail.ru

им. Н.И. Лобачевского,
603022, г. Нижний Новгород, пр-т Гагарина, 23,
Российская Федерация,
e-mail: protectfun@mail.ru

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests re-
garding the publication of this article.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

*The final manuscript has been read and approved
by all the co-authors.*

*Все авторы прочитали и одобрили оконча-
тельный вариант рукописи.*

*The article was submitted 15.01.2021.
Approved after reviewing 26.02.2021.
Accepted for publication 28.02.2021.*

*Поступила в редакцию 15.01.2021.
Одобрена после рецензирования 26.02.2021.
Принята к публикации 28.02.2021.*

Оригинальная статья / Original article

УДК 543.241.8

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-26-33>



Применение логарифмических диаграмм при оценке равновесных концентраций всех частиц в кислотно-основной системе

© Б.Б. Танганов

Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления,
г. Улан-Удэ, Российская Федерация

Резюме: До недавнего времени равновесные концентрации в кислотно-основных системах ввиду отсутствия иных приемлемых подходов изучались с привлечением метода измерения лишь pH раствора. В отношении неводных растворов данный метод не может быть использован. Известно, что на ионную силу раствора, являющуюся основополагающей составляющей при оценке коэффициента активности и термодинамической константы диссоциации электролита, оказывают влияние присутствующие в системе ионы, концентрация которых переменна в процессе взаимодействия в водных и в более сложных неводных растворах, значительно отличающихся своими физико-химическими свойствами (температура кипения, строение, диэлектрическая проницаемость, константа автопротолиза, сольватирующая способность, дипольный момент, вязкость и др.). Между тем для более объективных, более обоснованных оценок кислотно-основных взаимодействий помимо активности ионов водорода требуется корректный учет равновесных концентраций всех частиц в растворе, влияющих на ионную силу раствора. На основании известных закона действующих масс и уравнений, выражающих равновесные процессы, ионное произведение растворителя, электронейтральность и материальный баланс в растворе, выведены соответствующие уравнения и предложен метод, позволяющий учесть влияние концентраций всех частиц в системе (не только ионов водорода – pH), в немалой степени влияющих на свойства кислотно-основной равновесной системы. Данный метод также позволяет выразить зависимость равновесных концентраций всех участников процесса от состояния среды (исследуемого раствора), определяемой разными химическими и инструментальными методами в логарифмических координатах, дающих возможность непосредственной оценки равновесных концентраций всех присутствующих в системе частиц.

Ключевые слова: кислотно-основные системы, равновесные концентрации всех частиц, логарифмическая диаграмма, дифференцирующий растворитель, ацетон

Для цитирования: Танганов Б.Б. Применение логарифмических диаграмм при оценке равновесных концентраций всех частиц в кислотно-основной системе. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2021. Т. 11. N 1. С. 26–33. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-26-33>

The application of logarithmic charts when evaluating the equilibrium concentrations of all particles in acid-base systems

Boris B. Tanganov

East Siberian State University of Technology and Management,
Ulan-Ude, Russian Federation

Abstract: Until recently, due to the absence of other suitable approaches, equilibrium concentrations in acid-base systems have been studied exclusively by measuring the pH of a solution. However, this method cannot be used for organic (non-aqueous) solvent solutions. It is known that the ionic strength of a solution, which is a fundamental component in assessing the activity coefficient and the thermodynamic dissociation constant of an electrolyte, is influenced by the ions present in the system. The concentration of these ions is variable during interactions in aqueous and more complex non-aqueous solutions, which differ significantly in their physicochemical properties (boiling temperature, structure, permittivity, autoprotolysis constant, solvating ability, dipole moment, viscosity, etc.). Meanwhile, in order to obtain more objective and valid estimates of acid-base interactions, in addition to the activity of hydrogen ions, appropriate account should be taken of the equilibrium concentrations of all particles in the solution, which affect its ionic strength. In this article, on

the basis of the law of mass action and equations describing equilibrium processes, the ionic product of a solvent, electrical neutrality and material balance in a solution, the corresponding equations were derived and a method was proposed for considering the effect of the concentrations of all particles in the system (not only hydrogen ions – pH), significantly affecting the properties of acid-base equilibrium systems. The proposed method can also be used to obtain the dependence of the equilibrium concentrations of all process substances on the state of the medium (test solution), determined by various chemical and instrumental methods in logarithmic coordinates, which makes it possible to directly assess the equilibrium concentrations of all particles present in the system.

Keywords: acid-base systems, equilibrium concentrations of all particles, logarithmic chart, differentiating solvent, acetone

For citation: Tanganov BB. The application of logarithmic charts when evaluating the equilibrium concentrations of all particles in acid-base systems. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(1):26–33. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-26-33>

ВВЕДЕНИЕ

Целью исследования являлось: изучение поведения двухкомпонентной смеси в дифференцирующем растворителе (ацетон) в отличие от нивелирующего (например, вода); разработка модели оценки равновесных концентраций всех частиц в системе с привлечением логарифмических диаграмм «активность ионов лиония – величины равновесных концентраций компонентов смеси»; определение термодинамических констант диссоциации хлороводородной и хлоруксусной кислот при совместном присутствии в растворе.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Методом потенциометрического титрования построена интегральная кривая смеси хлороводородной и хлоруксусной кислот, соответствующая раздельной нейтрализации обеих кислот с константами диссоциации, отличающимися достаточной разницей в рК ($\Delta pK > 3$). Построена логарифмическая диаграмма для непосредственной оценки равновесных концентраций частиц в любой точке титрования и проследить за динамикой их изменения [1].

В водных растворах pH среды можно измерить напрямую с помощью стеклянного электрода. В среде органического растворителя такое невозможно, поэтому для измерения активности ионов лиония применяют более сложный электрометрический метод, основанный на предварительной оценке стандартного потенциала по измерению электродвижущей силы (ЭДС) цепи без переноса [2–4]:

Стеклянный электрод/ $\text{HClO}_4/\text{AgCl}/\text{Ag}$. (I)

Измерения ЭДС и потенциометрическое титрование в среде ацетона осуществляли при

$25,0 \pm 0,2$ °C на pH-метре-милливольтметре Metrohm-632 (Швейцария). Водородная (вернее, лиониевая) функция стеклянного электрода проверена в широком диапазоне $p\alpha(\text{ROH}^+)$ методом¹, основанном на измерении pH (или E , V в зависимости от природы растворителя) в ряде буферных растворов от сильноокислой до сильноосновной среды с сохранением градиента с угловым коэффициентом $59\text{ мВ}/\lg \alpha(\text{H}^+)$ при 25 °C. Растворитель очищен и обезвожен по известным методикам [5]. Содержание воды, определенное модифицированным методом К. Фишера², не превышало для ацетона $\pm 0,05\%$ масс.

ЭДС исследуемой цепи (I) без переноса описывается следующим уравнением [2–4]:

$$E = E_0 - (2,3 \cdot RT/zF) \cdot \lg \alpha(\text{H}^+) \cdot \alpha(\text{A}^-), \quad (1)$$

где E_0 – стандартный потенциал цепи без переноса (I); $\alpha(\text{H}^+)$ – активность сольватированного протона (лиония H_2ClO_4^+); $\alpha(\text{A}^-)$ – активность сольватированного аниона – лиата (перхлоратионов). Активности лиония, лиата и недиссоциированных молекул упрощены и представлены в разбавленных растворах в виде концентраций.

В табл. 1 приведены данные измерения ЭДС цепи (I) в среде ацетона (E , V) в зависимости от молярной концентрации хлорной кислоты m , а также результаты оценки степени диссоциации HClO_4 (α) и исходные величины (E') для расчета стандартного потенциала цепи, I [2, 3].

Степень диссоциации хлорной кислоты α может быть оценена по уравнению (1), а также по приведенному ниже [2, 3]:

$$\lg(1 - \alpha) = (E_0^* - E_{\text{изм}} + \theta \lg m) / \theta. \quad (2)$$

¹Танганов Б.Б., Алдарова Н.Ш., Батлаев К.Е. Исследование водородной функции стеклянного электрода // Труды ИЕН БФ СО АН СССР. 1977. Вып. 14. С. 150–155.

²Танганов Б.Б. Биамперометрическое определение содержания воды в неводных растворителях – модифицированный метод К. Фишера // Химия и химическая технология: сб. ст. С. 46–50. (Рукопись депонирована в ОНИИТЭХИМ: Черкассы. 1984. № 976хп-Д84).

Таблица 1. Изменение электродвижущей силы цепи (I) в зависимости от молярной концентрации хлорной кислоты (m , моль $\text{HClO}_4/1000$ г ацетона) и данные для определения E_0 цепи (I)

Table 1. Change in the electromotive force of the chain (I) depending on the mole concentration of perchloric acid (m , mol $\text{HClO}_4/1000$ g of acetone) and data for determining the E_0 of the chain (I)

m	E , В	$\alpha(\text{HClO}_4)$	$-0,0595 \cdot \lg(m\alpha)$	$(m\alpha)^{0,5}$	E'
0,0243750	0,523	0,9265	-0,09795	0,1503	0,6209
0,0121875	0,518	0,9554	-0,11506	0,1079	0,6331
0,0060937	0,514	0,9740	-0,13250	0,0770	0,6465
0,0030468	0,509	0,9842	-0,15012	0,0547	0,6591
0,0015234	0,504	0,9904	-0,16787	0,0388	0,6719
0,0007617	0,496	0,9935	-0,18570	0,0275	0,6817

Величина E_0^* , равная разности $E_0 - \theta pK_a(\text{HClO}_4) = E_0^*$ (где $\theta = 2,3 \cdot RT/F$), определена по авторской компьютерной программе по зависимости $E_{\text{изм}} = f(\lg m)$ при $\lg m\alpha = 0$. Получена величина $E_0^* = 0,5515$ с коэффициентом регрессии $r = 0,9936$ [6].

Значение стандартного потенциала цепи (I) определено по приближению функции $E' = f(m\alpha)^{0,5}$ (см. табл. 1) при $(m\alpha) = 0$, где

$$E' = E_{\text{изм}} + \theta \lg(m\alpha).$$

$$E' = -14,876 \cdot (m\alpha)^{3/2} + 6,8269 \cdot (m\alpha) - 1,3006 \cdot (m\alpha)^{0,5} + 0,7042$$

$$r = 0,9999.$$

Таким образом, получена величина стандартного потенциала цепи (I) E_0 в среде ацетона, равная 0,7042 В. Также отметим, что показатель константы диссоциации хлорной кислоты в ацетоне, оцененный по известному уравнению Нернста, равен:

$$pK_a(\text{HClO}_4) = (0,7042 - 0,5515) / 0,0595 = 2,566.$$

Растворитель относится к дифференцирующим, если в его среде компоненты смеси отличаются по показателям констант диссоциации на более чем на 3 порядка [3, 4].

В последнее время для анализа и построения кривых титрования все чаще применяются расчетные и модельные представления и разного рода приближения [7–9]. Кроме того, некоторые исследователи для расчетов применяют компьютерное моделирование при оценке кислотно-основных равновесий [10–12], при построении интегральных и дифференциальных кривых титрования [13–15].

На рис. 1 представлена интегральная кривая титрования 20 мл смеси 0,0155 н. хлороводородной (приготовленной насыщением ацетона сухим хлористым водородом) и 0,02085 н. хлорсусной кислот 0,06151 н. гидроксидом тетрабутиламмония (ГБА) в среде ацетона.

Как видно из рис. 1, кривая характеризуется наличием двух скачков потенциала, соответствующих раздельной нейтрализации кислот HCl ($V_{\text{э}1} = 2,52$ мл) и ClCH_2COOH ($V_{\text{э}2} = 5,91$ мл).

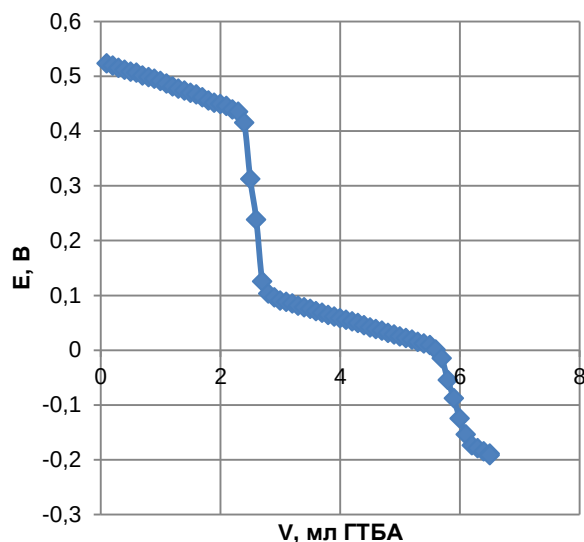


Рис. 1. Кривая титрования 20 мл смеси кислот HCl + ClCH_2COOH раствором гидроксида тетрабутиламмония в среде ацетона

Fig. 1. Titration curve of 20 ml mixture of HCl + ClCH_2COOH acids with tetrabutylammonium hydroxide in acetone medium

В табл. 2 приведены данные потенциометрического титрования HCl и ClCH_2COOH раствором ГБА. В последующем по уравнению $a(\text{H}_2\text{M}^+) = 10^{(E_{\text{изм}} - E_0)/\theta}$ [2] рассчитывается активность ионов лиония $a(\text{H}_2\text{M}^+)$ (колонка 3 табл. 2). В колонках 5–8 табл. 2 приведены значения ионной силы и соответствующие коэффициенты активности, а в колонках 9 и 10 – рассчитанные константы диссоциации обеих кислот.

Математическая обработка данных, представленных в колонках 9 и 10 табл. 2 (по 65 значениям), приводит к показателям термодинамических констант диссоциации кислот HCl и ClCH_2COOH : $pK_1 = 4,634$, $pK_2 = 12,040$ (средние из 65 значений).

Наличие двух последовательных скачков нейтрализации обеих кислот, разность $\Delta pK = 12,040 - 4,634 = 7,406$, значительно превышающая 3,000 свидетельствует о дифференцирующем свойстве ацетона (см. рис. 1).

Вывод уравнений для определения концентраций $\lg[\text{HA}]$, $\lg[\text{A}]$, $\lg[\text{H}_2\text{A}]$, $\lg[\text{A}^{2-}]$ двухкомпонентной смеси рассмотрен в работе [1], коэффициенты активности рассчитаны по известному уравнению Дэвиса.

Таблица 2. Результаты титрования 20 мл смеси 0,0155 н. HCl ($V_{\Sigma} = 2,52$ мл) и 0,02085 н. ClCH_2COOH ($\text{HA}_1 + \text{HA}_2$) в ацетоне 0,06151 н. раствором ГБА и данные для оценки показателей термодинамических констант компонентов смеси

Table 2. Results of titration of 20 ml of the mixture 0.0155 n. HCl ($V_{\Sigma} = 2.52$ ml) and 0.02085 n. ClCH_2COOH ($\text{HA}_1 + \text{HA}_2$) in acetone with 0.06151 n. HBTA solution and data for evaluating the thermodynamic constants of the mixture components

V , мл ГБА/ ацетон	$E_{\text{изм}}$, В	$a(\text{H}_2\text{M}^+)$	$pa(\text{H}_2\text{M}^+)$	$I(\text{A}^-)$	$I(\text{A}_2^{--})$	$\lg f_1$	$\lg f_2$	pK_1 (уравн. (7))	pK_2 (уравн.(8))
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0,1	0,523	0,000849	3,071186	0,03760	1,0829E-05	-0,60292	-0,60299	4,412920	11,62309
0,2	0,519	0,000726	3,138983	0,04065	1,1053E-05	-0,62289	-0,62296	4,432889	11,69306
0,3	0,515	0,000621	3,206780	0,04395	1,1950E-05	-0,64338	-0,64345	4,453383	11,71355
0,4	0,511	0,000531	3,274576	0,04752	1,2920E-05	-0,66441	-0,66448	4,474405	11,73458
0,5	0,508	0,000473	3,325424	0,05039	1,3699E-05	-0,68052	-0,68060	4,490522	11,75070
0,6	0,506	0,000437	3,359322	0,05239	1,4244E-05	-0,69143	-0,69151	4,501434	11,76161
0,7	0,501	0,000360	3,444068	0,05776	1,5704E-05	-0,7193	-0,71938	4,529303	11,78948
0,8	0,498	0,000320	3,494915	0,06124	1,6651E-05	-0,73643	-0,73651	4,546429	11,80661
0,9	0,495	0,000285	3,545763	0,06494	1,7655E-05	-0,75386	-0,75394	4,563861	11,82404
1,0	0,491	0,000243	3,613559	0,07021	1,9088E-05	-0,77758	-0,77766	4,587579	11,84776
1,1	0,486	0,000200	3,698305	0,07740	2,1044E-05	-0,80799	-0,80808	4,617991	11,87818
1,2	0,481	0,000165	3,783051	0,08534	2,3201E-05	-0,83925	-0,83934	4,649253	11,90944
1,3	0,477	0,000141	3,850847	0,08803	2,5085E-05	-0,84937	-0,84946	4,659371	11,91956
1,4	0,473	0,000121	3,918644	0,08803	2,7121E-05	-0,84937	-0,84947	4,659371	11,91957
1,5	0,469	0,000103	3,986441	0,08803	2,9323E-05	-0,84937	-0,84948	4,659371	11,91958
1,6	0,466	9,18E-05	4,037288	0,08803	3,1091E-05	-0,84937	-0,84949	4,659371	11,91959
1,7	0,461	7,55E-05	4,122034	0,08803	3,4277E-05	-0,84937	-0,84950	4,659371	11,91960
1,8	0,455	5,97E-05	4,223729	0,08803	3,8534E-05	-0,84937	-0,84951	4,659371	11,91961
1,9	0,451	5,11E-05	4,291525	0,08803	4,1663E-05	-0,84937	-0,84953	4,659371	11,91963
2,0	0,449	4,73E-05	4,325424	0,08803	4,3321E-05	-0,84937	-0,84953	4,659371	11,91963
2,1	0,445	4,04E-05	4,39322	0,08803	4,6838E-05	-0,84937	-0,84955	4,659371	11,91965
2,2	0,439	3,2E-05	4,494915	0,08803	5,2655E-05	-0,84937	-0,84957	4,659371	11,91967
2,3	0,435	2,74E-05	4,562712	0,08803	5,6930E-05	-0,84937	-0,84958	4,659371	11,91968
2,4	0,415	1,25E-05	4,901695	0,08803	8,4107E-05	-0,84937	-0,84968	4,659371	11,91978
2,5	0,312	2,25E-07	6,647458	0,08803	0,0006276	-0,84937	-0,85170	4,659371	11,92180
2,6	0,238	1,25E-08	7,901695	0,08803	0,0026597	-0,84937	-0,85916	4,659371	11,92926
2,7	0,125	1,52E-10	9,816949	0,08803	0,02412457	-0,84937	-0,93128	4,659371	12,00138
2,8	0,103	6,46E-11	10,18983	0,08803	0,0370595	-0,84937	-0,96987	4,659371	12,03997
2,9	0,096	4,92E-11	10,30847	0,08803	0,0424837	-0,84937	-0,98516	4,659371	12,05526
3,0	0,090	3,89E-11	10,41017	0,08803	0,0477606	-0,84937	-0,99957	4,659371	12,06967
3,1	0,088	3,6E-11	10,44407	0,08803	0,0496613	-0,84937	-1,00465	4,659371	12,07475
3,2	0,085	3,2E-11	10,49492	0,08803	0,0526553	-0,84937	-1,01255	4,659371	12,08265
3,3	0,081	2,74E-11	10,56271	0,08803	0,0569299	-0,84937	-1,02361	4,659371	12,09371
3,4	0,078	2,43E-11	10,61356	0,08803	0,0603621	-0,84937	-1,03231	4,659371	12,10241
3,5	0,075	2,17E-11	10,66441	0,08803	0,0640012	-0,84937	-1,04136	4,659371	12,11146
3,6	0,071	1,85E-11	10,7322	0,08803	0,0691969	-0,84937	-1,05399	4,659371	12,12409
3,7	0,068	1,65E-11	10,78305	0,08803	0,0733686	-0,84937	-1,0639	4,659371	12,13400
3,8	0,064	1,41E-11	10,85085	0,08803	0,0793247	-0,84937	-1,07771	4,659371	12,14781
3,9	0,061	1,25E-11	10,90169	0,08803	0,0841070	-0,84937	-1,08851	4,659371	12,15861
4,0	0,058	1,12E-11	10,95254	0,08803	0,0891776	-0,84937	-1,09971	4,659371	12,16981
4,1	0,055	9,92E-12	11,00339	0,08803	0,0945540	-0,84937	-1,11131	4,659371	12,18141
4,2	0,052	8,83E-12	11,05424	0,08803	0,1002544	-0,84937	-1,12332	4,659371	12,19342
4,3	0,049	7,85E-12	11,10508	0,08803	0,1021021	-0,84937	-1,12715	4,659371	12,14705
4,4	0,045	6,72E-12	11,17288	0,08803	0,1021021	-0,84937	-1,12715	4,659371	12,19705
4,5	0,041	5,75E-12	11,24068	0,08803	0,1021021	-0,84937	-1,12715	4,659371	12,19705
4,6	0,038	5,11E-12	11,29153	0,08803	0,1021021	-0,84937	-1,12715	4,659371	12,19705
4,7	0,035	4,55E-12	11,34237	0,08803	0,1021021	-0,84937	-1,12715	4,659371	12,19705
4,8	0,031	3,89E-12	11,41017	0,08803	0,1021021	-0,84937	-1,12715	4,659371	12,19705
4,9	0,028	3,46E-12	11,46102	0,08803	0,1021021	-0,84937	-1,12715	4,659371	12,19705
5,0	0,025	3,08E-12	11,51186	0,08803	0,1021021	-0,84937	-1,12715	4,659371	12,19705
5,1	0,022	2,74E-12	11,56271	0,08803	0,1021021	-0,84937	-1,12715	4,659371	12,19705
5,2	0,019	2,43E-12	11,61356	0,08803	0,1021021	-0,84937	-1,12715	4,659371	12,19705
5,3	0,015	2,08E-12	11,68136	0,08803	0,1021021	-0,84937	-1,12715	4,659371	12,19705
5,4	0,012	1,85E-12	11,73220	0,08803	0,1021021	-0,84937	-1,12715	4,659371	12,19705
5,5	0,009	1,65E-12	11,78305	0,08803	0,1021021	-0,84937	-1,12715	4,659371	12,19705
5,6	-0,015	6,46E-13	12,18983	0,08803	0,1021021	-0,84937	-1,12715	4,659371	12,19705
5,7	-0,065	9,18E-14	13,03729	0,08803	0,1021021	-0,84937	-1,12715	4,659371	12,19705
5,8	-0,115	1,30E-14	13,88475	0,08803	0,1021021	-0,84937	-1,12715	4,659371	12,19705
5,9	-0,195	5,75E-16	15,24068	0,08803	0,1021021	-0,84937	-1,12715	4,659371	12,19705

6,0	-0,244	8,49E-17	16,07119	0,08803	0,1021021	-0,84937	-1,12715	4,659371	12,19705
6,1	-0,259	4,73E-17	16,32542	0,08803	0,1021021	-0,84937	-1,12715	4,659371	12,19705
6,2	-0,265	3,74E-17	16,42712	0,08803	0,1021021	-0,84937	-1,12715	4,659371	12,19705
6,3	-0,285	1,71E-17	16,76610	0,08803	0,1021021	-0,84937	-1,12715	4,659371	12,19705
6,4	-0,298	1,03E-17	16,98644	0,08803	0,1021021	-0,84937	-1,12715	4,659371	12,19705
6,5	-0,303	8,49E-18	17,07119	0,08803	0,1021021	-0,84937	-1,12715	4,659371	12,19705

Логарифмическая диаграмма дает значения равновесных концентраций всех компонентов кислотно-основной системы в зависимости от $-\lg a(H^+)$ и этим выгодно отличается от представления интегральной кривой [7–9], не позволяющей оценить равновесные концентрации частиц [16–22].

Кривые (ряды), приведенные на диаграмме $-\lg a(H^+)$ – C (рис. 2), построены на основании уравнений, в которых концентрации C_{HA} и C_{A^-} являются функцией $-\lg a(H^+)$ (косвенно – величинами $E_{изм}$). При решении их относительно C_{HA} и затем относительно C_{A^-} получают следующие уравнения [1]:

$$C_{HA} = C_0 C_H^+ / (C_H^+ + K_a) = C_0 / (1 + K_a / C_H^+) = C_0 / [1 + 10^{(pH - pK_a)}]; \quad (3)$$

$$C_{A^-} = C_0 K_a / (C_H^+ + K_a) = C_0 / (1 + C_H^+ / K_a) = C_0 / [1 + 10^{(pK_a - pH)}]. \quad (4)$$

Логарифмирование уравнения (3) приводит к уравнению следующего вида:

$$\lg C_{HA} = \lg C_0 - \lg [1 + 10^{(pH - pK_a)}], \quad (5)$$

а уравнения (4) – к выражению

$$\lg C_{A^-} = \lg C_0 - \lg [1 + 10^{(pK_a - pH)}]. \quad (6)$$

Представленная на рис. 1 интегральная кривая титрования смеси двух кислот [6–8] преобразована в логарифмическую диаграмму, которая дает возможность оценить равновесные концентрации частиц $[HCl]$, $[Cl^-]$, $[ClCH_2COOH]$, $[ClCH_2COO^-]$ (уравнения (3)–(6)) во всем диапазоне изменения $p a(H_2M^+)$ – иона лиония. Кроме того, уравнения (5) и (6) с учетом ионной силы и коэффициентов активности по Дэвису могут быть преобразованы для расчетов термодинамических констант диссоциации рассматриваемых кислот в следующие уравнения:

$$pK_1 = pK_{HCl} = p a(H_2M^+) - \lg C_{A1^-} - \lg f_{A^-} + \lg C_0 \quad (7)$$

$$pK_2 = pK_{ClCH_2COOH} = p a(H_2M^+) - \lg C_{A2^-} + \lg f_{A1^-} + \lg C_0 \quad (8)$$

Обычно стандартные электрометрические и другие методы определения констант диссоциации ограничены буферной областью от 25 до 75% нейтрализации [7, 13–19]. Рассчитанные по разработанным уравнениям (6), (7) и (8) величины показателей констант диссоциации $pK_{1,2}$ во

всем диапазоне титрования внесены в колонки 9 и 10 (см. табл. 2).

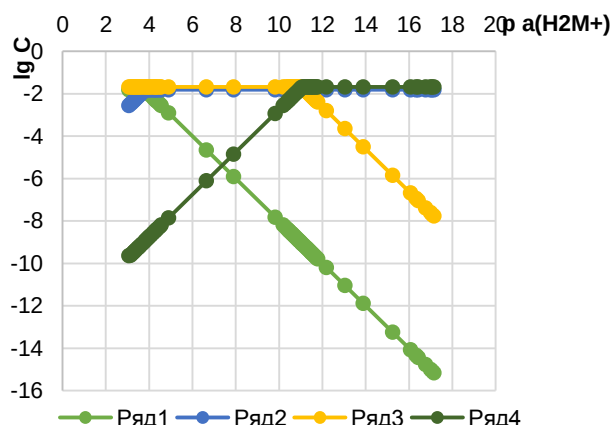


Рис. 2. Логарифмическая диаграмма для оценки равновесных концентраций всех частиц в ацетоне: ряд 1 – $[HCl]$; ряд 2 – $[Cl^-]$; ряд 3 – $[ClCH_2COOH]$; ряд 4 – $[ClCH_2COO^-]$

Fig. 2. Logarithmic diagram for estimating equilibrium concentrations of all particles in acetone: Row 1 – $[HCl]$; row 2 – $[Cl^-]$; row 3 – $[ClCH_2COOH]$; row 4 – $[ClCH_2COO^-]$

Прикладное значение разработанной концепции заключается в одновременной оценке искомых концентраций всех частиц в рассматриваемой системе [1, 20]. Возможность оценки равновесных концентраций отмеченных частиц в кислотно-основной системе ($HCl + ClCH_2COOH + ГТБА$) (см. рис. 2) показана на следующих примерах:

- 1) объем титранта 1,0 мл; $p a(H_2M^+) = 3,61$; $\lg[HCl] = -1,8097$; $\lg[Cl^-] = -2,0061$; $\lg[ClCH_2COOH] = -1,6809$; $\lg[ClCH_2COO^-] = -9,1374$;
- 2) объем титранта 2,0 мл; $p a(H_2M^+) = 4,32$; $\lg[HCl] = -2,3251$; $\lg[Cl^-] = -1,8097$; $\lg[ClCH_2COOH] = -1,6809$; $\lg[ClCH_2COO^-] = -8,42558$;
- 3) объем титранта 3,0 мл; $p a(H_2M^+) = 10,41$; $\lg[HCl] = -8,4098$; $\lg[Cl^-] = -1,8097$; $\lg[ClCH_2COOH] = -1,6809$; $\lg[ClCH_2COO^-] = -2,34083$;
- 4) объем титранта 4,0 мл; $p a(H_2M^+) = 10,95$; $\lg[HCl] = -8,9522$; $\lg[Cl^-] = -1,8097$; $\lg[ClCH_2COOH] = -1,6809$; $\lg[ClCH_2COO^-] = -1,7984$.

Таким образом, данные табл. 2 и рис. 2 дают представление о равновесных концентрациях всех частиц: $a(H_2M^+)$, $[HCl]$, $[Cl^-]$, $[ClCH_2COOH]$ и $[ClCH_2COO^-]$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Определен стандартный потенциал цепи без переноса (I) по уравнению

$$E_o - \theta pK_a(HClO_4) = E_o^* (\theta = 2.3 \cdot RT / F),$$

позволяющий оценивать активность ионов лиония в неводном растворителе – ацетоне. На основании стандартного потенциала E_o представлены величины $a(H_2Cl^+)$ или $a(ClCH_2COOH_2)^+$ в общем виде ($a(H_2M^+)$) во всем интервале потенциометрического титрования объектов исследования ацетоновым раствором гидроксида тетрабутиламмония.

Разработаны математическая и графическая модели представления логарифмических диаграмм для оценки равновесных концентраций всех частиц в кислотно-основной системе на примере потенциометрического титрования смеси кислот в дифференцирующем растворителе ацетоне, дающие возможность оценки концентраций любых частиц в любой момент титрования.

По данным титрования оценены равновесные концентрации, ионная сила, коэффициенты активности всех участников кислотно-основной системы и показатели термодинамических констант диссоциации хлороводородной и хлоруксусной кислот. Определен признак дифференциации дипольного растворителя ацетон в отношении изучаемых кислот.

Приведены примеры экспресс-определения равновесных концентраций всех частиц в растворе $a(H_2M^+)$, $[HCl]$, $[Cl^-]$, $[ClCH_2COOH]$ и $[ClCH_2COO^-]$, термодинамических констант диссоциации обеих кислот, позволяющих проследить за динамикой изменения соотношений равновесных частиц на всем протяжении кривой титрования смеси сильных и слабых электролитов (см. рис. 2).

Приведенная концепция вполне применима для исследования кислотно-основных взаимодействий смесей сильных и слабых электролитов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Танганов Б.Б. Прикладные аспекты кислотно-основных взаимодействий и моделирование равновесных концентраций в двухкомпонентных смесях кислот // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2020. Т. 10. N 3. С. 393–400. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-393-400>
2. Александров В.В. Кислотность неводных растворов. Харьков: Вища школа. 1981. 152 с.
3. Измайлов Н.А. Электрохимия растворов. 3-е изд., испр. М.: Химия. 1976. 488 с.
4. Крешков А.П. Аналитическая химия неводных растворов. М.: Химия. 1982. 256 с.
5. Вайсбергер А., Проскауэр Э., Риддик Дж., Тупс Э. Органические растворители. Физические свойства и методы очистки / пер. с англ. Н.Н. Тихомировой; под ред. Я.М. Варшавского. М.: Изд-во иностр. лит-ры, 1958. 520 с.
6. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2010615116, Российская Федерация. Программа расчета математической модели по восьми параметрам методом многоуровневого моделирования / Б.Б. Танганов, В.Д. Раднаева, В.Е. Крупенникова; заявитель и правообладатель Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Восточно-Сибирский государственный технологический университет. № 2010613616; заявл. 15.06.2010; опубл. 09.08.2010. 1 с.
7. Pilarski B., Dobkowska A., Foks H., Michałowski T. Modelling of acid-base equilibria in binary-solvent systems: a comparative study // Talanta. 2010. Vol. 80. Issue 3. P. 1073–1080. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.07.033>
8. Kropotov V.A. Approximation of potentiometric titration curves by logarithmic functions: factors affecting the accuracy of redox titration // Journal of Analytical Chemistry. 2000. Vol. 55. Issue 2. P. 160–164. <https://doi.org/10.1007/BF02757743>
9. Востоков В.М. Критерии инструментального кислотно-основного титрования растворов электролитов // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. 2009. N 3. С. 100–106.
10. Крашенинина М.П., Медведевских М.Ю., Неудачина Л.К., Собина Е.П. Оценка точности методов обработки кривых кислотно-основного титрования при потенциометрическом способе фиксации данных // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2012. Т. 78. N 12. С. 68–72.
11. Acid and base centers: structure and acid-base property // Studies in Surface Science and Catalysis. 1989. Vol. 51. Issue C. P. 27–213. [https://doi.org/10.1016/S0167-2991\(08\)61046-0](https://doi.org/10.1016/S0167-2991(08)61046-0)
12. Kropotov V.A. Approximation of acid-base titration curves by logarithmic functions // Journal of Analytical Chemistry. 1998. Vol. 53. Issue 7. P. 638–640.
13. Fedorov A.A., Shmata T.S. Computer-assisted calculation and graphical presentation of titration curves // Journal of Analytical Chemistry. 2004. Vol. 59. Issue 5. P. 402–406. <https://doi.org/10.1023/B:JAN.0.0000026227.61941.43>
14. Тессман А.В., Иванов А.В. Программа «acid-base calculator» для расчета кислотно-основных равновесий в водных растворах // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. 2001. Т. 42. N. 1. С. 19–22.
15. Tessman A.B., Ivanov A.V. Computer calculations of acid-base equilibria in aqueous solutions using the acid-base calculator program // Journal of Analytical Chemistry. 2002. Vol. 57. Issue 1. P. 2–7. <https://doi.org/10.1023/A:1013672004064>
16. Lysova S.S., Skripnikova T.A., Zevatskii Y.E. Algorithm for calculating the dissociation constants of ampholytes in nonbuffer systems // Russian Journal of Physical Chemistry A. 2018. Vol. 92. Issue 5. P. 922–

926. (In Russian) <https://doi.org/10.1134/S0036024418050229>

17. Lysova S.S., Skripnikova T.A., Zevatskii Yu.E. Algorithm for calculating the dissociation constants of weak electrolytes and amphotiles in water solutions // *Russian Journal of Physical Chemistry A*. 2017. Vol. 91. Issue 12. P. 2366–2369. <https://doi.org/10.1134/S0036024418050229>

18. Meychik N.R., Stepanov S.I., Nikolaeva Yu.I. Calculating the Ionization constant of functional groups of carboxyl ion exchangers // *Russian Journal of Physical Chemistry A*. 2018. Vol. 92. N 2. P. 265–270. <https://doi.org/10.1134/S0036024418010156>

19. Rockwood A.L. Meaning and measurability of single-ion activities, the thermodynamic foundations of pH, and the Gibbs free energy for the transfer of ions between dissimilar materials // *ChemPhysChem*.

2015. Vol. 16. Issue 9. P. 1978–1991. <https://doi.org/10.1002/cphc/201500044>

20. Tanganov B.B., Alekseeva I.A. A Method for Calculation of the Acid-Base Equilibria in Aqueous and Nonaqueous Electrolyte Solutions // *Russian Journal of Physical Chemistry A*. 2017. Vol. 91. Issue 6. P. 1149–1151. <https://doi.org/10.1134/S0036024417060243>

21. Levanov A.V., Gurbanova U.D., Isaikina O.Y., Lunin V.V. Dissociation constants of hydrohalic acids HCl, HBr, and HI in aqueous solutions // *Russian Journal of Physical Chemistry A*. 2019. Vol. 93. Issue 1. P. 93–101. <https://doi.org/10.1134/S0036024419010187>

22. Lysova S.S., Zevatskii Y.E., Demidov E.V., Novoselov N.P. Densimetric study of protolytic equilibria in aqueous electrolyte solutions // *Russian Journal of General Chemistry*. 2015. Vol. 85. Issue 4. P. 781–785. <https://doi.org/10.1134/S1070363215040015>

REFERENCES

1. Tanganov BB. Applied aspects of acid-base interactions and modelling equilibrium concentrations in two-component acid mixtures. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(3):393–400. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-393-400>

2. Aleksandrov VV. *Acidity of non-aqueous solutions*. Khar'kov: Vishcha shkola: 1981; 152 p. (In Russian)

3. Izmailov NA. *Electrochemistry of solutions*. Moscow: Khimiya; 1976. 488 p. (In Russian)

4. Kreshkov A.P. *Analytical chemistry of non-aqueous solutions*. Moscow: Khimiya; 1982. 256 p. (In Russian)

5. Weissberger A, Proskauer E, Riddick J, Toops E. *Organic solvents. Physical properties and methods of purification*. New York-London, Interscience Publ., 1955 (Russ. ed.: Vaisberger A, Proskauer E, Riddik Dzh, Tups E. *Organicheskie rastvoriteli. Fizicheskie svoystva i metody ochistki*. Moscow: Izdatel'stvo inostrannoi literatury; 1955. 520 p.)

6. Tanganov BB, Radnaeva VD, Krupennikov VE. Program for calculating the eight parameters mathematical model by the multilevel modeling method. State registration Certificate of a Computer Program no. 2010615116, Russian Federation. Registered in the Register of Computer Programs 09.08.2010.

7. Pilarski B, Dobkowska A, Foks H, Michalowski T. Modelling of acid-base equilibria in binary-solvent systems: a comparative study. *Talanta*. 2010;80(3):1073–1080. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.07.033>

8. Kropotov VA. Approximation of potentiometric titration curves by logarithmic functions: factors affecting the accuracy of redox titration. *Journal of Analytical Chemistry*. 2000;55(2):160–164. <https://doi.org/10.1007/BF02757743>

9. Vostokov VM. Criteria of acid-base instrumental titration of electrolyte solutions. *Vestnik Nizhegorodskogo universiteta im. N.I. Lobachevskogo = Vestnik of Lobachevsky University of Nizhni Novgorod*.

2009;3:100–106. (In Russian)

10. Krasheninina MP, Medvedevskikh MYu, Neudachina LK, Sobina EP. Evaluation of the accuracy of the methods of processing acid-base titration curves in case of potentiometric method of data recording. *Zavodskaya Laboratoriya. Diagnostika Materialov = Industrial Laboratory. Materials Diagnostics*. 2012;78(12):68–72. (In Russian)

11. Acid and base centers: structure and acid-base property. In: *Studies in Surface Science and Catalysis*. 1989;51(C):27–213. [https://doi.org/10.1016/S0167-2991\(08\)61046-0](https://doi.org/10.1016/S0167-2991(08)61046-0)

12. Kropotov VA. Approximation of acid-base titration curves by logarithmic functions. *Journal of Analytical Chemistry*. 1998;53(7):638–640.

13. Fedorov AA, Shmata TS. Computer-assisted calculation and graphical presentation of titration curves. *Journal of Analytical Chemistry*. 2004;59(5):402–406. <https://doi.org/10.1023/B:JANC.0000026227.61941.43>

14. Tessman AB, Ivanov AV. “Acid-base calculator” program for calculating acid-base equilibria in aqueous solutions. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 2: Khimiya*. 2001;42(1):19–22. (In Russian)

15. Tessman AB, Ivanov AV. Computer calculations of acid-base equilibria in aqueous solutions using the acid-base calculator program. *Journal of Analytical Chemistry*. 2002;57(1):2–7. <https://doi.org/10.1023/A:1013672004064>

16. Lysova SS, Skripnikova TA, Zevatskii YE. Algorithm for calculating the dissociation constants of amphotiles in nonbuffer systems. *Russian Journal of Physical Chemistry A*. 2018;92(5):922–926. (In Russian) <https://doi.org/10.1134/S0036024418050229>

17. Lysova SS, Skripnikova TA, Zevatskii YuE. Algorithm for calculating the dissociation constants of weak electrolytes and amphotiles in water solutions. *Russian Journal of Physical Chemistry A*. 2017;91(12):2366–2369. <https://doi.org/10.1134/S0036024418050229>

18. Meychik NR, Stepanov SI, Nikolaeva Yul. Calculating the Ionization constant of functional groups of

carboxyl ion exchangers. *Russian Journal of Physical Chemistry A*. 2018;92(2):265–270. <https://doi.org/10.1134/S0036024418010156>

19. Rockwood AL. Meaning and measurability of single-ion activities, the thermodynamic foundations of pH, and the Gibbs free energy for the transfer of ions between dissimilar materials. *ChemPhysChem*. 2015; 16(9):1978–1991. <https://doi.org/10.1002/cphc/201500044>

20. Tanganov BB, Alekseeva I.A. A Method for calculating the acid-base equilibria in aqueous and nonaqueous electrolyte solutions. *Russian Journal of Physical Chemistry A*. 2017;91(6):1149–1151. <https://doi.org/10.1134/S0036024417060243>

doi.org/10.1134/S0036024417060243

21. Levanov AV, Gurbanova UD, Isaikina OY, Lunin VV. Dissociation constants of hydrohalic acids HCl, HBr, and HI in aqueous solutions. *Russian Journal of Physical Chemistry A*. 2019;93(1):93–101. <https://doi.org/10.1134/S0036024419010187>

22. Lysova SS, Zevatskii YE, Demidov EV, Novoselov NP. Densimetric study of protolytic equilibria in aqueous electrolyte solutions. *Russian Journal of General Chemistry*. 2015;85(4):781–785. <https://doi.org/10.1134/S1070363215040015>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРЕ

Танганов Борис Бадмаевич,

д.х.н., профессор,
ведущий научный сотрудник отдела
организации научных исследований,
Восточно-Сибирский государственный
университет технологий и управления,
670013, г. Улан-Удэ, ул. Ключевская, 40а,
Российская Федерация,
✉ e-mail: tanganov@rambler.ru

Заявленный вклад автора

Танганов Б.Б. выполнил экспериментальную работу, обобщил полученные результаты и написал рукопись. Автор имеет на статью исключительные авторские права и несет ответственность за плагиат.

Автор прочел и одобрил окончательный вариант рукописи.

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Автор прочитал и одобрил окончательный вариант рукописи.

Поступила в редакцию 01.10.2020.

Одобрена после рецензирования 15.12.2020.

Принята к публикации 28.02.2021.

INFORMATION ABOUT THE AUTHOR

Boris B. Tanganov,

Dr. Sci. (Chemistry), Professor,
Leading Researcher;
East Siberian State University of Technology
and Management,
40a, Kluchevskaya St., Ulan-Ude, 670013,
Russian Federation,
✉ e-mail: tanganov@rambler.ru

Contribution of the author

Boris B. Tanganov carried out the experimental work, analyzed the experimental results and prepared the text of the manuscript. Author has exclusive author's right and bear responsibility for plagiarism.

The final manuscript has been read and approved by the author.

Conflict interests

Author declares no conflict of interests regarding the publication of this article.

The final manuscript has been read and approved by the author

The article was submitted 01.10.2020.

Approved after reviewing 15.12.2020.

Accepted for publication 28.02.2021.

Обзорная статья / Review article

УДК 579.66

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-34-52>



Ацидофильные хемолитотрофные микроорганизмы: перспективы применения в биогидрометаллургии и микробных топливных элементах

© О.Б. Калашникова*, А.В. Кашевский**, Н.С. Варданян***, Д. Эрдэнэчимэг****,
Г.О. Жданова**, И.А. Топчий**, О.Н. Понаморева*****, О.Ф. Вятчина**,
Д.И. Стом*****

* Балтийский федеральный университет им. Иммануила Канта,
г. Калининград, Российская Федерация

** Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Российская Федерация

*** Научно-производственный центр «Армбиотехнология»

Национальной академии наук Республики Армения, г. Ереван, Республика Армения

**** Монгольский государственный университет,

Институт инженерных и прикладных наук, г. Улан-Батор, Монголия

***** Тульский государственный университет, г. Тула, Российская Федерация

***** Байкальский музей ИНЦ, п. Листвянка, Российская Федерация

Резюме: Ацидофильные хемолитотрофные микроорганизмы применяются в биогидрометаллургии при добыче металлов из сульфидных руд. Некоторые виды микроорганизмов этой группы способны при определенных условиях генерировать электроэнергию. Данное обстоятельство стимулировало их изучение в плане использования в технологии биотопливных элементов. При постоянной подаче субстрата в биоэлектрохимическую систему ацидофильные хемолитотрофные микроорганизмы способны вырабатывать электроэнергию в течение довольно продолжительного времени. Использование экстремофилов в микробных топливных элементах представляет особый интерес, поскольку эти микроорганизмы могут служить биоэлектрокатализаторами при экстремальных значениях pH, солености и температуры, в то время как подавляющее большинство микроорганизмов в подобных условиях работать не способны. Поэтому очень важно подобрать оптимальные условия и найти способы контроля работы ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов в таких топливных элементах. В этом случае на биогидрометаллургических предприятиях будет возможна разработка технологии биовыщелачивания металлов из бедных руд, сопряженной с генерацией электричества. Биотопливные элементы, работающие при низких значениях pH, с использованием ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов – это новое, еще недостаточно изученное направление; число исследований по ацидофильным электроактивным микроорганизмам весьма ограничено. В связи с этим целью данного обзора является рассмотрение перспектив применения ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов в качестве биоагентов в микробных топливных элементах. Представленные в обзоре исследования демонстрируют способность микроорганизмов этой группы выступать как в качестве анодных (металлредуцирующие, сероокисляющие микроорганизмы), так и катодных (металлоокисляющие прокариоты, сульфатредукторы) высокоэффективных биоагентов, способных использовать в качестве субстрата отходы горнодобывающей промышленности.

Ключевые слова: биотопливные элементы, ацидофильные хемолитотрофные микроорганизмы, неорганические соединения серы, биовыщелачивание, биогидрометаллургия,

Благодарности: Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Министерства культуры, образования, науки и спорта Монголии в рамках научного проекта № 19-58-44003 «Микробиологические и электрохимические механизмы взаимодействия ацидофильных микроорганизмов с сульфидными металлосодержащими производными в процессах генерирования электричества в БТЭ, биогидрометаллургии и рекультивации».

Для цитирования: Калашникова О.Б., Кашевский А.В., Варданян Н.С., Эрдэнэчимэг Д., Жданова Г.О., Топчий И.А., Понаморева О.Н., Вятчина О.Ф., Стом Д.И. Ацидофильные хемолитотрофные микроорганизмы: перспективы применения в биогидрометаллургии и в микробных топливных элементах. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2021. Т. 11. N 1. С. 34–52. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-34-52>

Acidophilic chemolithotrophic microorganisms: prospects for use in biohydrometallurgy and microbial fuel cells

Olga B. Kalashnikova*, Alexei V. Kashevskii**, Narine S. Vardanyan***,
Dolgor Erdenechimeg****, Galina O. Zhdanova**, Ivan A. Topchy**,
Olga N. Ponamoreva*****, Olga F. Vyatchina**, Devard I. Stom**,*

* Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

** Irkutsk State University, Irkutsk, Russian Federation

*** "Armbiotechnology" Scientific and Production Center NAS RA, Yerevan, Armenia

**** National University of Mongolia, School of Engineering and Applied Science,
Ulaanbaatar, Mongolia

***** Tula State University, Tula, Russian Federation

***** Baikal Museum ISC, Listvyanka, Russian Federation

Abstract: Acidophilic chemolithotrophic microorganisms are used in biohydrometallurgy for the extraction of metals from sulphide ores. Some types of microorganisms belonging to this group are capable of generating electricity under certain conditions. This circumstance determined a recent upsurge of research interest in their use in biofuel cells. Under a constant supply of the substrate to the bioelectrochemical system, acidophilic chemolithotrophic microorganisms are capable of producing electricity for a prolonged period of time. The use of extremophiles in microbial fuel cells is of particular interest, since these microorganisms can serve as bioelectrocatalysts at extreme pH, salinity and temperature, while the vast majority of microorganisms are unable to survive under these conditions. Therefore, selection of optimal conditions and approaches to controlling the work of acidophilic chemolithotrophic microorganisms in such fuel cells is of particular importance. On this basis, a technology for the simultaneous bioleaching of metals from poor ores and the generation of electricity can be developed. Biofuel cells operating at low pH values using acidophilic chemolithotrophic microorganisms are yet to be investigated. The number of studies on acidophilic electroactive microorganisms is very limited. In this regard, the purpose of this review was to consider the prospects for the use of acidophilic chemolithotrophic microorganisms as bioagents in microbial fuel cells. The reviewed publications demonstrate that chemolithotrophic microorganisms can act as both anodic (metal-reducing, sulphur-oxidizing microorganisms) and cathodic (metal-oxidizing prokaryotes, sulfate reducers) highly efficient bioagents capable of using mining wastes as substrates.

Keywords: biofuel cells, acidophilic chemolithotrophic microorganisms, inorganic sulphur compounds, bioleaching, biohydrometallurgy

Acknowledgement: This work was financially supported by the Russian Foundation for Basic Research and the Ministry of Culture, Education, Science and Sports of Mongolia in the framework of the scientific project no. 19-58-44003 "Microbiological and electrochemical mechanisms of interaction of acidophilic microorganisms with sulfide metal-containing derivatives in the processes of generating electricity in BFC, biohydrometallurgy and recultivation".

For citation: Kalashnikova OB, Kashevskii AV, Vardanyan NS, Erdenechimeg D, Zhdanova GO, Topchiy IA, Ponamoreva ON, Vyatchina OF, Stom DI. Acidophilic chemolithotrophic microorganisms: prospects for use in biohydrometallurgy and microbial fuel cells. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(1):34–52. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-34-52>

ВВЕДЕНИЕ

Возрастающая стоимость извлечения и переработки металлов из руд наряду с истощением запасов высококачественного минерального сырья и усилением природоохранных мер способствовали развитию новых технологий в горнодобывающей промышленности. Биовыщелачивание является альтернативной технологией извлечения и рециркуляции редкоземельных элементов из различных источников. Выщелачивание облегчает мобилизацию металлов из твердых источников посредством различных биологически катализиру-

емых реакций, опосредованных различными микробными выщелачивающими агентами, такими как органические и неорганические кислоты. Широкий спектр микроорганизмов, таких как хемолитоавтотрофные бактерии и археи, хемоорганогетеротрофные бактерии, археи и грибы, применяются для биовыщелачивания металлов, включая редкоземельные элементы, из различных твердых материалов [1–4].

Микробное выщелачивание было признано привлекательной альтернативой традиционным физическим и химическим методам обогащения

руд благодаря сокращению потребления энергии, транспортных затрат и менее пагубному воздействию на окружающую среду [5–10]. Ацидофильные хемолитотрофные микроорганизмы (АХМ) в настоящее время вызывают особый интерес в связи со способностью использовать энергию окислительно-восстановительных реакций и потреблять неорганические соединения при низких значениях pH [11, 12]. Они имеют различную морфологию и могут обитать в широком температурном диапазоне [13, 14]. Эти экстремофильные микроорганизмы играют большую роль в геохимических процессах на рудниках и других территориях, загрязненных тяжелыми металлами. Изучение биоразнообразия и соответствующих биогеохимических процессов представляет большой интерес для совершенствования технологий выщелачивания металлов [15–17].

В промышленности ацидофильные хемолитотрофные микроорганизмы применяются главным образом в биовыщелачивании сульфидных руд [18–24]. Изучаются условия, влияющие на процесс биовыщелачивания [25–27]. Сегодня в промышленных масштабах бактериальные методы выщелачивания применяются в 20 странах мира. Бактериально-химическими методами добывается около 20% меди и значительная часть урана (США, Канада, Мексика, Перу, Испания, Австралия и др.). Функционирует около 15 про-

мышленных установок бактериального выщелачивания в восьми странах (ЮАР, Австралия, Бразилия, США, Канада, Замбия, Гана, Россия) [28, 29]. Микробиологами выявлено множество бактерий и архей, ускоряющих процесс окисления сульфидных минералов [30–37] (таблица).

Для успешного культивирования выделенных микроорганизмов подбираются и модифицируются питательные среды [38]. Большой интерес представляет удаление тяжелых металлов из сточных вод на металлургических предприятиях [39].

Помимо экономически важного процесса биовыщелачивания изучаются электрогенные свойства ацидофильных металлоокисляющих бактерий в микробных топливных элементах. В последние десятилетия возрос интерес к способности ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов прикрепляться к поверхности электродов как к потенциальному способу увеличения эффективности выработки электроэнергии в микробных топливных элементах, а также в других биоэлектрохимических системах [40, 41]. Основной причиной такого повышенного интереса стало открытие способности этих микроорганизмов к прямому обмену электронами с электродами, что исключает необходимость добавления токсичных окислительно-восстановительных медиаторов в биоэлектрохимические системы [42].

Микроорганизмы, используемые в биовыщелачивании
Microorganisms used in bioleaching

Изолированные бактериальные штаммы	Источник энергии	Температура, °C	pH	Морфология клеток	Отношение к кислороду
<i>Acidiplasma cupricumulans</i>	Fe^{2+} , S^0 , глюкоза, дрожжевой экстракт	45–63	1,0–1,6	Палочки, тенденция к ветвлению	Факультативный аэроб
<i>Acidithiobacillus caldus</i>	S^0 , S^{2-} , S_2O_3 , S_4O_6 , хемоорганотрофный рост с глюкозой или дрожжевым экстрактом	32–52	1,0–3,5	Короткие, подвижные, грамтрицательные палочки	Аэроб
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	Fe^{2+} , S^0 , FeS_2 , другие сульфидные минералы	30–37	1,7–2,5	Подвижные, грамтрицательные палочки	Факультативный аэроб
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	S_2O_3 , S^0 , S_4O_6	25–30	2,0–4,0	Подвижные, грамтрицательные палочки	Аэроб
<i>Ferroplasma acidiphilum</i>	Fe^{2+} , FeS_2	15–45	1,3–2,2	Клетки неправильной формы	Строгий аэроб
<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	Fe^{2+}	20–37	1,1–2,5	Изогнутые подвижные палочки, спирали	Строгий аэроб
<i>Leptospirillum ferriillum</i>	Fe^{2+} , FeS_2	28–50	1,6–1,8	Изогнутые подвижные палочки	Строгий аэроб
<i>Sulfobacillus termosulfidooxidans</i>	Fe^{2+} , S^0 , FeS_2 , другие сульфидные минералы	30–60	1,2–2,4	Грамположительные палочки	Облигатные аэробы
<i>Sulfobacillus termotolerans</i>	Fe^{2+} , S^0 , FeS_2 , другие сульфидные минералы	20–45	1,2–5,0	Грамположительные палочки	Облигатные аэробы

Одним из основных ограничений эффективности работы микробных топливных элементов является градиент pH, образующийся между анодным и катодным отделениями, в результате чего плотность тока ограничивается медленным переносом протонов [43]. Улучшение данной технологической системы может быть достигнуто путем добавления в микробный топливный элемент таких ацидофилов, чтобы система смогла работать намного эффективнее при низком уровне pH. Преимущества топливных элементов, работающих при низком pH, определяются большой доступностью протонов в катодном растворе. Поэтому ожидается, что использование кислого раствора обеспечит повышение протонной движущей силы в анодном отсеке [44]. Использование экстремофилов в микробных топливных элементах представляет особый интерес также по той причине, что эти микроорганизмы могут служить биоэлектрокатализаторами в системах, способных работать в условиях pH, солености или температуры, благоприятствующих более эффективной выработке энергии [45, 46]. Однако ограниченная база данных по ацидофильным и кислототолерантным электроактивным микроорганизмам препятствует распространению и развитию технологии биотопливных элементов, работающих при низких значениях pH [47]. В данном обзоре рассмотрены перспективы применения ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов в качестве биоагентов в микробных топливных элементах.

АЦИДОФИЛЬНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ НА АНОДЕ МИКРОБНОГО ТОПЛИВНОГО ЭЛЕМЕНТА

Металлредуцирующие прокариоты. Авторами работы [43] было исследовано сообщество микроорганизмов на поверхности анода микробного топливного элемента (МТЭ) и доминирующий вид одного из штаммов ацидофильных хемолитотрофных бактерий рода *Acidiphilium*. Незначительное количество обнаруженных клеток было отнесено к штаммам других хемолитотрофных бактерий. Методами циклической вольтамперометрии и световой электронной микроскопии было установлено, что каталитический эффект штамма *Acidiphilium* sp. strain 3.2 обусловлен прикреплением клеток к поверхности из углеродного волокна [48].

На основе ацидофильного микроорганизма *Acidiphilium cryptum* как анодного биокатализатора разработан микробный топливный элемент, который функционировал при низких значениях pH (pH = 4,0). Была продемонстрирована возможность получения электроэнергии при использовании этих бактерий в качестве акцепторов электронов в анодном пространстве в присутствии кислорода [45, 48].

В 2017 г. был запатентован способ восста-

новления металлов из хвостов сульфидных минералов в двухкамерном биотопливном элементе. В анодной камере при pH = 1,5–2,5 бактерии *Acidithiobacillus ferrooxidans* анаэробно осуществляли восстановление ионов Fe^{3+} , сопряженное с окислением сульфида до сульфата. При этом с высокой скоростью образуется свободное железо. Предложенным способом в одной ячейке топливного элемента можно переработать от 5 до 50 г/л хвостов сульфидных минералов [49].

Сероокисляющие микроорганизмы – анодный биоагент МТЭ. В кислых биогидрометаллургических водах кроме бактерий, окисляющих ионы металлов, могут присутствовать тионовые или сероокисляющие бактерии. Они окисляют молекулярную серу и ее восстановленные соединения, зачастую с закислением среды. Использование тионовых бактерий в качестве биоагента – отдельное направление в технологии МТЭ, работающих при низких значениях pH. Данная концепция, в частности, была подтверждена в исследовании, продемонстрировавшем биологическое выщелачивание сульфида меди с помощью биотопливного элемента [50]. В ходе данного процесса одновременно осуществлялись извлечение меди и выработка электроэнергии, что обеспечило новый подход к биологическому выщелачиванию меди. Применение МТЭ в процессах биологического выщелачивания способствовало извлечению меди главным образом за счет снижения pH, возникающего в результате анодного окисления сульфида и/или серы.

Исследование, проведенное группой Миры Сулонен (Финляндия), показало эффективность тетратионата как донора электронов в МТЭ, работающем в проточном режиме. В качестве субстрата в анодном пространстве использовали обогащенные тионовыми бактериями технологические воды из кучного биовыщелачивания многокомпонентной руды. Электроактивными бактериями являлись *Acidithiobacillus* spp. и *Ferroplasma* spp. Трехвалентное железо в катодном отсеке выступало в качестве конечного акцептора электронов. Сульфат образовывался в качестве основного растворимого метаболита, тогда как элементная сера осаждалась на аноде [51]. Через год та же исследовательская группа доказала возможность длительной работы биотопливного элемента с использованием тетратионата. Коэффициент полезного действия устройства был впервые повышен за счет оптимизации внешнего сопротивления и контроля системы подачи свежего субстрата в течение всего времени работы МТЭ. Причем эффективность производства электроэнергии со временем повысилась в основном благодаря обогащению и адаптации электроактивной микробной биопленки [52]. Эти исследования показывают, что сточные воды, образующиеся в ходе горной добычи, мо-

гут использоваться в качестве субстратов анодных процессов биотопливного элемента без добавления органического субстрата или регулирования pH.

Известно, что в сточных водах, образующихся при переработке сульфидных минералов, часто содержится большое количество кислотообразующих неорганических соединений серы. В необработанном виде эти сточные воды могут нанести катастрофический экологический ущерб. Группой зарубежных ученых было доказано, что технология биотопливных элементов позволяет окислять неорганические соединения серы и вырабатывать электроэнергию. Микробный топливный элемент с катионообменной мембраной инокулировали ацидофильными микроорганизмами, чтобы исследовать, может ли окисление неорганического серосодержащего соединения генерировать электрический ток. Секвенирование гена 16S рРНК микробных консорциумов анода привели к последовательностям, которые принадлежат к археям родов *Thermoplasma* и *Ferroplasma*, и бактериям родов *Leptospirillum*, *Sulfobacillus* и *Acidithiobacillus*. Это исследование, по мнению авторов, открывает возможности для биоремедиации промышленных сточных вод с использованием технологии микробных топливных элементов [53].

Важно отметить, что адгезия микроорганизмов является ключевым шагом для предотвращения экологических проблем, таких как кислотный дренаж шахт, также она повышает эффективность выщелачивания в промышленности, так как инициирует и усиливает биологическое выщелачивание. Взаимодействие между бактериями и халькопиритом становится более эффективным, если бактерии имеют высокое сродство с халькопиритом [54].

АЦИДОФИЛЬНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ НА КАТОДЕ МИКРОБНОГО ТОПЛИВНОГО ЭЛЕМЕНТА

Металлоокисляющие прокариоты. Известно, что скорость восстановления кислорода на катоде ограничивает эффективность МТЭ. Поэтому весьма привлекательно использование ацидофильных железоокисляющих бактерий, таких как *A. ferrooxidans*, в качестве катодных биоагентов, регенерирующих Fe^{3+} для катодных процессов восстановления. Эти бактерии доминируют в дренажных водах, где окисление Fe^{2+} используют как источник энергии, углекислый газ – в качестве источника углерода, а кислород – в качестве акцептора электронов [55, 56]. Рост этих бактерий на катоде биотопливного элемента приводит к генерированию более высокого потенциала, чем без их использования. Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия биокатода показала, что ионы железа (Fe^{3+}), выделяемые клетками в биопленку, обладают медиа-

торными свойствами [57]. «Чувство кворума» (Quorum sensing) у *A. ferrooxidans* позволяет образовывать биопленки, способные к генерации электричества [58]. Также выявлено, что использование *A. ferrooxidans* значительно повышает плотность тока микробного топливного элемента при pH = 2 в катодном пространстве [59].

Исследования микроорганизмов из дренажных вод позволили выяснить, что консорциумы, обогащенные ацидофильными хемолитотрофами, способствуют более эффективному переносу заряда в катодной области МТЭ. При изучении трех биотопливных элементов в качестве инокулята для обогащения катодных биопленок, использовались отложения дренажных кислых руд. Гамма-облучение биокатодов уменьшало плотность тока, приближая к показателям контрольных опытов. Методом электрохимической импедансной спектроскопии выявлено шестикратное снижение сопротивления переносу заряда с жизнеспособной биопленки. Пиросеквенирование микроорганизмов биопленки показало, что в биопленке доминировали филы *Proteobacteria* и *Firmicutes*. Некоторые биокатоды были обогащены представителями рода *Acidithiobacillus*, причем эти бактерии играли роль биокатализаторов на катоде. Другие идентифицированные ацидофильные хемолитотрофы являлись представителями родов *Sulfobacillus* и *Leptospirillum*. Наличие хемолитотрофов соответствовало прогнозируемым функциональным возможностям, связанным с путями фиксации CO_2 в прокариотических микроорганизмах. Также присутствовали ацидофильные или кислототолерантные гетеротрофы, однако, их вклад в производительность катода не изучался [47].

Сульфатредукторы. Сульфатвосстанавливающие (сульфатредуцирующие) бактерии принадлежат к числу довольно широко распространенных в природе микроорганизмов. Они встречаются в донных отложениях морей и рек, соленых озерах и лиманах, в пластовых водах нефтяных месторождений и в торфе. Сульфатвосстанавливающие бактерии участвуют в процессах формирования месторождений элементарной серы и сульфидных руд. Эти бактерии также довольно часто встречаются в анаэробной зоне различных экосистем. Они представляют собой высокоспециализированную группу анаэробных микроорганизмов, осуществляющих диссимиляторное восстановление сульфатов в сероводород.

Большинство видов сульфатвосстанавливающих бактерий в качестве акцепторов электронов могут использовать, помимо сульфатов, ряд промежуточных серных соединений, к которым относятся тиосульфат ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$), сульфит (SO_3^{2-}), элементарная сера (S^0). Незначительное число видов способно восстанавливать тетратионат ($\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$) или дитионит ($\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$). Кроме неорганиче-

ских соединений серы у некоторых видов акцепторами электронов могут служить иные соединения: нитраты, нитриты, фумарат или CO_2 [60].

Исследования последнего десятилетия были сосредоточены на использовании электроавтотрофных микроорганизмов в биоэлектрохимических системах. В сравнении с экзoeлектрогенами, которые эволюционировали с использованием внеклеточных нерастворимых минералов или электродов в качестве терминальных акцепторов электронов, электроавтотрофы способны получать энергию, поглощая электроны из внеклеточных твердых соединений или электродов, в то же время используя диоксид углерода в качестве источника неорганического углерода [60].

Для сульфатредукторов характерно явление электроавтотрофии. Электроавтотрофы – это микроорганизмы, способные участвовать в различных биокатодных реакциях, используя CO_2 в качестве единственного источника углерода, а электрохимическую восстанавливающую способность – в качестве единственного источника энергии. Автотрофные сульфатредуцирующие микроорганизмы являются чрезвычайно интересными биокатализаторами для технологий микробных топливных элементов с сопутствующей фиксацией CO_2 . Они могут использоваться для удаления сульфата из воды, для производства водорода и, в некоторых случаях, даже для получения биохимических веществ [61].

На эффективность удаления загрязнителей окружающей среды в системе биотопливных элементов с биокатодом сильно влияет внешнее напряжение. Для изучения влияния различных приложенных напряжений (0,4; 0,5; 0,6; 0,7 и 0,8 В) на восстановление сульфатов, образование внеклеточных полимеров и катодное бактериальное сообщество сконструирован двухкамерный топливный элемент. Полученные результаты показали, что выходной ток и удаление сульфатов положительно коррелируют с приложенным напряжением в диапазоне 0,4–0,8 В. Скорость восстановления сульфата сначала увеличивается, а затем уменьшается с ростом напряжения. Максимальная скорость восстановления сульфата и максимальная продукция элементной серы были достигнуты при 0,7 В. Результаты секвенирования свидетельствуют о том, что доминирующими в катодном пространстве являются бактерии родов *Proteobacteria* и *Dsulfovibrio* [62].

Е. Блазкезом и др. оценены различные параметры, влияющие на одновременное восстановление сульфата и окисление сульфида в автотрофном биокатодe. Анализ микробного сообщества катодной биопленки показал высокую распространенность сульфатвосстанавливающих бактерий, главным образом *Desulfovibrio sp.* при pH = 5,5 и 7, и *Desulfonatronum sp.* при pH = 8,5. Кроме того, наиболее эффективное катодное восстановление и выработка элемен-

тарной серы наблюдались при приложенном потенциале катода -1,0 В [63].

С. Браткова и др. исследовали влияние лактата и глюкозы, используемых в качестве доноров электронов, на скорость восстановления сульфатов, выработку электроэнергии и состав микробного сообщества в анодной камере МТЭ. Доминирующими видами сульфатвосстанавливающих бактерий были: *Desulfomicrobium baculatum* (3,21%) – в микробном топливном элементе с лактатом, *Desulfovibrio mexicanus* доминировал (2,73%) – в МТЭ с глюкозой [64].

Помимо железоокисляющих бактерий на биокатодe была изучена роль нового ацидофильного автотрофного сульфатвосстанавливающего микроорганизма. Восстановление сульфата при обработке кислотных сточных вод с pH = 3,0 достигала 32 г/м³, что было намного выше, чем в биотопливном элементе, работающем в нейтральных условиях. Сульфатвосстанавливающие бактерии *Desulfovibrio sp.* росли преимущественно на биокатодe, их содержание в составе микробного сообщества возрастало до 66%, из которых 82% приходилось на *D. simplex*. При добавлении 15 и 25 мг/л хлорида цинка скорость восстановления сульфата составляла 37 и 21 г/м³ соответственно. Растворенные ионы цинка превращались в сульфид цинка. Микробный топливный элемент с ацидофильным автотрофным биокатодом может использоваться в качестве альтернативы одновременному удалению сульфата и металлов из кислотных сточных вод, например таких, как дренажные воды [65].

АЦИДОФИЛЬНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ В ОДНОКАМЕРНЫХ МИКРОБНЫХ ТОПЛИВНЫХ ЭЛЕМЕНТАХ

Авторами работы [66] было исследовано аэробное окисление и растворение халькопирита в аэробном МТЭ, обусловленные функционированием сероокисляющих бактерий *A. thiooxidans* и железоокисляющих бактерий *Leptospirillum sp.*, что термодинамически благоприятствовало биоэлектрогенезу. Железоокисляющие микроорганизмы и сероокисляющие бактерии катализировали перенос заряда на акцептор электронов или биоанод. Передаваемый заряд генерировал перенапряжение, необходимое для катодного восстановления и электроосаждения меди, и обеспечивал более быструю катодную реакцию, которая больше не лимитировала прохождение тока.

В последние годы технология биотопливных элементов стала привлекательным вариантом для восстановления/удаления металла на катодe в сочетании с выработкой электроэнергии из шахтных вод, содержащих металлы, сильные кислоты и ацидофильные хемолитотрофные бактерии. Показано, что в однокамерном биотопливном элементе восстанавливается до

71,8% железа, 95,9% ионов железа удаляется. Железо, главным образом в форме $\text{FeO}(\text{OH})$ (гетит), выделялось на аноде после окисления солей двухвалентного железа до $\text{Fe}(\text{OH})_3$. На катоде соединения трехвалентного железа частично восстанавливаются до двухвалентного с образованием Fe_2O_3 . В таком топливном элементе оксиды и гидроксиды железа не могут образовываться в кислой среде [67].

Технология микробных топливных элементов также может применяться для удаления пирита из содержащих пирит отходов и одновременно для производства электроэнергии. Так, авторами работы [65] исследовано влияние pH, бактерий *A. ferrooxidans* на аноде, температуры среды и концентрации растворенного кислорода на производительность пирито-топливных элементов, представляющих собой однокамерные воздушно-катодные микробные топливные элементы. Биотические пирито-топливные элементы показали более стабильную работу независимо от рабочей температуры, чем абиотические. Было доказано, что с использованием технологии на основе МТЭ можно достичь одновременной обработки шахтных вод, насыщенных пиритом, и выработки электроэнергии, а производительность можно оптимизировать, регулируя рабочие условия [68].

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ЭЛЕКТРОННОГО ПЕРЕНОСА В СИСТЕМЕ ЭЛЕКТРОГЕН – ЭЛЕКТРОД

При получении биоэнергии решающее значение в технологии МТЭ имеет перенос электронов с компонентов дыхательной цепи микроорганизмов на электрод. Несмотря на то что механизм переноса еще не полностью выяснен, было предложено несколько путей внеклеточного переноса электронов от микроорганизмов-электрогенов к электродам. Как правило, эти механизмы можно разделить на два типа: прямой перенос электрона (прямой контакт между поверхностью клетки и электродом) и непрямой перенос электрона (через медиаторы электронного транспорта) [69].

Транспорт электронов в электрон-транспортной цепи обычно катализируется мембраносвязанными соединениями. Чтобы приспособиться к различным условиям окружающей среды, бактериями выработано огромное разнообразие цепей переноса электронов [70]. Важной системой, катализирующей эти реакции, являются первичные дегидрогеназы, которые поставляют электроны от донора к мембране [71]. В трансмембранный ионный транспорт также вовлечены мембранно-локализованные мультибелковые комплексы, такие как цитохромы и терминальные оксидазы (редуктазы), которые переносят электроны на конечный акцептор (кислород, нитрат или фумарат) [72, 73]. Большинство трансмембранных редуктаз и оксидаз

выполняют функцию ионных насосов. Транспортирующие электроны кофакторы, такие как хиноны, флавины, гем, железо, сера или медь, также играют важную роль в микробном переносе электронов. Некоторые из них представляют собой растворимые липофильные молекулы, которые переносят электроны между относительно большими ферментативными комплексами внутри мембраны (например, хинонами), тогда как другие являются каталитическими кофакторами.

Для прямого электронного переноса электроны должны достигать внешней мембраны клетки, далее требуется физический контакт между внешней мембраной и анодом. Электрогенные микроорганизмы образуют биопленки или электропроводящие нанопроволоки (пили и флагеллы) на поверхности анода [74]. Перенос электронов происходит через цитохромы наружной мембраны и нанопроволоки, или трансмембранные белки, участвующие в транспорте электронов путем прямого контакта без участия каких-либо медиаторов электронного транспорта, диффундирующих от ферментов микроорганизмов на электрод. Нанопили и белки электронного транспорта играют важную роль в прямом переносе электронов, поскольку они направляют поток электронов из цитоплазмы на внешнюю мембрану и, наконец, на анод. Ограничение прямого переноса электронов состоит в том, что активные центры переносящих электроны белков обычно локализованы внутри белковой молекулы, что приводит к неэффективному переносу электронов [75]. Наиболее изученными электрохимически активными микроорганизмами, способными к прямому электронному переносу, являются бактерии родов *Shewanella* и *Geobacter*. Для этих микроорганизмов характерно формирование бактериальных нанопилей, участвующих во внеклеточном переносе электронов [76–78].

Непрямой перенос электронов достигается с помощью низкомолекулярных растворимых медиаторов, которые устраняют необходимость прямого контакта между клеткой и акцептором электронов. Электронные медиаторы могут проникать в клетки бактерий, извлекать электроны из метаболических реакций электричества и переносить эти электроны на анод МТЭ [79]. Однако внесение экзогенных медиаторов не является технологически обоснованным, поскольку они всегда характеризуются относительно низкой плотностью тока, а также являются дорогостоящими и токсичными для микроорганизмов, что приводит к снижению эффективности и затрудняет коммерциализацию технологий. Более того, регулярное добавление экзогенных медиаторов технологически невозможно и опасно с точки зрения экологии. Следовательно, если в качестве катализатора можно эффективно использовать микроорганизмы без добавления экзогенных медиаторов, то это делает разрабатываемые

мые технологии безопаснее.

В этом плане наиболее исследованным в группе хемолитоавтотрофных микроорганизмов является вид *A. ferrooxidans*. При условии роста этой бактерии на соединении двухвалентного железа в результате окислительной реакции образуется относительно мало доступной энергии. Поскольку равновесный окислительно-восстановительный потенциал средней точки пары $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ (+650 мВ при pH = 2) является более положительным, чем потенциал пары НАДФ⁺/НАДФН (305 мВ при pH = 6,5) [80], восстановление НАДФ⁺ из Fe^{2+} требует энергии. Предполагается, что перенос электронов в электрон-транспортную цепь *A. ferrooxidans*, получаемых при окислении Fe^{2+} кислородом, может быть связан с восстановлением НАДФ⁺ из Fe^{2+} [81]. Предполагается, что цепь переноса электронов из Fe^{2+} в O_2 включает Fe^{2+} -цитохром с оксидоредуктазой [82, 83], рустицианином [83, 84], несколько цитохромов С-типа или цитохромы типа с4 [84–86], и цитохром Cys2 внешней мембраны [87], который позволяет при росте бактерии на сере получать больше энергии, чем при росте на железе.

A. ferrooxidans может расти на соединениях двухвалентного железа и/или серы при низком значении pH среды *A. ferrooxidans*, выращенные на двухвалентном железе, проявляли активность тиосульфат-хинонредуктазы. Это единственный известный на сегодняшний день организм, содержащий два «классических» комплекса bc1 (то есть сохранивший цитохром типа c1) [88]. Некоторые металлопротеины участвуют в дыхательной цепи этих бактерий, связывая окисление двухвалентного железа с восстановлением кислорода. Было показано, что окисление Fe^{2+} происходит за пределами бактериальной клетки, в то время как генерируемые электроны направляются в периплазматическое пространство к внутренней мембране, где и происходит восстановление кислорода. Первичный акцептор электронов, цитохром Cys2, представляет собой моногемовый цитохром с-типа, локализованный во внешней мембране. Периплазматические белки, в том числе рустицианин и дигемовый цитохром с-типа (Cyt c4), переносят электроны к терминальному акцептору электронов, цитохром с-оксидазе (Cco), принадлежащей к подгруппе кислородредуктаз и локализованной во внутренней мембране бактерий. Другой, медьсвязывающий, белок также вовлечен в дыхательную цепь. Было выдвинуто предположение о его роли как медиатора в переносе электронов.

В случае *A. ferrooxidans* белки рустицианин и Cyt c4, гены которых находятся под контролем одного и того же промотора и, следовательно, экспрессируются в одинаковых условиях, могут переносить электроны на цитохром с-оксидазу. Рустицианин может выступать в качестве второ-

го входа для электронов, защищая медный центр цитохром с-оксидазы, который подвергается воздействию кислой среды.

В течение длительного времени бактерии *A. ferrooxidans* были интересны для отраслей промышленности, которые используют процессы биологического выщелачивания. Недавно продемонстрированы преимущества этих бактерий как катализаторов на биокатоде в МТЭ [89]. Учеными подчеркивается необходимость более точного описания механизмов генерирования энергии для роста этих микроорганизмов при использовании таких низкоэнергетических субстратов, как соединения двухвалентного железа. Конечные белки этой цепи электронного транспорта имеют высокий окислительно-восстановительный потенциал, что может иметь большое значение для биотопливных элементов.

Эффективное функционирование топливных элементов часто лимитируется катодным процессом из-за низкого сродства к кислороду используемых в настоящее время многокомпонентных оксидов. Альтернативой могут служить цитохром с-оксидазы, но наиболее широко описанные из них имеют низкий окислительно-восстановительный потенциал. Однако цитохром с-оксидаза штамма *A. ferrooxidans* способна преодолеть это ограничение [71].

Клетки *At. ferrooxidans*, прикрепленные к пириту, содержат образующие комплекс с экзополимером ионы Fe^{3+} , которые обеспечивают перенос электронов между клетками и минералом. Возможно, что частицы металлов, выделяемые клетками в биопленку, могут обеспечивать перенос электронов между графитовым электродом и клеткой [57, 90].

Металлоредуцирующие бактерии являются одними из наиболее изученных организмов, способных «дышать» нерастворимыми металлами в анаэробной среде. Эта способность металлоредукторов играет важную роль в биогеохимических циклах и потенциально может быть использована в биоремедиации и биоэлектрохимических системах [91]. В отличие от других процессов дыхания, когда легко растворимые газы или нерастворимые вещества могут беспрепятственно проникать в клетку и использоваться акцепторами/донорами электронов. Главная задача для металлоредукторов заключается во взаимодействии с внеклеточными минералами, которые не могут пройти через клеточную мембрану и ее периферию. Преодоление этого барьера бактериям позволяет либо наличие в их клеточной мембране редокс-активных молекул, либо способность к выделению во внешнюю среду редокс-активных молекул-переносчиков (челноков) [70, 92].

Взаимодействие между цитохромными комплексами в цепи переноса электронов основано на окислительно-восстановительном потенциале различных многогемовых молекул цитохромов, причем каждый гем имеет свой специфический

окислительно-восстановительный потенциал. Таким образом, создается широкий диапазон потенциалов, который обеспечивает биоэнергетический перенос электронов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хемолитотрофы давно применяются в биогидрометаллургии при добыче металлов из сульфидных руд. Возможность при определенных условиях использовать тионовые, железокисляющие, железо- и сульфатредуцирующие бактерии в биотопливных элементах была выявлена относительно недавно. При постоянной подаче субстрата в биоэлектрохимическую систему ацидофильные хемолитотрофные микроорганизмы способны вырабатывать электроэнергию в течение длительного времени. Использование экстремофилов в микробных топливных элемен-

тах представляет особый интерес по той причине, что эти микроорганизмы могут служить биоэлектрокатализаторами при экстремальных значениях pH, солености и температуры. При этих условиях подавляющее большинство микроорганизмов не способно работать. При успешном подборе оптимальных условий для работы ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов в таких топливных элементах на биогидрометаллургических предприятиях будет возможна разработка технологии по сопряженному биовыщелачиванию металлов из бедных руд и генерации электричества. Поэтому биотопливные элементы, работающие при низких значениях pH с использованием ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов, – это новое, перспективное, но еще недостаточно изученное направление.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hopfe S., Konsulke S., Barthen R., Lehmann F., Kutschke S., Pollmann K. Screening and selection of technologically applicable microorganisms for recovery of rare earth elements from fluorescent powder // Waste Management. 2018. Vol. 79. P. 554–563. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.08.030>
2. Kaksonen A.H., Boxall N.J., Gumulya Y., Khaleque H.N., Morris C., Bohu T., et al. Recent progress in biohydrometallurgy and microbial characterization // Hydrometallurgy. 2018. Vol. 180. P. 7–25. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2018.06.018>
3. Pathak A., Morrison L., Healy M.G. Catalytic potential of selected metal ions for bioleaching, and potential techno-economic and environmental issues: A critical review // Bioresource technology. 2017. Vol. 229. P. 211–221. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.001>
4. Yang Y., Ferrier J., Csetenyi L., Gadd G.M. Direct and indirect bioleaching of cobalt from low grade laterite and pyritic ores by *Aspergillus niger* // Geomicrobiology Journal. 2019. Vol. 36. Issue 9. P. 940–949. <https://doi.org/10.1080/01490451.2019.1654045>
5. Olson G.J., Brierley J.A., Brierley C.L. Bioleaching review part B: Progress in bioleaching: applications of microbial processes by the minerals industries // Applied Microbiology and Biotechnology. 2003. Vol. 63. Issue 3. P. 249–257. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1404-6>
6. Johnson D.B. Biomining – biotechnologies for extracting and recovering metals from ores and waste materials // Current opinion in biotechnology. 2014. Vol. 30. P. 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.04.008>
7. Johnson D.B. The evolution, current status, and future prospects of using biotechnologies in the mineral extraction and metal recovery sectors // Minerals. 2018. Vol. 8. Issue 8. P. 343. <https://doi.org/10.3390/min8080343>
8. Zhang L., Zhou W., Liu Y., Jia H., Zhou J., Wei P., et al. Bioleaching of dewatered electroplating sludge for the extraction of base metals using an adapted microbial consortium: Process optimization and kinetics // Hydrometallurgy. 2020. Vol. 191. 105227. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2019.105227>
9. Sajjad W., Zheng G., Uddin G., Ma X., Rafiq M., Xu W. Metals extraction from sulfide ores with microorganisms: The bioleaching technology and recent developments // Transactions of the Indian Institute of Metals. 2019. Vol. 72. Issue 3. P. 559–579. <https://doi.org/10.1007/s12666-018-1516-4>
10. Yin S.-H., Wang L.-M., Wu A.-X., Chen X., Yan R.-F. Research progress in enhanced bioleaching of copper sulfides under the intervention of microbial communities // International Journal of Minerals, Metallurgy and Materials. 2019. Vol. 26. Issue 11. P. 1337–1350. <https://doi.org/10.1007/s12613-019-1826-5>
11. Vardanyan A., Stepanyan S., Vardanyan N., Markosyan L., Sand W., Vera V., et al. Study and assessment of microbial communities in natural and commercial bioleaching systems // Minerals Engineering. 2015. Vol. 81. P. 167–172.
12. Schippers A. Microorganisms involved in bioleaching and nucleic acid-based molecular methods for their identification and quantification. In: Donati E.R., Sand W. (eds.). Microbial Processing of Metal Sulfides. Springer, 2007. P. 3–33.
13. Rawlings D.E., Johnson D.B. The microbiology of biomining: development and optimization of mineral-oxidizing microbial consortia // Microbiology. 2007. Vol. 153. Issue 2. P. 315–324. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/001206-0>
14. Schippers A., Breuker A., Blazejak A., Bosecker K., Kock D., Wright T.L. The biogeochemistry and microbiology of sulfidic mine waste and bioleaching dumps and heaps, and novel Fe(II)-oxidizing bacteria // Hydrometallurgy. 2010. Vol. 104. Issue 3-4. P. 342–350. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2010.01.012>

15. Dopson M., Lindstrom E.B. Analysis of community composition during moderately thermophilic bioleaching of pyrite, arsenical pyrite and chalcopyrite // *Microbial Ecology*. 2004. Vol. 48. Issue 1. P. 19–28. <https://doi.org/10.1007/s00248-003-2028-1>
16. Watling H.R. The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides – a review // *Hydrometallurgy*. 2006. Vol. 84. P. 81–108. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2006.05.001>
17. Chen W., Yin S., Wu A., Wang L., Chen X. Bioleaching of copper sulfides using mixed microorganisms and its community structure succession in the presence of seawater // *Bioresource Technology*. 2020. Vol. 297. Article number 122453. 9 p. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122453>
18. Петухова Н.И., Скорняков А.Н., Ковтуненко С.В., Зорин В.В. Исследование биовыщелачивания медного концентрата мезофильными и умеренно термофильными консорциумами микроорганизмов // *Башкирский химический журнал*. 2009. Т. 16. N 4. С. 59–61.
19. Vardanyan A.K., Markosyan L.S., Vardanyan N.S. Biooxidation of refractory gold bearing ores by moderately thermophilic chemolithotrophic bacteria and their association. Conference: 19th International Biohydrometallurgy Symposium (IBS2011). China, 2011. Vol. 2. P. 597–600.
20. Трухин Ю.П., Левенец О.О. Бактериальное окисление сульфидной кобальт-медно-никелевой руды // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2012. N 1 (2). С. 103–106.
21. Трухин Ю.П., Левенец О.О. Трехстадийная технология биовыщелачивания сульфидной кобальт-медно-никелевой руды // *Горный информационно-аналитический бюллетень (научно-технический журнал)*. 2011. N 10. С. 102–110.
22. Хайнасова Т.С., Трухин Ю.П. Прикрепление микроорганизмов в ходе биовыщелачивания сульфидной кобальт-медно-никелевой руды // *Горный информационно-аналитический бюллетень (научно-технический журнал)*. 2015. N 63. С. 285–290.
23. Киореску А.В., Мусихин В.О., Хомченкова А.С., Балыков А.А. Исследование чанового бактериальнохимического выщелачивания сульфидных медно-никелевых руд месторождения Шануч (Камчатка) в проточном режиме // *Горный информационно-аналитический бюллетень (научно-технический журнал)*. 2015. N S63. С. 360–365.
24. Vardanyan N.S., Sevoyan G.G., Vardanyan A.K. Bioleaching of tailings resulting from beneficiation of polymetallic ores for recovery of valuable metals // *Solid State Phenomena*. 2017. Vol. 262. P. 113–117. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/SSP.262.113>
25. Левенец О.О., Трухин Ю.П. Влияние температурного режима на биовыщелачивание сульфидной кобальт-медно-никелевой руды // *Горный информационно-аналитический бюллетень (научно-технический журнал)*. 2014. N 9. С. 48–51.
26. Левенец О.О., Хайнасова Т.С., Балыков А.А., Позолотина Л.А. Биовыщелачивание сульфидной кобальт-медно-никелевой руды с вариациями питательной среды для хемолитотрофных микроорганизмов // *Горный информационно-аналитический бюллетень (научно-технический журнал)*. 2015. N S63. С. 291–296.
27. Tao J., Liu X., Luo X., Teng T., Jiang C., Drewniak L., et al. An integrated insight into bioleaching performance of chalcopyrite mediated by microbial factors: Functional types and biodiversity // *Bioresource Technology*. 2020. Vol. 319. Article number 124219. 10 p. <https://doi.org/10.1016/j.bio-rtech.2020.124219>
28. Gahan C.S., Srichandan H., Kim D.-J., Akcil A. Biohydrometallurgy and biomineral processing technology: a review on its past, present and future // *Research Journal of Recent Sciences*. 2012. Vol. 1. Issue 10. P. 85–99.
29. Gentina J.C., Acevedo F., Application of bioleaching to copper mining in Chile // *Electronic Journal of Biotechnology*. 2013. Vol. 16. Issue 3. 14 p. <https://doi.org/10.2225/vol16-issue3-fulltext-12>
30. Трухин Ю.П., Хайнасова Т.С., Рогатых С.В. Выделение хемолитотрофных микроорганизмов из окисленной руды медно-никелевого месторождения Шануч (Камчатка) для биовыщелачивания сульфидных руд // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2012. N 1 (2). С. 83–87.
31. Хайнасова Т.С., Рогатых С.В., Кузякина Т.И., Корнилова Т.И. Окисленная руда как источник выделения ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов для биовыщелачивания сульфидных медно-никелевых руд // *Горный информационно-аналитический бюллетень (научно-технический журнал)*. 2013. N 10. С. 127–134.
32. Kanaev Z.K., Bulaev A.G., Kondrat'eva T.F., Kanaev A.T. Physiological properties of *Acidithiobacillus ferrooxidans* strains isolated from sulfide ore deposits in Kazakhstan // *Microbiology*. 2015. Vol. 84. Issue 3. P. 370–376. <https://doi.org/10.1134/S0026261715030091>
33. Van Hille R.P., van Wyk N., Froneman T., Harrison S.T.L. Dynamic evolution of the microbial community in BIOX leaching tanks // *Advanced Materials Research*. 2013. Vol. 825. P. 331–334. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.825.331>
34. Bulaev A.G., Kanygina A.V., Manolov A.I. Genome analysis of *Acidiplasma* sp. MBA-1, a poly-extremophilic archaeon predominant in the microbial community of a bioleaching reactor // *Microbiology*. 2017. Vol. 86. Issue 1. P. 89–95. <https://doi.org/10.1134/S0026261716060059>
35. Dopson M., Baker-Austin C., Hind A., Bowman J.P., Bond P.L. Characterization of *Ferroplasma* isolates and *Ferroplasma acidarmanus* sp. nov., extreme acidophiles from acid mine drainage and industrial bioleaching environments // *Applied and*

Environmental Microbiology. 2004. Vol. 70. Issue 4. P. 2079–2088. <https://doi.org/10.1128/aem.70.4.2079-2088.2004>

36. Golyshina O.V. Environmental, biogeographic, and biochemical patterns of archaea of the family *Ferropasmaceae* // Applied and Environmental Microbiology. 2011. Vol. 77. Issue 15. P. 5071–5078. <https://doi.org/10.1128/AEM.00726-11>

37. Hallberg K.B., Lindström E.B. Characterization of *Thiobacillus caldus* sp. nov., a moderately thermophilic acidophile // Microbiology. 1994. Vol. 140. Issue 12. P. 3451–3456. <https://doi.org/10.1099/13500872-140-12-3451>

38. Левенец О.О., Хайнасова Т.С., Позолотина Л.А. Модифицирование питательных сред для микроорганизмов в целях улучшения физико-химических параметров биовыщелачивания // Горный информационно-аналитический бюллетень (научно-технический журнал). 2016. N. S31. C. 260–271.

39. Joshi P.K., Swarup A., Maheshwari S., Kumar R., Singh N. Bioremediation of heavy metals in liquid media through fungi isolated from contaminated sources // Indian Journal of Microbiology. 2011. Vol. 51. Issue 4. P. 482–487. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0110-9>

40. Czajkowska T., Jaroniec M. Selectivity of alkylamide bonded-phases with respect to organic acids under reversed-phase conditions. *Journal of Chromatography A*. 1997. Vol. 762. Issue 1-2. P. 147–158. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(96\)00966-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(96)00966-1)

41. Logan B.E., Regan M. Microbial fuel cell – challenges and applications // Environmental Science & Technology. 2006. Vol. 40. Issue 17. P. 5172–5180. <https://doi.org/10.1021/es0627592>

42. Logan B.E., Hamelers B., Rozendal R., Schröder U., Keller J., Freguia S., et al. Microbial fuel cells: methodology and technology // Environmental science & technology. 2006. Vol. 40. Issue 17. P. 5181–5192. <https://doi.org/10.1021/es0605016>

43. García-Muñoz J., Amils R., Fernández V.M., De Lacey A.L., Malki M. Electricity generation by microorganisms in the sediment-water interface of an extreme acidic microcosm // International Microbiology. 2011. Vol. 14. Issue 2. P. 73–81. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.137>

44. Cheng S., Logan B.E. Sustainable and efficient biohydrogen production via electrohydrogenesis // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2007. Vol. 104. Issue 47. P. 18871–18873. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706379104>

45. Borole A.P., O'Neill H., Tsouris C., Cesar S. A microbial fuel cell operating at low pH using the acidophile *Acidiphilium cryptum* // Biotechnology Letters. 2008. Vol. 30. Issue 8. P. 1367–1372. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9700-y>

46. Mathis B.J., Marshall C.W., Milliken C.E., Makkar R.S., Creager S.E., May H.D. Electricity generation by thermophilic microorganisms from marine sediment // Applied Microbiology and Biotechnology. 2008. Vol. 78. Issue 1. P. 147–155. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1266-4>

47. Rojas C., Vargas I.T., Bruns M.A., Regan J.M. Electrochemically active microorganisms from an acid mine drainage-affected site promote cathode oxidation in microbial fuel cells // Bioelectrochemistry. 2017. Vol. 118. P. 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2017.07.013>

48. Malki M., de Lacey A.L., Rodríguez N., Amils R., Fernandez V.M. Preferential use of an anode as an electron acceptor by an acidophilic bacterium in the presence of oxygen // Applied and Environmental Microbiology. 2008. Vol. 74. Issue 14. P. 4472–4476. <https://doi.org/10.1128/AEM.00209-08>

49. Li X., Nie P., Ren Y., Wang X. Recovery of metal components from sulfide mineral tailings by microbial fuel cell. Patent USA, no. 9755261, 2017.

50. Huang T., Wei X., Zhang S. Bioleaching of copper sulfide minerals assisted by microbial fuel cells // Bioresource Technology. 2019. Vol. 288. P. 121561. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121561>

51. Sulonen M.L., Kokko M.E., Lakaniemi A.-M., Puhakka J.A. Electricity generation from tetrathionate in microbial fuel cells by acidophiles // Journal of Hazardous Materials. 2015. Vol. 284. P. 182–189. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.10.045>

52. Sulonen M.L., Lakaniemi A.-M., Kokko M.E., Puhakka J.A. Long-term stability of bioelectricity generation coupled with tetrathionate disproportionation // Bioresource Technology. 2016. Vol. 216. P. 876–882. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.024>

53. Ni G., Christel S., Roman P., Wong Z.L., Bijmans M.F., Dopson M. Electricity generation from an inorganic sulfur compound containing mining wastewater by acidophilic microorganisms // Research in Microbiology. 2016. Vol. 167. Issue 7. P. 568–575. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.04.010>

54. Li Q., Becker T., Zhang R., Xiao T., Sand W. Investigation on adhesion of *Sulfobacillus* thermosulfidooxidans via atomic force microscopy equipped with mineral probes // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2019. Vol. 173. P. 639–646. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.10.046>

55. Ter Heijne A., Hamelers H.V.M., de Wilde V., Rozendal R.A., Buisman C.J.N. A bipolar membrane combined with ferric iron reduction as an efficient cathode system in microbial fuel cells // Environmental Science & Technology. 2006. Vol. 40. Issue 17. P. 5200–5205. <https://doi.org/10.1021/es0608545>

56. Ter Heijne A., Hamelers H.V.M., Buisman C.J.N. Microbial fuel cell operation with continuous biological ferrous iron oxidation of the catholyte // Environmental Science & Technology. 2007. Vol. 41. Issue 11. P. 4130–4134. <https://doi.org/10.1021/es0702824>

57. Carbajosa S., Malki M., Caillard R., Lopez M.F., Palomares F.J., Martín-Gago J.A., et al. Electrochemical growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on a graphite electrode for obtaining a biocathode for direct electrocatalytic reduction of oxygen // Biosensors and Bioelectronics. 2010. Vol. 26. Issue 2. P. 877–880.

<https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.07.037>

58. Chabert N., Bonnefoy V., Achouak W. Quorum sensing improves current output with *Acidithiobacillus ferrooxidans* // *Microbial Biotechnology*. 2018. Vol. 11. Issue 1. P. 136–140. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12797>

59. Ulusoy I., Dimoglo A. Electricity generation in microbial fuel cell systems with *Thiobacillus ferrooxidans* as the cathode microorganism // *International Journal of Hydrogen Energy*. 2018. Vol. 43. Issue 2. P. 1171–1178. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.10.155>

60. Хамидуллина И.В., Хлебникова Т.Д., Хамидуллин И.Р. Особенности использования сульфатовосстанавливающих бактерий для очистки сточных вод от ионов тяжелых металлов // *Башкирский химический журнал*. 2012. Т. 19. N 3. С. 147–151.

61. Agostino V., Rosenbaum M.A. Sulfate-reducing electroautotrophs and their applications in bioelectrochemical systems // *Frontiers in Energy Research*. 2018. Vol. 6. P. 55. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2018.00055>

62. Hu J.-P., Zeng C.-P., Luo H.-P., Liu G.-L., Zhang R.-D., Lu Y.-B. Sulfate reduction and microbial community of autotrophic biocathode in response to externally applied voltage // *Huan Jing Ke Xue*. 2019. Vol. 40. Issue 1. P. 327–335. <https://doi.org/10.13227/j.hjkk.201806171>

63. Blázquez E., Gabriel D., Baeza J.A., Guisasola A. Evaluation of key parameters on simultaneous sulfate reduction and sulfide oxidation in an autotrophic biocathode // *Water Research*. 2017. Vol. 123. P. 301–310. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.06.050>

64. Bratkova S., Alexieva Z., Angelov A., Nikolova K., Genova P., Ivanov R., et al. Efficiency of microbial fuel cells based on the sulfate reduction by lactate and glucose // *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2019. Vol. 16. Issue 10. P. 6145–6156. <https://doi.org/10.1007/s13762-019-02223-8>

65. Teng W., Liu G., Luo H., Zhang R., Xiang Y. Simultaneous sulfate and zinc removal from acid wastewater using an acidophilic and autotrophic biocathode // *Journal of Hazardous Materials*. 2016. Vol. 304. P. 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.10.050>

66. Fernández-Reyes J.S., García-Meza J.V. Bioelectrochemical system for the biooxidation of a chalcopyrite concentrate by acidophilic bacteria coupled to energy current generation and cathodic copper recovery // *Biotechnology Letters*. 2018. Vol. 40. Issue 1. P. 63–73. <https://doi.org/10.1007/s10529-017-2435-x>

67. Li X., Zheng Y., Nie P., Ren Y., Wang X., Liu Y. Synchronous recovery of iron and electricity using a single chamber air-cathode microbial fuel cell // *RSC Advances*. 2017. Vol. 7. Issue 21. P. 12503–12510. <https://doi.org/10.1039/C6RA28148F>

68. Ju W.-J., Jho E.H., Nam K. Effect of initial pH,

operating temperature, and dissolved oxygen concentrations on performance of pyrite-fuel cells in the presence of *Acidithiobacillus ferrooxidans* // *Journal of Hazardous Materials*. 2018. Vol. 360. P. 512–519. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.08.034>

69. Cao Y., Mu H., Liu W., Zhang R., Guo J., Xian M., et al. Electrigens in the anode of microbial fuel cells: pure cultures versus mixed communities // *Microbial Cell Factories*. 2019. Vol. 18. Issue 1. Article number 39. 14 p. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1087-z>

70. Hernandez M.E., Newman D.K. Extracellular electron transfer // *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 2001. Vol. 58. P. 1562–1571. <https://doi.org/10.1007/PL00000796>

71. Wang X., Roger M., Clément R., Lecomte S., Biaso F., Abriata L.A., et al. Electron transfer in an acidophilic bacterium: interaction between a di-heme cytochrome and a cupredoxin // *Chemical Science*. 2018. Vol. 9. Issue 21. P. 4879–4891. <https://doi.org/10.1039/c8sc01615a>

72. Hannemann F., Bichet A., Ewen K.M., Bernhardt R. Cytochrome P450 systems-biological variations of electron transport chains // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*. 2007. Vol. 1770. Issue 3. P. 330–344. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.07.017>

73. Vignais P.M., Billoud B. Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview // *Chemical Reviews*. 2007. Vol. 107. Issue 10. P. 4206–4272. <https://doi.org/10.1021/cr050196r>

74. Reguera G., McCarthy K.D., Mehta T., Nicoll J.S., Tuominen M.T., Lovley D.R. Extracellular electron transfer via microbial nanowires // *Nature*. 2005. Vol. 435. Issue 7045. P. 1098–1101. <https://doi.org/10.1038/nature03661>

75. Zhao F., Slade R.C.T., Varcoe J.R. Techniques for the study and development of microbial fuel cells: an electrochemical perspective // *Chemical Society Reviews*. 2009. Vol. 38. Issue 7. P. 1926–1939. <https://doi.org/10.1039/b819866g>

76. Malvankar N.S., Lovley D.R. Microbial nanowires for bioenergy applications // *Current Opinion in Biotechnology*. 2014. Vol. 27. P. 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.12.003>

77. Gorby Y.A., Yanina S., McLean J.S., Rosso K.M., Moyles D., Dohnalkova A., et al. Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006. Vol. 103. Issue 30. P. 11358–11363. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604517103>

78. Mukhaifi E.A., Abduljaleel S.A. Electric bacteria: a review // *Journal of Advanced Laboratory Research in Biology*. 2020. Vol. 11. Issue 1. P. 7–15.

79. He L., Du P., Chen Y., Lu H., Cheng X., Chang B., et al. Advances in microbial fuel cells for wastewater treatment // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2017. Vol. 71. P. 388–403. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.069>

80. Cox J.C., Nicholls D.G., Ingledew W.J. Transmembrane electrical potential and transmembrane pH gradient in the acidophile *Thiobacillus ferrooxidans* // Biochemical Journal. 1979. Vol. 178. Issue 1. P. 195–200. <https://doi.org/10.1042/bj1780195>
81. Ingledew W.J. *Thiobacillus ferrooxidans* the bioenergetics of an acidophilic chemolithotroph // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Reviews on Bioenergetics. 1982. Vol. 683. Issue 2. P. 89–117. [https://doi.org/10.1016/0304-4173\(82\)90007-6](https://doi.org/10.1016/0304-4173(82)90007-6)
82. Cavazza C., Guigliarelli B., Bertrand P., Bruschi M. Biochemical and EPR characterization of a high potential iron-sulfur protein in *Thiobacillus ferrooxidans* // FEMS Microbiology Letters. 1995. Vol. 130. Issue 2-3. P. 193–199. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07719.x>
83. Fukumori Y., Yano T., Sato A., Yamanaka T. Fe (II)-oxidizing enzyme purified from *Thiobacillus ferrooxidans* // FEMS Microbiology Letters. 1988. Vol. 50. Issue 2-3. P. 169–172. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1988.tb02932.x>
84. Cobley J.G., Haddock B.A. The respiratory chain of *Thiobacillus ferrooxidans*: the reduction of cytochromes by Fe²⁺ and the preliminary characterization of rusticyanin a novel “blue” copper protein // FEBS Letters. 1975. Vol. 60. Issue 1. P. 29–33.
85. Cox J.C., Boxer D.H. The purification and some properties of rusticyanin, a blue copper protein involved in iron (II) oxidation from *Thiobacillus ferrooxidans* // The Biochemical Journal. 1978. Vol. 174. Issue 2. P. 497–502. <https://doi.org/10.1042/bj1740497>
86. Nunzi F., Woudstra M., Campèse D., Bonicel J., Morin D., Bruschi M. Amino-acid sequence of rusticyanin from *Thiobacillus ferrooxidans* and its comparison with other blue copper proteins // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology. 1993. Vol. 1162. Issue 1-2. P. 28–34. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(93\)90123-9](https://doi.org/10.1016/0167-4838(93)90123-9)
87. Yarzabal A., Brasseur G., Ratouchniak J., Lund K., Lemesle-Meunier D., DeMoss J.A., et al. The high-molecular-weight cytochrome c Cys2 of *Acidithiobacillus ferrooxidans* is an outer membrane protein // Journal of Bacteriology. 2002. Vol. 184. Issue 1. P. 313–317. <https://doi.org/10.1128/jb.184.1.313-317.2002>
88. Giudici-Orticoni M.-T., Leroy G., Nitschke W., Bruschi M. Characterization of a new dihemic c(4)-type cytochrome isolated from *Thiobacillus ferrooxidans* // Biochemistry. 2000. Vol 39. Issue 24. P. 7205–7211. <https://doi.org/10.1021/bi992846p>
89. Elbehti A., Nitschke W., Tron P., Michel C., Lemesle-Meunier D. Redox components of cytochrome bc-type enzymes in acidophilic prokaryotes. I. Characterization of the cytochrome bc₁-type complex of the acidophilic ferrous ion-oxidizing bacterium *Thiobacillus ferrooxidans* // Journal Biological Chemistry. 1999. Vol 274. Issue 24. P. 16766–16772. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.24.16760>
90. Díaz M., Castro M., Copaja S., Guilian N. Biofilm formation by the acidophile bacterium *Acidithiobacillus thiooxidans* involves c-di-GMP pathway and pel exopolysaccharide // Genes. 2018. Vol 9. Issue 2. P. 113. <https://doi.org/10.3390/genes9020113>
91. Lovley D.R., Holmes D.E., Nevin K.P. Dissimilatory Fe (III) and Mn (IV) reduction // Advances in Microbial Physiology. 2004. Vol. 49. P. 219–286. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(04\)49005-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(04)49005-5)
92. Hartshorne R.S., Reardon C.L., Ross D., Nuester J., Clarke T.A., Gates A.J., et al. Characterization of an electron conduit between bacteria and the extracellular environment // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2009. Vol. 106. Issue 52. P. 22169–22174. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900086106>

REFERENCES

1. Hopfe S, Konsulke S, Barthen R, Lehmann F, Kutschke S, Pollmann K. Screening and selection of technologically applicable microorganisms for recovery of rare earth elements from fluorescent powder. *Waste Management*. 2018;79:554–563. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.08.030>
2. Kaksonen AH, Boxall NJ, Gumulya Y, Khaleque HN, Morris C, Bohu T, et al. Recent progress in biohydrometallurgy and microbial characterization. *Hydrometallurgy*. 2018;180:7–25. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2018.06.018>
3. Pathak A, Morrison L, Healy MG. Catalytic potential of selected metal ions for bioleaching, and potential techno-economic and environmental issues: A critical review. *Bioresource technology*. 2017;229:211–221. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.001>
4. Yang Y, Ferrier J, Csetenyi L, Gadd GM. Direct and indirect bioleaching of cobalt from low grade laterite and pyritic ores by *Aspergillus niger*. *Geomicrobiology Journal*. 2019;36(9):940–949. <https://doi.org/10.1080/01490451.2019.1654045>
5. Olson GJ, Brierley JA, Brierley CL. Bioleaching review part B: Progress in bioleaching: applications of microbial processes by the minerals industries. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2003;63(3):249–257. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1404-6>
6. Johnson DB. Biomining – biotechnologies for extracting and recovering metals from ores and waste materials. *Current opinion in biotechnology*. 2014;30:24–31. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.04.008>
7. Johnson DB. The evolution, current status, and future prospects of using biotechnologies in the mineral extraction and metal recovery sectors. *Minerals*. 2018;8(8):343. <https://doi.org/10.3390/min8080343>
8. Zhang L, Zhou W, Liu Y, Jia H, Zhou J, Wei P, et al. Bioleaching of dewatered electroplating sludge for the extraction of base metals using an adapted microbial consortium: Process optimization and kinetics. *Hydrometallurgy*. 2020;191:105227. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2019.105227>

9. Sajjad W, Zheng G, Uddin G, Ma X, Rafiq M, Xu W. Metals extraction from sulfide ores with microorganisms: The bioleaching technology and recent developments. *Transactions of the Indian Institute of Metals*. 2019;72(3):559–579. <https://doi.org/10.1007/s12666-018-1516-4>
10. Yin S-H, Wang L-M, Wu A-X, Chen X, Yan R-F. Research progress in enhanced bioleaching of copper sulfides under the intervention of microbial communities. *International Journal of Minerals, Metallurgy and Materials*. 2019;26(11):1337–1350. <https://doi.org/10.1007/s12613-019-1826-5>
11. Vardanyan A, Stepanyan S, Vardanyan N, Markosyan L, Sand W, Vera V, et al. Study and assessment of microbial communities in natural and commercial bioleaching systems. *Minerals Engineering*. 2015;81:167–172.
12. Schippers A. Microorganisms involved in bioleaching and nucleic acid-based molecular methods for their identification and quantification. In: Donati ER, Sand W. (eds.) *Microbial Processing of Metal Sulfides*. Springer; 2007. p.3–33.
13. Rawlings DE, Johnson DB. The microbiology of biomining: development and optimization of mineral-oxidizing microbial consortia. *Microbiology*. 2007;153(2):315–324. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/001206-0>
14. Schippers A, Breuker A, Blazejak A, Bosecker K, Kock D, Wright TL. The biogeochemistry and microbiology of sulfidic mine waste and bioleaching dumps and heaps, and novel Fe(II)-oxidizing bacteria. *Hydrometallurgy*. 2010;104(3-4):342–350. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2010.01.012>
15. Dopson M, Lindstrom EB. Analysis of community composition during moderately thermophilic bioleaching of pyrite, arsenical pyrite and chalcopyrite. *Microbial Ecology*. 2004;48(1):19–28. <https://doi.org/10.1007/s00248-003-2028-1>
16. Watling HR. The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides – a review. *Hydrometallurgy*. 2006;84:81–108. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2006.05.001>
17. Chen W, Yin S, Wu A, Wang L, Chen X. Bioleaching of copper sulfides using mixed microorganisms and its community structure succession in the presence of seawater. *Bioresource Technology*. 2020;297. Article number 122453. 9 p. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122453>
18. Petukhova NI, Scornyakov AN, Kovtunenkov SV, Zorin VV. Research of copper concentrate bioleaching by mesophilic and moderate thermophilic bacteria. *Bashkirskii khimicheskii zhurnal = Bashkir Chemical Journal*. 2009;16(4):59–61. (In Russian)
19. Vardanyan NS, Markosyan LS, Vardanyan AK. Biooxidation of refractory gold bearing ores by moderately thermophilic chemolithotrophic bacteria and their association. In: Proceedings of the 19th International Biohydrometallurgy Symposium “*Biohydrometallurgy: Biotech Key to Unlock Mineral Resources Value*” (IBS2011), Changsha, China, September 18–21, 2011. Changsha, 2011. Vol. 2. p. 597–600.
20. Trukhin YuP, Levenets OO. Bacterial oxidation of sulphidic cobalt-copper-nickel ore. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2012;1:103–106. (In Russian)
21. Trukhin YuP, Levenets OO. Three-stage technology of bioleaching of sulphide cobalt-copper-nickel ore. *Gornyi informatsionno-analiticheskii byulleten' (nauchno-tekhnicheskii zhurnal) = Mining informational and analytical bulletin (scientific and technical journal)*. 2011;10:102–110. (In Russian)
22. Khainasova TS, Trukhin YuP. The microorganisms attachment during of bioleaching of sulphide cobalt-copper-nickel ore. *Gornyi informatsionno-analiticheskii byulleten' (nauchno-tekhnicheskii zhurnal) = Mining informational and analytical bulletin (scientific and technical journal)*. 2015;S63:285–290. (In Russian)
23. Kioresku AV, Musikhin VO, Khomchenkova AS, Balykov AA. Study of tank bacterial-chemical leaching of the sulfide copper-nickel ores from Shannuch field (Kamchatka) in a flowing mode. *Gornyi informatsionno-analiticheskii byulleten' (nauchno-tekhnicheskii zhurnal) = Mining informational and analytical bulletin (scientific and technical journal)*. 2015;S63:360–365. (In Russian)
24. Vardanyan NS, Sevoyan GG, Vardanyan AK. Bioleaching of tailings resulting from beneficiation of polymetallic ores for recovery of valuable metals. *Solid State Phenomena*. 2017;262:113–117. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/SSP.262.113>
25. Levenets OO, Trukhin YuP. The influence of temperature conditions on bioleaching of sulfide cobalt-copper-nickel ore. *Gornyi informatsionno-analiticheskii byulleten' (nauchno-tekhnicheskii zhurnal) = Mining informational and analytical bulletin (scientific and technical journal)*. 2014;9:48–51. (In Russian)
26. Levenets OO, Khainasova TS, Balykov AA, Pozolotina LA. Bioleaching of sulfide cobalt-copper-nickel ore with variations of nutrient medium for chemolithotrophic microorganisms. *Gornyi informatsionno-analiticheskii byulleten' (nauchno-tekhnicheskii zhurnal) = Mining informational and analytical bulletin (scientific and technical journal)*. 2015;S63:291–296. (In Russian)
27. Tao J, Liu X, Luo X, Teng T, Jiang C, Drewniak L, et al. An integrated insight into bioleaching performance of chalcopyrite mediated by microbial factors: Functional types and bio-diversity. *Bioresource Technology*. 2020;319. Article number 124219. 10 p. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124219>
28. Gahan CS, Srichandan H, Kim D-J, Akcil A. Biohydrometallurgy and biomineral processing technology: a review on its past, present and future. *Research Journal of Recent Sciences*. 2012;1(10):85–99.
29. Gentina JC, Acevedo F., Application of bioleaching to copper mining in Chile. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2013;16(3). 14 p.

<https://doi.org/10.2225/vol16-issue3-fulltext-12>

30. Trukhin YP, Khainasova TS, Rogatykh SV. Isolation of chemolithotrophic microorganisms from Shanuch (Kamchatka) oxidized copper-nickel ore for bioleaching of sulphide ores. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2012;1:83–87. (In Russian)
31. Khainasova TS, Rogatuch SV, Kuzyakina TI, Kornilova TI. The oxidized ore is as a source of isolation of acidophilic chemolithotrophic microorganisms for bioleaching sulphidic copper-nickel ores. *Gornyi informatsionno-analiticheskii byulleten' (nauchno-tehnicheskii zhurnal) = Mining informational and analytical bulletin (scientific and technical journal)*. 2013;10:127–134. (In Russian)
32. Kanaev ZK, Bulaev AG, Kondrat'eva TF, Kanaev AT. Physiological properties of *Acidithiobacillus ferrooxidans* strains isolated from sulfide ore deposits in Kazakhstan. *Microbiology*. 2015;84(3):370–376. <https://doi.org/10.1134/S0026261715030091>
33. Van Hille RP, van Wyk N, Froneman T, Harrison STL. Dynamic evolution of the microbial community in BIOX leaching tanks. *Advanced Materials Research*. 2013;825:331–334. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.825.331>
34. Bulaev AG, Kanygina AV, Manolov AI. Genome analysis of *Acidiplasma* sp. MBA-1, a poly-extremophilic archaeon predominant in the microbial community of a bioleaching reactor. *Microbiology*. 2017;86(1):89–95. <https://doi.org/10.1134/S0026261716060059>
35. Dopson M, Baker-Austin C, Hind A, Bowman JP, Bond PL. Characterization of *Ferroplasma* isolates and *Ferroplasma acidarmanus* sp. nov., extreme acidophiles from acid mine drainage and industrial bioleaching environments. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004;70(4):2079–2088. <https://doi.org/10.1128/aem.70.4.2079-2088.2004>
36. Golyshina OV. Environmental, biogeographic, and biochemical patterns of archaea of the family Ferropasmaceae. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011;77(15):5071–5078. <https://doi.org/10.1128/AEM.00726-11>
37. Hallberg KB, Lindström EB. Characterization of *Thiobacillus caldus* sp. nov., a moderately thermophilic acidophile. *Microbiology*. 1994;140(12):3451–3456. <https://doi.org/10.1099/13500872-140-12-3451>
38. Levenets OO, Khainasova TS, Pozolotina LA. The modification of nutrient media for microorganisms for improvement of bioleaching physical-chemical parameters. *Gornyi informatsionno-analiticheskii byulleten' (nauchno-tehnicheskii zhurnal) = Mining informational and analytical bulletin (scientific and technical journal)*. 2016:S31:260–271. (In Russian)
39. Joshi PK, Swarup A, Maheshwari S, Kumar R, Singh N. Bioremediation of heavy metals in liquid media through fungi isolated from contaminated sources. *Indian Journal of Microbiology*. 2011;51(4):482–487. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0110-9>
40. Czajkowska T, Jaroniec M. Selectivity of alkylamide bonded-phases with respect to organic acids under reversed-phase conditions. *Journal of Chromatography A*. 1997;762(1–2):147–158. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(96\)00966-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(96)00966-1)
41. Logan BE, Regan M. Microbial fuel cell – challenges and applications. *Environmental Science & Technology*. 2006;40(17):5172–5180. <https://doi.org/10.1021/es0627592>
42. Logan BE, Hamelers B, Rozendal R, Schröder U, Keller J, Freguia S, et al. Microbial fuel cells: methodology and technology. *Environmental science & technology*. 2006;40(17):5181–5192. <https://doi.org/10.1021/es0605016>
43. García-Muñoz J, Amils R, Fernández VM, De Lacey AL, Malki M. Electricity generation by microorganisms in the sediment-water interface of an extreme acidic microcosm. *International Microbiology*. 2011;14(2):73–81. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.137>
44. Cheng S, Logan BE. Sustainable and efficient biohydrogen production via electrohydrogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(47):18871–18873. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706379104>
45. Borole AP, O'Neill H, Tsouris C, Cesar S. A microbial fuel cell operating at low pH using the acidophile *Acidiphilium cryptum*. *Biotechnology Letters*. 2008;30(8):1367–1372. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9700-y>
46. Mathis BJ, Marshall CW, Milliken CE, Makkar RS, Creager SE, May HD. Electricity generation by thermophilic microorganisms from marine sediment. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008;78(1):147–155. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1266-4>
47. Rojas C, Vargas IT, Bruns MA, Regan JM. Electrochemically active microorganisms from an acid mine drainage-affected site promote cathode oxidation in microbial fuel cells. *Bioelectrochemistry*. 2017;118:139–146. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2017.07.013>
48. Malki M, de Lacey AL, Rodríguez N, Amils R, Fernandez VM. Preferential use of an anode as an electron acceptor by an acidophilic bacterium in the presence of oxygen. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008;74(14):4472–4476. <https://doi.org/10.1128/AEM.00209-08>
49. Li X, Nie P, Ren Y, Wang X. Recovery of metal components from sulfide mineral tailings by microbial fuel cell. Patent USA, no. 9755261; 2017.
50. Huang T, Wei X, Zhang S. Bioleaching of copper sulfide minerals assisted by microbial fuel cells. *Bioresource Technology*. 2019;288:121561. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121561>
51. Sulonen ML, Kokko ME, Lakaniemi A-M, Puhakka JA. Electricity generation from tetrathionate in microbial fuel cells by acidophiles. *Journal of Hazardous Materials*. 2015;284:182–189. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.10.045>
52. Sulonen ML, Lakaniemi A-M, Kokko ME, Puhakka JA. Long-term stability of bioelectricity genera-

- tion coupled with tetrathionate disproportionation. *Bioresource Technology*. 2016;216:876–882. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.024>
53. Ni G, Christel S, Roman P, Wong ZL, Bijmans MF, Dopson M. Electricity generation from an inorganic sulfur compound containing mining wastewater by acidophilic microorganisms. *Research in Microbiology*. 2016;167(7):568–575. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.04.010>
54. Li Q, Becker T, Zhang R, Xiao T, Sand W. Investigation on adhesion of *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* via atomic force microscopy equipped with mineral probes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2019;173:639–646. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.10.046>
55. Ter Heijne A, Hamelers HVM, de Wilde V, Rozendal RA, Buisman CJN. A bipolar membrane combined with ferric iron reduction as an efficient cathode system in microbial fuel cells. *Environmental Science & Technology*. 2006;40(17):5200–5205. <https://doi.org/10.1021/es0608545>
56. Ter Heijne A, Hamelers HVM, Buisman CJN. Microbial fuel cell operation with continuous biological ferrous iron oxidation of the catholyte. *Environmental Science & Technology*. 2007;41(11):4130–4134. <https://doi.org/10.1021/es0702824>
57. Carbajosa S, Malki M, Caillard R, Lopez MF, Palomares FJ, Martín-Gago JA, et al. Electrochemical growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on a graphite electrode for obtaining a biocathode for direct electrocatalytic reduction of oxygen. *Biosensors and Bioelectronics*. 2010;26(2):877–880. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.07.037>
58. Chabert N, Bonnefoy V, Achouak W. Quorum sensing improves current output with *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Microbial Biotechnology*. 2018;11(1):136–140. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12797>
59. Ulusoy I, Dimoglo A. Electricity generation in microbial fuel cell systems with *Thiobacillus ferrooxidans* as the cathode microorganism. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2018;43(2):1171–1178. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.10.155>
60. Khamidullina IV, Khlebnikova TD, Khamidullin IR. Features of using sulphate reducing bacteria for sewage treatment from ions of heavy metals. *Bashkirskii khimicheskii zhurnal = Bashkir Chemical Journal*. 2012;19(3):147–151. (In Russian)
61. Agostino V, Rosenbaum MA. Sulfate-reducing electroautotrophs and their applications in bioelectrochemical systems. *Frontiers in Energy Research*. 2018;6:55. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2018.00055>
62. Hu J-P, Zeng C-P, Luo H-P, Liu G-L, Zhang R-D, Lu Y-B. Sulfate reduction and microbial community of autotrophic biocathode in response to externally applied voltage. *Huan Jing Ke Xue*. 2019;40(1):327–335. (In Chinese) <https://doi.org/10.13227/j.hjlx.201806171>
63. Blázquez E, Gabriel D, Baeza JA, Guisasola A. Evaluation of key parameters on simultaneous sulfate reduction and sulfide oxidation in an autotrophic biocathode. *Water Research*. 2017;123:301–310. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.06.050>
64. Bratkova S, Alexieva Z, Angelov A, Nikolova K, Genova P, Ivanov R, et al. Efficiency of microbial fuel cells based on the sulfate reduction by lactate and glucose. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2019;16(10):6145–6156. <https://doi.org/10.1007/s13762-019-02223-8>
65. Teng W, Liu G, Luo H, Zhang R, Xiang Y. Simultaneous sulfate and zinc removal from acid wastewater using an acidophilic and autotrophic biocathode. *Journal of Hazardous Materials*. 2016;304:159–165. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.10.050>
66. Fernández-Reyes JS, García-Meza JV. Bioelectrochemical system for the biooxidation of a chalcopyrite concentrate by acidophilic bacteria coupled to energy current generation and cathodic copper recovery. *Biotechnology Letters*. 2018;40(1):63–73. <https://doi.org/10.1007/s10529-017-2435-x>
67. Li X, Zheng Y, Nie P, Ren Y, Wang X, Liu Y. Synchronous recovery of iron and electricity using a single chamber air-cathode microbial fuel cell. *RSC Advances*. 2017;7(21):12503–12510. <https://doi.org/10.1039/C6RA28148F>
68. Ju WJ, Jho EH, Nam K. Effect of initial pH, operating temperature, and dissolved oxygen concentrations on performance of pyrite-fuel cells in the presence of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Hazardous Materials*. 2018;360:512–519. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.08.034>
69. Cao Y, Mu H, Liu W, Zhang R, Guo J, Xian M, et al. Electricigens in the anode of microbial fuel cells: pure cultures versus mixed communities. *Microbial Cell Factories*. 2019;18(1). Article number 39. 14 p. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1087-z>
70. Hernandez ME, Newman DK. Extracellular electron transfer. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 2001;58:1562–1571. <https://doi.org/10.1007/PL00000796>
71. Wang X, Roger M, Clément R, Lecomte S, Biaso F, Abriata LA, et al. Electron transfer in an acidophilic bacterium: interaction between a diheme cytochrome and a cupredoxin. *Chemical Science*. 2018;9(21):4879–4891. <https://doi.org/10.1039/c8sc01615a>
72. Hannemann F, Bichet A, Ewen KM, Bernhardt R. Cytochrome P450 systems-biological variations of electron transport chains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*. 2007;1770(3):330–344. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.07.017>
73. Vignais PM, Billoud B. Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview. *Chemical Reviews*. 2007;107(10):4206–4272. <https://doi.org/10.1021/cr050196r>
74. Reguera G, McCarthy KD, Mehta T, Nicoll JS, Tuominen MT, Lovley DR. Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature*. 2005;435(7045):1098–1101. <https://doi.org/10.1038/nature03661>
75. Zhao F, Slade RCT, Varcoe JR. Techniques for the study and development of microbial fuel cells: an electrochemical perspective. *Chemical Society Re-*

views. 2009;38(7):1926–1939. <https://doi.org/10.1039/b819866g>

76. Malvankar NS, Lovley DR. Microbial nanowires for bioenergy applications. *Current Opinion in Biotechnology*. 2014;27:88–95. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.12.003>

77. Gorby YA, Yanina S, McLean JS, Rosso KM, Moyle D, Dohnalkova A, et al. Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006; 103(30):11358–11363. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604517103>

78. Mukhaifi EA, Abduljaleel SA. Electric bacteria: a review. *Journal of Advanced Laboratory Research in Biology*. 2020;11(1):7–15.

79. He L, Du P, Chen Y, Lu H, Cheng X, Chang B, et al. Advances in microbial fuel cells for wastewater treatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2017;71:388–403. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.069>

80. Cox JC, Nicholls DG, Ingledew WJ. Transmembrane electrical potential and transmembrane pH gradient in the acidophile *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biochemical Journal*. 1979;178(1):195–200. <https://doi.org/10.1042/bj1780195>

81. Ingledew WJ. *Thiobacillus ferrooxidans* the bioenergetics of an acidophilic chemolithotroph. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Reviews on Bioenergetics*. 1982;683(2):89–117. [https://doi.org/10.1016/0304-4173\(82\)90007-6](https://doi.org/10.1016/0304-4173(82)90007-6)

82. Cavazza C, Guigliarelli B, Bertrand P, Bruschi M. Biochemical and EPR characterization of a high potential iron-sulfur protein in *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiology Letters*. 1995;130(2-3):193–199. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07719.x>

83. Fukumori Y, Yano T, Sato A, Yamanaka T. Fe (II)-oxidizing enzyme purified from *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiology Letters*. 1988;50(2-3):169–172. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1988.tb02932.x>

84. Copley JG, Haddock BA. The respiratory chain of *Thiobacillus ferrooxidans*: the reduction of cytochromes by Fe²⁺ and the preliminary characterization of rusticyanin a novel “blue” copper protein. *FEBS Letters*. 1975;60(1):29–33.

85. Cox JC, Boxer DH. The purification and some properties of rusticyanin, a blue copper protein involved in iron(II) oxidation from *Thiobacillus ferrooxidans*. *The Biochemical Journal*. 1978;174(2):497–502. <https://doi.org/10.1042/bj1740497>

86. Nunzi F, Woudstra M, Campese D, Bonicel J, Morin D, Bruschi M. Amino-acid sequence of rusticyanin from *Thiobacillus ferrooxidans* and its comparison with other blue copper proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1993;1162(1-2):28–34. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(93\)90123-9](https://doi.org/10.1016/0167-4838(93)90123-9)

87. Yarzabal A, Brasseur G, Ratouchniak J, Lund K, Lemesle-Meunier D, DeMoss JA, et al. The high-molecular-weight cytochrome c Cys2 of *Acidithiobacillus ferrooxidans* is an outer membrane protein. *Journal of Bacteriology*. 2002;184(1):313–317. <https://doi.org/10.1128/jb.184.1.313-317.2002>

88. Giudici-Orticoni M-T, Leroy G, Nitschke W, Bruschi M. Characterization of a new dihemic c(4)-type cytochrome isolated from *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biochemistry*. 2000;39(24):7205–7211. <https://doi.org/10.1021/bi992846p>

89. Elbehti A, Nitschke W, Tron P, Michel C, Lemesle-Meunier D. Redox components of cytochrome bc-type enzymes in acidophilic prokaryotes. I. Characterization of the cytochrome bc₁-type complex of the acidophilic ferrous ion-oxidizing bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal Biological Chemistry*. 1999;274(24):16766–16772. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.24.16760>

90. Díaz M, Castro M, Copaja S, Guilian N. Biofilm formation by the acidophile bacterium *Acidithiobacillus thiooxidans* involves c-di-GMP pathway and pel exopolysaccharide. *Genes*. 2018;9(2):113. <https://doi.org/10.3390/genes9020113>

91. Lovley DR, Holmes DE, Nevin KP. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Advances in Microbial Physiology*. 2004;49:219–286. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(04\)49005-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(04)49005-5)

92. Hartshorne RS, Reardon CL, Ross D, Nuester J, Clarke TA, Gates AJ, et al. Characterization of an electron conduit between bacteria and the extracellular environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(52):22169–22174. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900086106>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Калашникова Ольга Борисовна,
научный сотрудник,
Балтийский федеральный университет
им. Иммануила Канта,
236041, г. Калининград, ул. Университетская, 2,
Российская Федерация,
e-mail: kalashnikova_14@bk.ru

Кашевский Алексей Валерьевич,
к.х.н., доцент,
Иркутский государственный университет,

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Olga B. Kalashnikova,
Researcher,
Immanuel Kant Baltic Federal University,
2, Universitetskaya St., Kaliningrad, 236041,
Russian Federation,
e-mail: kalashnikova_14@bk.ru

Alexei V. Kashevskii,
Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Irkutsk State University,

664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
e-mail: caribcar@mail.ru

Варданян Нарине Сережаевна,
д.б.н., профессор,
заведующая лабораторией геомикробиологии,
Научно-производственный центр
«Армбиотехнология» Национальной академии
наук Республики Армения,
0056, г. Ереван, ул. Гюрдзьяна, 14,
Республика Армения,
e-mail: nvard@sci.am;
vardanyannarine@gmail.com

Эрдэнэчимэг Долгор,
д.х.н., профессор кафедры химической
и биологической инженерии,
Институт инженерных и прикладных наук,
Монгольский государственный университет,
210646, г. Улан-Батор,
ул. Гос. Университетская -1, 1, Монголия,
e-mail: erdenechimeg@seas.num.edu.mn

Жданова Галина Олеговна,
научный сотрудник,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
✉ e-mail: zhdanova86@ya.ru

Топчий Иван Анатольевич,
лаборант-исследователь,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
e-mail: topchiyi@inbox.ru

Понаморева Ольга Николаевна,
д.х.н., заведующая кафедрой биотехнологии,
Тульский государственный университет,
300012, г. Тула, пр-т Ленина, 92,
Российская Федерация,
e-mail: olgaPONAMOREVA@mail.ru

Вятчина Ольга Фёдоровна,
к.б.н., доцент,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
e-mail: olgairk3@rambler.ru

Стом Дэвард Иосифович,
д.б.н., профессор,
заведующий лабораторией
водной токсикологии,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,

1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
e-mail: caribcar@mail.ru

Narine S. Vardanyan,
Dr. Sci. (Biology), Professor,
Head of Laboratory of Geomicrobiology,
Research and Production Center
"Armbiotechnology" of the National Academy
of Sciences of the Republic of Armenia,
14, Gyurdzhyan St., Yerevan, 0056, Armenia
e-mail: nvard@sci.am,
vardanyannarine@gmail.com

Dolgor Erdenechimeg,
Dr. Sci. (Chemistry), Professor,
Department of Chemical and Biological
Engineering,
School of Engineering and Applied Science,
National University of Mongolia,
1, Ikh Surguuliin Gudamj-1,
Ulaanbaatar, 210646, Mongolia,
e-mail: erdenechimeg@seas.num.edu.mn

Galina O. Zhdanova,
Researcher,
Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
✉ e-mail: zhdanova86@ya.ru

Ivan A. Topchy,
Research Laboratory Assistant,
Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
e-mail: topchiyi@inbox.ru

Olga N. Ponamoreva,
Dr. Sci. (Chemistry),
Head of Biotechnology Department,
Tula State University,
92, Lenin Ave., Tula, 300012,
Russian Federation,
e-mail: olgaPONAMOREVA@mail.ru

Olga F. Vyatchina,
Cand. Sci. (Biology), Associate Professor,
Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
e-mail: olgairk3@rambler.ru

Devard I. Stom,
Dr. Sci. (Biology), Professor,
Head of the Laboratory of Water Toxicology,
Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,

Российская Федерация;
главный научный сотрудник,
Байкальский музей ИНЦ,
664520, п. Листвянка, ул. Академическая, 1,
Российская Федерация,
e-mail: stomd@mail.ru

Chief Researcher,
Baikal Museum ISC,
1, Akademicheskaya St., Listvyanka, 664520,
Russian Federation,
e-mail: stomd@mail.ru

Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта ин-
тересов.

*Все авторы прочитали и одобрили оконча-
тельный вариант рукописи.*

*Поступила в редакцию 19.09.2020.
Одобрена после рецензирования 06.11.2020.
Принята к публикации 28.02.2021.*

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests re-
garding the publication of this article.

*The final manuscript has been read and ap-
proved by all the co-authors.*

*The article was submitted 19.09.2020.
Approved after reviewing 06.11.2020.
Accepted for publication 28.02.2021.*

Оригинальная статья / Original article

УДК 582.711.711: 577.13

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-53-60>



Фенольные соединения листьев и соцветий *Spiraea baldshuanica* B. Fedtsch.

© В.А. Костикова***, К.А. Бобокалонов***, А.А. Кузнецов**

* Центральный сибирский ботанический сад СО РАН,
г. Новосибирск, Российская Федерация

** Томский государственный университет, г. Томск, Российская Федерация

*** Институт ботаники, физиологии и генетики растений АН Республики Таджикистан,
г. Душанбе, Республика Таджикистан

Резюме: Впервые исследованы состав и содержание фенольных соединений в листьях и соцветиях *Spiraea baldshuanica* B. Fedtsch. Материал собран в июне 2019 г. в природной популяции в Республике Таджикистан. Фенольные соединения изучены в водно-этанольных 40%-х экстрактах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Аналитическая ВЭЖХ-система состоит из жидкостного хроматографа Agilent 1200 (США) с диодно-матричным детектором, автосамплером и системой для сбора и обработки хроматографических данных ChemStation. В нативных экстрактах из соцветий обнаружено 15 соединений фенольной природы, из листьев – 11 веществ. Из них идентифицированы хлорогеновая и коричная кислоты, кверцетин, кемпферол, гиперозид, изокверцитрин, авикулярин и астрагалин. Хроматографические профили листьев и соцветий различаются. В соцветиях *S. baldshuanica* обнаружены изокверцитрин, авикулярин, кемпферол, которые отсутствуют в листьях. В соцветиях концентрация всех обнаруженных фенольных соединений выше, чем в листьях. Мажорным компонентом в соцветиях является астрагалин (3,16 мг/г), концентрация которого в 5 раз больше, чем в листьях (0,60 мг/г). Путем кислотного гидролиза соляной кислотой (1:1) водно-этанольных экстрактов из листьев и соцветий *S. baldshuanica* обнаружено 3 флавонолагликона – кверцетин, кемпферол и изорамнетин. При пересчете концентрации аглика на соответствующий гликозид выявлено, что в листьях и соцветиях преобладают гликозиды кверцетина (6,67 мг/г – в соцветиях, и 1,19 мг/г – в листьях). *S. baldshuanica* сильно отличается от других представителей растений рода *Spiraea* секции *Calospira* по хроматографическому профилю фенольных соединений из листьев. Это является дополнительным подтверждением выделения ее в отдельный ряд *Decumbentes* по морфологическим признакам.

Ключевые слова: *Spiraea baldshuanica*, флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты, высокоэффективная жидкостная хроматография

Благодарности: Работа выполнена в рамках государственного задания Центрального сибирского ботанического сада СО РАН (проект № АААА-А21-121011290025-2, а также при финансовой поддержке гранта Президента РФ для молодых ученых – кандидатов наук (проект № МК-1045.2020.4).

Для цитирования: Костикова В.А., Бобокалонов К.А., Кузнецов А.А. Фенольные соединения листьев и соцветий *Spiraea baldshuanica* B. Fedtsch. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т. 11. N 1. С. 53–60. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-53-60>

Phenolic compounds in the leaves and inflorescences of *Spiraea baldshuanica* B. Fedtsch.

Vera A. Kostikova***, Kobil A. Bobokalonov***, Aleksandr A. Kuznetsov**

*Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch Russian Academy of Science,
Novosibirsk, Russian Federation

**Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation

***Institute of Botany, Plant Physiology and Genetics of the Academy of Sciences
of the Republic of Tajikistan, Dushanbe, Tajikistan

Abstract: For the first time, the composition and content of phenolic compounds in the leaves and inflorescences of *Spiraea baldshuanica* B. Fedtsch. was investigated. Research material was collected in June 2019 from a natural population in the Republic of Tajikistan. Phenolic compounds were studied in 40% water-ethanol extracts by the method of high-performance liquid chromatography (HPLC). The analytical HPLC

system used consisted of an Agilent 1200 (USA) liquid chromatograph equipped with a diode array detector, an autosampler and a ChemStation system for collecting and processing chromatographic data. 15 and 11 compounds of phenolic nature were found in native extracts from inflorescences and leaves, respectively. Among them, the following substances were identified: chlorogenic and cinnamic acids, quercetin, kaempferol, hyperoside, isoquercitrin, avicularin and astragalin. The chromatographic profiles of leaves and inflorescences were found to be different. Such substances as isoquercitrin, avicularin, kaempferol were discovered in the inflorescences of *S. baldshuanica*, rather than in its leaves. Compared to the leaves, the concentration of all detected phenolic compounds was higher in the inflorescences under study. The major component in the inflorescences was astragalin (3.16 mg/g), whereas its concentration in the leaves was 5 times lower (0.60 mg/g). Flavonoid aglycones were obtained from the water-ethanol extracts of the leaves and inflorescences under study by acid hydrolysis using hydrochloric acid (1:1). The hydrolysates of extracts from the leaves and inflorescences of *S. baldshuanica* were found to contain 3 flavonoid aglycones: quercetin, kaempferol and isorhamnetin. By recalculating the concentration of aglycone for the corresponding glycoside, it was determined that quercetin glycosides prevails: 6.67 mg/g – in the inflorescences and 1.19 mg/g – in the leaves. *S. baldshuanica* differs significantly from other representatives of the *Spiraea* genus, section *Calospira*, in terms of the chromatographic profile of phenolic compounds contained in the leaves. This information serves as an additional argument for differentiating *S. baldshuanica* as a separate series of the *Decumbentes* group by morphological signs.

Keywords: *Spiraea baldshuanica*, flavonoids, phenolic acids, high-performance liquid chromatography

Acknowledgments: This work was carried out within the framework of the state assignment of the Central Siberian Botanical Garden of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (project No. AAAA-A21-121011290025-2), as well as with the financial support of a grant of the President of the Russian Federation for young scientists - candidates of sciences (project No. MK-1045.2020.4).

For citation: Kostikova VA, Bobokalonov KA, Kuznetsov AA. Phenolic compounds in the leaves and inflorescences of *Spiraea baldshuanica* B. Fedtsch. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(1):53–60. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-53-60>

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время актуальным является поиск новых источников биологически активных веществ растительного происхождения. Фенольные соединения – наиболее распространенные вторичные метаболиты растений. Они выполняют жизненно важную роль в структурной целостности растений, УФ-защите, размножении и внутренней регуляции физиологии и передаче сигналов растительных клеток [1, 2]. Благодаря высокой биологической активности растительные полифенолы успешно используются в пищевой и легкой промышленности, а также в медицине и фармакологии в качестве веществ, обладающих капилляроукрепляющей, нейрорегуляторной, биостатической, иммуномодулирующей и противоопухолевой активностью [2–6].

Spiraea baldshuanica В. Fedtsch. (спирей бальджуанская) – это ветвистый кустарник высотой до 60 см, имеющий обратнояйцевидные листья, его соцветия – рыхлые щитковидные метелки с белыми цветками. Произрастает на скалах и каменистых склонах, на гипсоносных известняках на высоте 1100–2300 м н.у.м. Является эндемом гор Памиро-Алая (Средняя Азия)¹.

S. baldshuanica принадлежит к растениям рода *Spiraea* секции *Calospira* С. Koch². Представители этой секции отличаются щитковидными соцветиями. По строению соцветия *S. baldshuanica* выделяется в секции *Calospira* в отдельный ряд *Decumbentes* А. Роjarк² [7]. Состав и содержание фенольных соединений листьев некоторых азиатских представителей данной секции растений рода *Spiraea* подробно изучен нами ранее [8]. Выявлена видоспецифичность качественного состава фенольных соединений в водно-этанольных экстрактах из листьев *S. betulifolia* Pall., *S. betulifolia* subsp. *aemiliana* (С.К. Schneid.) Н. Hara и *S. beauverdiana* Schneid. Обнаружены хеомасы исследуемых спирей [8].

Представители рода высокодекоративны, образуют множество форм и сортов, широко используются в традиционной медицине и имеют большой ресурсный потенциал. Так, в китайской медицине *Spiraea* применяются как лекарственные растения с анальгетическими, противокашлевыми, жаропонижающими и противовоспалительными свойствами [9]. В целом в растениях из рода *Spiraea* обнаружен широкий спектр соединений с высокой биологической активностью:

¹Лазарева М.С. Род Таволга – *Spiraea* L. В кн.: Флора Таджикской ССР. Т. IV. Роголистниковые – Розоцветные. Л.: Наука. 1975. С. 291–295.

²Пояркова А.И. Род Спирей – *Spiraea* L. // Флора СССР. В 30 т. / гл. ред. акад. В.Л. Комаров; ред. тома С.В. Юзепчук. М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1939. Т. 9. С. 283–305

флавонолы, флавоны, флаваны, кумарины, каротиноиды, монотерпены, терпеноиды, неолигнаны и другие [10–12]. Выявлены разнообразные полезные свойства веществ, выделенных из надземных и подземных органов растений рода *Spiraea* [11, 13]. Ранее нами обнаружена противовирусная и антиоксидантная активность экстрактов листьев и соцветий отдельных представителей рода *Spiraea* [14, 15]. Биологически активные вещества, в том числе и фенольные соединения, *S. baldshuanica* не изучены.

Цель работы – исследование фенольных соединений, содержащихся в листьях и соцветиях *S. baldshuanica*, методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектом для исследования фенольных соединений послужили листья и соцветия *S. baldshuanica*. Материал собран 27 июня 2019 г. в природной популяции в Республике Таджикистан на южном склоне Гиссарского хребта в бассейне реки Варзоб (ущелье Кондара, окрестности Варзобской горно-ботанической станции) на скалах под пологом чернолесья (формация кленовики, *Acer turkestanicum* Pax. В сообществе преобладают *Juniperus sibirica* Burgh., *Juglans regia* L., *Prunus sogdiana* Vass., *Vitis vinifera* L., *Berberis heterobotrys* E. Wolf., *Rubus caesius* L., *Hypericum perforatum* L., *Origanum tyttanthum* Gontsch., *Ferula karategina* Lipsky ex Korov. и др.). Растения собраны в фазе цветения – начало образования плодов.

Сырье высушивали на воздухе в затененном месте, после чего измельчали до диаметра 2–3 мм, перемешивали и отбирали репрезентативную пробу.

Для изучения фенольных соединений использовали водно-этанольные извлечения (40%-й этиловый спирт) из листьев и соцветий *S. baldshuanica*, полученные экстракцией на водяной бане. Точную навеску измельченного воздушно-сухого материала экстрагировали дважды: сначала 30 мл – в течение 30 мин, затем 20 мл – в течение 20 мин. После фильтрации остаток в колбе и на фильтре промывали 5 мл 40%-го этилового спирта. После этого объединенный экстракт концентрировали в фарфоровых чашечках до 10–15 мл (точный объем). Анализ проводили в двух повторностях [16].

1 мл водно-этанольного экстракта разбавляли бидистиллированной водой до 5 мл и пропускали через концентрирующий патрон Диапак С16 (ЗАО «БиоХимМак»). Вещества смывали с патрона 3 мл 40%-го водно-этанольного раствора, а затем 2 мл 96%-го этанола. Объединенный элюат пропускали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Анализ фенольных соединений, содержащихся в элюате, проводили на аналитической ВЭЖХ-системе, состоящей из жидкостного хро-

матографа Agilent 1200 (США) с диодно-матричным детектором, автосамплером и системой для сбора и обработки хроматографических данных ChemStation, модифицировав методику T.A. van Beek [17]. Колонка Zorbax SB-C18, 4,6×150 мм, 5 мкм. Разделение проводили в следующих условиях: градиент от 31 до 33% метанола, подкисленного ортофосфорной кислотой (0,1%), в течение 27 мин. Далее в подвижной фазе содержание метанола в водном растворе ортофосфорной кислоты (0,1%) изменялось от 33 до 46% за 11 мин, затем от 46 до 56% – за следующие 12 мин, и от 56 до 100% – за 4 мин (система I). Скорость потока элюента – 1 мл/мин, температура колонки – 26 °С, объем вводимой пробы – 10 мкл. Детектирование осуществляли при длинах волн λ = 254, 270, 290, 340, 360 и 370 нм.

Количественное определение индивидуальных компонентов в образцах растений проводили по методу внешнего стандарта при λ = 360 нм [17]. Для приготовления стандартных образцов использовали кофейную и коричную кислоты («Serva», Германия), хлорогеновую и *n*-кумаровую кислоты, кверцетин («Sigma-Aldrich», США) эллаговую кислоту, изокверцитрин, рутин, авикулярин, астрагалин и гиперозид («Fluka», Германия). Стандартные растворы готовили в концентрации 10 мкг/мл.

Из-за отсутствия доступных стандартных образцов и сложных условий разделения для определения содержания флавонолгликозидов в экстрактах из листьев и соцветий *S. baldshuanica* методом ВЭЖХ проводили анализ свободных агликонов. Для этого к 0,5 мл извлечения прибавляли равный объем HCl (2 н), нагревали на кипящей водяной бане в течение 2 ч. После охлаждения гидролизат разбавляли бидистиллированной водой до 5 мл и пропускали через концентрирующий патрон Диапак. Агликоны смывали 5 мл 96%-го этанола и пропускали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Далее, применив градиентный режим элюирования, хроматографический анализ проводили в системе II: в подвижной фазе содержание метанола в водном растворе ортофосфорной кислоты (0,1%) изменялось от 45 до 48% за 18 мин. Детектирование осуществляли при длине волны λ = 250, 270, 290, 325, 340, 350, 360, 370 нм. Содержание флавонолгликозидов (отдельно гликозидов кверцетина, кемпферола и изорамнетина) в образцах растений рассчитывали по содержанию свободных агликонов, образующихся после кислотного гидролиза [17]. Для пересчета концентрации агликona на соответствующий гликозид применяли известные из литературных данных коэффициенты: 2,504 – для кверцетина, 2,588 – для кемпферола и 2,437 – для изорамнетина [18].

Относительное стандартное отклонение по-

вторяемости при определении фенольных компонентов составило $\sigma_{\text{отн}} = 0,011$, относительное стандартное отклонение по времени удерживания у метода ВЭЖХ – 0,0018.

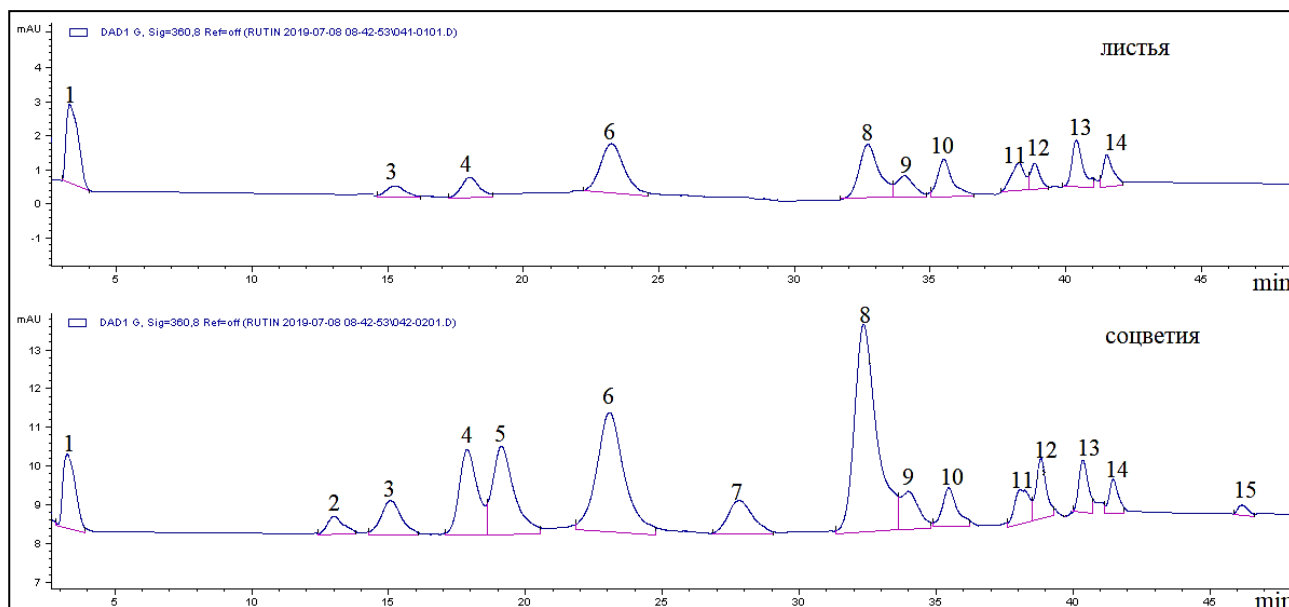
РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

Исследование состава фенольных соединений показало, что в водно-этанольных извлечениях из листьев *S. baldshuanica* содержится 11, а в соцветиях – 15 соединений (таблица, рисунок).

Характеристика и содержание фенольных соединений, обнаруженных в листьях и соцветиях *Spiraea baldshuanica*
Characteristic and content of the phenolic compounds detected by HPLC in the extracts of *Spiraea baldshuanica* leaves and inflorescences

Номер соединения	Соединение	Время удерживания, t_R , мин.	Спектральная характеристика, λ_{max} , нм	Содержание*, мг/г в пересчете на воздушно-сухое сырье	
				лист	соцветие
Нативные экстракты (система I)					
1	Хлорогеновая кислота	3,2	244, 300 пл, 330	0,51±0,02	0,66±0,02
2	Компонент 2	13,0	—	н.о.	0,37±0,01
3	Флавонол	15,2	250, 265 пл, 355	0,29±0,01	0,56±0,02
4	Гиперозид	18,0	255, 268 пл.,355	0,29±0,01	0,96±0,04
5	Изокверцитрин	19,3	259, 266 пл., 358	н.о.	1,23±0,05
6	Флавои	23,8	250, 340	0,71±0,03	1,86±0,07
7	Авикулярин	28,4	260, 270 пл, 360	н.о.	0,71±0,03
8	Астрагалин	32,5	265, 300 пл., 350	0,60±0,02	3,16±0,12
9	Фенолокислота	34,2	240, 300 пл., 330	0,34±0,01	1,04±0,04
10	Коричная кислота	35,9	216, 270	0,30±0,01	0,37±0,01
11	Флавонол	37,8	260, 300 пл., 360	0,28±0,01	0,39±0,01
12	Флавонол	38,1	265, 300 пл., 355	0,21±0,01	0,38±0,01
13	Кверцетин	40,6	255, 372	0,22±0,01	0,34±0,01
14	Фенолокислота	41,5	225, 300 пл, 315	0,23±0,01	0,29±0,01
15	Кемпферол	46,9	266, 370	н.о.	0,25±0,01
Гидролизаты (система II)					
I	Кверцетин	6,6	255, 372	1,19±0,04	6,67±0,25
II	Кемпферол	10,7	266, 370	0,75±0,03	3,53±0,13
II	Изорамнетин	12,4	265,370	н.о.	0,21±0,01
IV	Флавонол	13,5	265, 370	0,43±0,02	0,79±0,03

Примечание. * – представлены средние арифметические значения определений и их стандартные отклонения; «—» – вещество не идентифицировано; н.о. – соединение не обнаружено.



Хроматограммы 40%-х водно-этанольных извлечений из листьев и соцветий растений *S. baldshuanica* при 360 нм в системе растворителей I. По оси абсцисс – время удерживания, мин.; по оси ординат – сигнал детектора, единица оптической плотности. Номер пика соответствует номеру соединения в таблице

Chromatograms of the 40% water-ethanol extracts from *S. baldshuanica* leaves and inflorescences in solvent system I (detection at 360 nm). On the X-axis: retention time, min; on the Y-axis: the detector signal, in units of optical density. The peak number corresponds to the ID number of a compound in the Table

На основании УФ-спектров и сопоставления времени удерживания пиков веществ на хроматограммах анализируемых образцов с временем удерживания пиков стандартных образцов идентифицированы 2 кислоты – хлорогеновая и коричная, а также 6 флавонолов – кверцетин и его гликозиды (гиперозид, изокверцитрин, авикулярин), кемпферол и его гликозид астрагалин. Остальные компоненты не идентифицированы, но в процессе хроматографирования в режиме online были зарегистрированы их УФ-спектры. Неидентифицированные соединения согласно спектральным характеристикам отнесены к флавонолам, фенолкарбоновым кислотам и флавонам [1, 19].

Сравнительный анализ показал, что хроматографические профили листьев и соцветий *S. baldshuanica* отличаются. В соцветиях обнаружены изокверцитрин, авикулярин, кемпферол, соединение № 2, которые отсутствуют в листьях. Основными веществами в экстрактах из листьев *S. baldshuanica* являются хлорогеновая кислота, астрагалин и флавоны (6). Главными компонентами в соцветиях *S. baldshuanica*, кроме вышеперечисленных соединений, также являются гиперозид, изокверцитрин, авикулярин и фенолокислота (9).

В листьях *S. baldshuanica* содержание флавоноидов и фенолкарбоновых кислот низкое, менее 1 мг/г. В соцветиях содержание всех обнаруженных фенольных соединений выше, чем в листьях. Более высокая концентрация в соцветиях изокверцитрина (1,23 мг/г), флавоны (6) (1,86 мг/г) и фенолокислоты (9) (1,04 мг/г). Мажорный компонент в соцветиях – астрагалин, его содержание составило 3,16 мг/г, что в 5 раз больше, чем в листьях (0,60 мг/г). Астрагалин, гликозид кемпферола, является биологически активным флавоноидом и проявляет разнообразные фармакологические свойства, такие как противовоспалительные, антиоксидантные, нейропротекторные, кардиопротекторные, противостенокардические, противоопухолевые, противоязвенные и противодиабетические [20]. В дальнейшем возможно исследование соцветий *S. baldshuanica* на проявление всех перечисленных видов активности.

Для анализа содержания флавонолгликозидов по отдельности был проведен кислотный гидролиз водно-этанольных экстрактов листьев и соцветий. В результате хроматографического анализа в системе растворителей II в листьях *S. baldshuanica* обнаружены три флавонолагликона – кверцетин, кемпферол и изорамнетин, среди которых преобладал кверцетин. Обнаружен также еще один флавонол (IV, $t_R = 13,5$ мин). При пересчете концентрации агликона на соответствующий гликозид выявлено, что концентрация гликозидов кверцетина в соцветиях составила 6,67 мг/г, кемпферола – 3,53 мг/г. В листьях содержание гликозидов квер-

цетина снижено практически в шесть раз, кемпферола – в три раза (см. таблицу). Сумма гликозидов изорамнетина и флавонола (IV) в листьях и соцветиях *S. baldshuanica* сравнительно невысока – менее 1 мг/г.

Отметим, что в экстрактах из листьев *S. baldshuanica* соединения фенольной природы представлены в меньшем составе по сравнению с составом в экстрактах из листьев других представителей рода *Spiraea* секции *Calospira*. Данные по составу и содержанию в листьях таксонов этой секции представлены в работе [20]. В листьях *S. betulifolia*, *S. beauverdiana* и *S. betulifolia* subsp. *aemiliana* обнаружено не менее 25 соединений. В листьях спиреи бальджуанской не выявлены многие соединения, в том числе *n*-кумаровая кислота, таксифолин (дигидрокверцетин), рутин, эллаговая кислота, идентифицированные в листьях других растений рода *Spiraea* секции *Calospira*. Содержание гиперозида в листьях *S. baldshuanica* (0,29 мг/г) сравнимо только с содержанием в листьях *S. betulifolia* (0,13–1,55 мг/г). В листьях *S. beauverdiana* (1,03–4,30 мг/г) и *S. betulifolia* subsp. *aemiliana* (3,19–9,50 мг/г) концентрация гиперозида выше. Содержание остальных идентифицированных веществ в листьях исследуемых таксонов равнозначна.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые исследованы состав и содержание фенольных соединений в листьях и соцветиях *S. baldshuanica* методом ВЭЖХ. Обнаружено 15 соединений фенольной природы в нативных экстрактах из листьев и соцветий. Из них идентифицированы хлорогеновая и коричная кислоты, кверцетин, кемпферол, гиперозид, изокверцитрин, авикулярин и астрагалин. Хроматографические профили листьев и соцветий различаются. В соцветиях *S. baldshuanica* обнаружены изокверцитрин, авикулярин, кемпферол, которые отсутствуют в листьях. Мажорным компонентом в соцветиях является астрагалин (3,16 мг/г), концентрация которого в 5 раз больше, чем в листьях (0,60 мг/г).

В гидролизатах экстрактов из листьев и соцветий *S. baldshuanica* обнаружено 3 агликона флавонолов – кверцетин, кемпферол и изорамнетин. Во всех гидролизатах преобладает кверцетин. Концентрация гликозидов кверцетина в соцветиях составила 6,67 мг/г, в листьях – 1,19 мг/г.

По хроматографическому профилю состав фенольных соединений листьев *S. baldshuanica* сильно отличается от состава экстрактов из листьев других представителей растений рода *Spiraea* секции *Calospira*, что является дополнительным подтверждением выделения ее в отдельный ряд *Decumbentes* по морфологическим признакам.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Запрометов М.Н. Фенольные соединения: распространение, метаболизм и функции в растениях. М.: Наука, 1993. 271 с.
2. Ferreyra M.L.F., Rius S.P., Casati P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications // *Frontiers in Plant Science*. 2012. Vol. 3. Article number 222. 15 p. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00222>
3. Weinreb O., Amit T., Youdim M.B.H. The application of proteomics for studying the neurorescue activity of the polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2008. Vol. 476. Issue 2. P. 152–160. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.01.004>
4. Antonio A.M., Druse M.J. Antioxidants prevent ethanol-associated apoptosis in fetal rhombencephalic neurons // *Brain Research*. 2008. Vol. 1204. P. 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.02.018>
5. Bepalov V.G., Alexandrov V.A., Vysochina G.I., Kostikova V.A., Baranenko D.A. The Inhibiting Activity of Meadowsweet Extract on Neurocarcinogenesis Induced Transplacentally in Rats by Ethylnitrosourea // *Journal of Neuro-Oncology*. 2017. Vol. 131. Issue 3. P. 459–467. <https://doi.org/10.1007/s11060-016-2323-6>
6. Zengin G., Mocan A., Uysal S., Ceylan R., Cıřan G., Aktumsek A. A review of phenolic compounds from medicinal plants and nutraceuticals, and their characterization by different antioxidant assays. In: Lokatelli M., Celia C. (ed.). *Analytical Chemistry: Developments, Applications and Challenges in Food Analysis*. New-York: NOVA Science Publishers Inc., 2017. P. 77–103.
7. Businsky R., Businska L. The genus *Spiraea* in cultivation in Bohemia, Moravia and Slovakia // *Acta Pruhoniciana*. Vol. 72. Průhonice, 2002. 165 p.
8. Кости́кова В.А., Кузнецов А.А., Тищенко Э.Д., Файзылхакова А.Н. Хемотаксономическое изучение *Spiraea aemiliana* в сравнении с близкородственными видами *S. betulifolia* и *S. beauverdiana* // *Acta Biologica Sibirica*. 2019. Т. 5. N 3. С. 15–21. <http://doi.org/10.14258/abs.v5.i3.6352>
9. Teng Y., Yang Q., Yu Z., Zhou G., Sun Q., Jin H., et al. *In vitro* antimicrobial activity of the leaf essential oil of *Spiraea alpina* Pall // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2010. Vol. 26. Issue 1. P. 9–14. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0134-z>
10. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейства Hydraginaceae – Haloragaceae. Л.: Наука, 1987. 328 с.
11. Kashchenko N.I., Chirikova N.K., Olennikov D.N. Acylated flavonoids from *Spiraea* genus as inhibitors of α -amylase // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2018. Vol. 44. Issue 7. P. 876–886. <https://doi.org/10.1134/S1068162018070051>
12. Sun S., Liu Y., Liu X., Zhang S., Wang W., Wang R., et al. Neolignan glycosides from *Spiraea salicifolia* and their inhibitory activity on pro-inflammatory cytokine interleukin-6 production in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells // *Natural Product Research*. 2019. Vol. 33. Issue 22. P. 3215–3222. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1468329>
13. Ma Y., Mao X.-Y., Huang L.-J., Fan Y.-M., Gu W., Yan C., et al. Diterpene alkaloids and diterpenes from *Spiraea japonica* and their anti-Tobacco mosaic virus activity // *Fitoterapia*. 2016. Vol. 109. P. 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.11.019>
14. Кости́кова В.А., Филиппова Е.И., Высочина Г.И., Мазуркова Н.А. Противовирусная активность растений рода *Spiraea* (Rosaceae), произрастающих в азиатской части России // Сохранение разнообразия растительного мира в ботанических садах: традиции, современность, перспективы: материалы Международной конференции, посвященной 70-летию Центрального сибирского ботанического сада (Новосибирск, 1–8 августа 2016 г.). Новосибирск: Изд-во ЦСБС СО РАН, 2016. С. 156–157.
15. Kostikova V.A., Shaldaeva T.M. The antioxidant activity of the Russian Far East representatives of the genus *Spiraea* L. (Rosaceae Juss.) // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2016. Vol. 43. Issue 7. P. 790–794. <https://doi.org/10.1134/S1068162017070081>
16. Кости́кова В.А. Определение оптимальных условий экстракции для исследования состава фенольных соединений *Spiraea betulifolia* Pall. методом ВЭЖХ // *Химия растительного сырья*. 2017. N 1. С. 159–162. <https://doi.org/10.14258/jcprm.2017011417>
17. Van Beek T.A. Chemical analysis of *Ginkgo biloba* leaves and extracts // *Journal of Chromatography A*. 2002. Vol. 967. Issue 1. P. 21–55. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00172-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00172-3)
18. Van Beek T.A., Montoro P. Chemical analysis and quality control of *Ginkgo biloba* leaves, extracts, and phytopharmaceuticals // *Journal of Chromatography A*. 2009. Vol. 1216. Issue 11. P. 2002–2032. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.01.013>
19. Корупкин Д.Ю., Абилов Ж.А., Музычкина Р.А., Толстиков Г.А. Природные флавоноиды. Новосибирск: Гео, 2007. 232 с.
20. Riaz A., Rasul A., Hussain G., Zahoor M.K., Jabeen F., Subhani Z., et al. Astragalin: a bioactive phytochemical with potential therapeutic activities // *Advances in pharmacological sciences*. 2018. Vol. 2018. Article ID 9794625. 15 p. <https://doi.org/10.1155/2018/9794625>

REFERENCE

1. Zaprometov MN. *Phenolic compounds: distribution, metabolism and functions in plants*. Moscow: Nauka; 1993. 271 p. (In Russian)
2. Ferreyra MLF, Rius SP, Casati P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*. 2012;3.

Article number 222. 15 p. <https://doi.org/10.3389/fp-Is.2012.00222>

3. Weinreb O, Amit T, Youdim MBH. The application of proteomics for studying the neurorescue activity of the polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2008;476(2):152–160. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.01.004>

4. Antonio AM, Druse MJ. Antioxidants prevent ethanol-associated apoptosis in fetal rhombencephalic neurons. *Brain Research*. 2008;1204:16–23. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.02.018>

5. Bepalov VG, Alexandrov VA, Vysochina GI, Kostikova VA, Baranenko DA. The Inhibiting Activity of Meadowsweet Extract on Neurocarcinogenesis Induced Transplacentally in Rats by Ethylnitrosourea. *Journal of Neuro-Oncology*. 2017;131(3):459–467. <https://doi.org/10.1007/s11060-016-2323-6>

6. Zengin G, Mocan A, Uysal S, Ceylan R, Cişan G, Aktumsek A. A review of phenolic compounds from medicinal plants and nutraceuticals, and their characterization by different antioxidant assays. In: Lokatelli M, Celia C. (eds.). *Analytical Chemistry: Developments, Applications and Challenges in Food Analysis*. New-York: NOVA Science Publishers Inc.; 2017. P. 77–103.

7. Businsky R, Businska L. The genus *Spiraea* in cultivation in Bohemia, Moravia and Slovakia. *Acta Pruhoniana*. Vol. 72. Průhonice, 2002. 165 p.

8. Kostikova VA, Kuznetsov AA, Tishchenko ED, Fayzylkhakova AN. Chemotaxonomic study of *Spiraea aemiliana* compared to the closely species *S. betulifolia* and *S. beauverdiana*. *Acta Biologica Sibirica*. 2019;5(3):15–21. (In Russian) <http://doi.org/10.14258/abs.v5.i3.6352>

9. Teng Y, Yang Q, Yu Z, Zhou G, Sun Q, Jin H, et al. *In vitro* antimicrobial activity of the leaf essential oil of *Spiraea alpina* Pall. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2010;26(1):9–14. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0134-z>

10. *Plant resources of the USSR: flowering plants, their chemical composition, use. Family Hydraginaceae – Haloragaceae*. Leningrad: Nauka; 1987. 1987. 328p. (In Russian)

11. Kashchenko NI, Chirikova NK, Olennikov DN. Acylated flavonoids from *Spiraea* genus as inhibitors of α -amylase. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2018;44(7):876–886. <https://doi.org/10.1134/S1068162018070051>

12. Sun S, Liu Y, Liu X, Zhang S, Wang W, Wang R, et al. Neolignan glycosides from *Spiraea salicifolia* and their inhibitory activity on proinflammatory cytokine interleukin-6 production in lipopoly-

saccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *Natural Product Research*. 2019;33(22):3215–3222. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1468329>

13. Ma Y, Mao X-Y, Huang L-J, Fan Y-M, Gu W, Yan C, et al. Diterpene alkaloids and diterpenes from *Spiraea japonica* and their anti-Tobacco mosaic virus activity. *Fitoterapia*. 2016;109:8–13. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.11.019>

14. Kostikova VA, Filippova EI, Vysochina GI, Mazurkova NA. Antiviral activity of plants of the genus *Spiraea* (Rosaceae), growing in the Asian part of Russia. *Materialy Mezhdunarodnoi konferentsii, posvyashchennoi 70-letiyu Tsentral'nogo sibirskogo botanicheskogo sada "Sokhranenie raznoobraziya rastitel'nogo mira v botanicheskikh sadakh: traditsii, sovremennost', perspektivy"* = Conservation of Plant Diversity in Botanical Gardens: Traditions, Current Situation and Future: Proceedings of the International Conference dedicated to the 70-th Anniversary of Central Siberian Botanical Garden. 1–8 August, Novosibirsk. Novosibirsk: Izdatel'stvo Tsentral'nogo sibirskogo botanicheskogo sada; 2016, p. 156–157. (In Russian)

15. Kostikova VA, Shaldaeva TM. The antioxidant activity of the Russian Far East representatives of the genus *Spiraea* L. (Rosaceae Juss.). *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2016;43(7):790–794. <https://doi.org/10.1134/S1068162017070081>

16. Kostikova V.A. Determination of optimum conditions of extraction for investigation of composition of phenolic compounds *Spiraea betulifolia* Pall. by HPLC method. *Khimija rastitel'nogo syr'ya = Chemistry of plant raw material*. 2017;1:159–162. (In Russian) <https://doi.org/10.14258/jcprm.2017011417>

17. Van Beek TA. Chemical analysis of *Ginkgo biloba* leaves and extracts. *Journal of Chromatography A*. 2002;967(1):21–55. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00172-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00172-3)

18. Van Beek TA, Montoro P. Chemical analysis and quality control of *Ginkgo biloba* leaves, extracts, and phytopharmaceuticals. *Journal of Chromatography A*. 2009;1216(11):2002–2032. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.01.013>

19. Korul'kin DYU, Abilov ZhA, Muzychkina RA, Tolstikov GA. *Natural flavonoids*. Novosibirsk: Geo; 2007. 232 p. (In Russian)

20. Riaz A, Rasul A, Hussain G, Zahoor MK, Jabeen F, Subhani Z, et al. Astragalin: a bioactive phytochemical with potential therapeutic activities. *Advances in pharmacological sciences*. 2018;2018. Article ID 9794625. 15 p. <https://doi.org/10.1155/2018/9794625>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Костикова Вера Андреевна,
к.б.н., старший научный сотрудник,
Центральный сибирский ботанический сад
СО РАН,

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Vera A. Kostikova,
Cand. Sci. (Biology), Senior Scientist,
Central Siberian Botanical Garden SB RAS,
101, Zolotodolinskaya St., Novosibirsk, 630090,

630090, г. Новосибирск,
ул. Золотодолинская, 101,
Российская Федерация;
старший научный сотрудник,
Национальный исследовательский
Томский государственный университет,
634050, г. Томск, пр-т Ленина, 36,
Российская Федерация,
✉ e-mail: serebryakova-va@yandex.ru

Бобокалонов Кобилджон Азаматович,
научный сотрудник,
Институт ботаники, физиологии и генетики
растений Академии наук
Республики Таджикистан,
734017, г. Душанбе-17, ул. Карамова, 27,
Республика Таджикистан,
e-mail: kobil_5@bk.ru

Кузнецов Александр Александрович,
заведующий лабораторией структурного
и молекулярного анализа растений,
Национальный исследовательский
Томский государственный университет,
634050, г. Томск, пр-т Ленина, 36,
Российская Федерация,
e-mail: ys.tsu@mail.ru

Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

*Все авторы прочитали и одобрили оконча-
тельный вариант рукописи.*

*Поступила в редакцию 23.09.2020.
Одобрена после рецензирования 23.12.2020.
Принята к публикации 28.02.2021.*

Russian Federation;
Senior Scientist,
National Research Tomsk State University,
36, Lenin Ave., Tomsk, , 634050,
Russian Federation,
✉ e-mail: serebryakova-va@yandex.ru

Kobil A. Bobokalonov,
Researcher,
Institute of Botany, Plant Physiology
and Genetics of the Academy of Sciences
of the Republic of Tajikistan,
27, Karamova St.,
Dushanbe, 734017,
Tajikistan,
e-mail: kobil_5@bk.ru

Aleksandr A. Kuznetsov,
Head of the Laboratory of Structural
and Molecular Analysis of Plants,
National Research Tomsk State University,
36, Lenin Ave., Tomsk, 634050,
Russian Federation,
e-mail: ys.tsu@mail.ru

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests re-
garding the publication of this article.

*The final manuscript has been read and approved
by all the co-authors.*

*The article was submitted 23.09.2020.
Approved after reviewing 23.12.2020.
Accepted for publication 28.02.2021.*

Оригинальная статья / Original article

УДК 628.355

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-61-68>



Очистка сточных вод в биореакторе с переменным количеством носителей иммобилизованного ила

© В.Н. Кульков, Е.Ю. Солопанов

Иркутский национальный исследовательский технический университет,
г. Иркутск, Российская Федерация

Резюме: Применение для очистки сточных вод микроорганизмов, прикрепленных к инертной синтетической загрузке, позволяет увеличить окислительную способность аэротенка-биореактора. Изучена зависимость концентрации свободно плавающего ила от удельной длины инертной загрузки носителя иммобилизованного ила. Эксперимент проведен на физической модели биореактора, представляющей собой поперечный вертикальный разрез промышленного аэротенка-биореактора. Концентрация свободно плавающего ила контролировалась по методу светопропускания с использованием люксметра. Найдено уравнение для математического выражения зависимости концентрации свободно плавающего ила от количества удельных погонных метров ершовой загрузки, размещенной в биореакторе. Полученная формула позволяет рассчитать концентрацию свободно плавающего ила при заданной длине носителей иммобилизованного ила. Определена масса иммобилизованного ила на погонном метре ершовой загрузки в зависимости от удельного количества ершей в биореакторе. Показано изменение массы иммобилизованного ила на загрузке от количества ершей и их расположения в поперечном вертикальном сечении биореактора. Установка блоков биологической загрузки в центральном пространстве биореактора по его длине способствует увеличению дозы иммобилизованного ила по сравнению с их установкой по ширине аэротенка. Найдено, что эффективность воздушной среднепузырчатой регенерации иммобилизованного ила не зависит от удельной длины ершовой загрузки: уменьшение удельной длины загрузки с ~60 до ~10 пог. м/м³ во всех опытах соответствовало ~93% эффективности регенерации. Увеличение суммарной дозы свободно плавающего и иммобилизованного ила позволяет интенсифицировать процесс очистки стоков.

Ключевые слова: свободно плавающий ил, иммобилизованный ил, ершовая загрузка, физическая модель биореактора, воздушная регенерация

Для цитирования: Кульков В.Н., Солопанов Е.Ю. Очистка сточных вод в биореакторе с переменным количеством носителей иммобилизованного ила. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2021. Т. 11. N 1. С. 61–68. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-61-68>

Wastewater treatment in a bioreactor with a variable number of immobilized sludge carriers

Victor N. Kulkov, Evgeny Yu. Solopanov

Irkutsk National Research Technical University,
Irkutsk, Russian Federation

Abstract: The use of microorganisms attached to inert synthetic substrates in wastewater treatment increases the oxidative capacity of a bioreactor. In this article, the dependence of the concentration of freely floating sludge on the specific length of an inert biological module carrying immobilized sludge was studied. Experiments were carried out in a physical bioreactor model presenting a transverse vertical section of an industrial bioreactor aerotank. The concentration of freely floating sludge was controlled by the method of light transmission using a lux meter. A mathematical expression was obtained for calculating the dependence between the concentration of freely floating sludge and the number of specific meters of brush filtering modules placed in a bioreactor. This expression gives the concentration of freely floating sludge at a given length of immobilized sludge carriers. The mass of immobilized sludge along the running metre of a brush-filtering module was determined, depending on the specific number of brushes in a bioreactor. It was shown that the mass of the immobilized sludge on a biological module depends on the number of brushes and their location in the cross vertical section of a bioreactor. The installation of biological modules in the central space of the bioreactor along its length increases the amount of immobilized sludge compared to their installation along the width of the aerotank. It was found that the efficiency of air medium-bubble regeneration of immobilized sludge does not depend on the specific length of brush filtering modules: the reduction in the specific length from ~60 to ~10 run.m/m³ in all the experiments corresponded to 93% regeneration efficiency.

cy. An increase in the total amount of freely floating and immobilized sludge allows for an intensification of the wastewater treatment process.

Keywords: freely floating sludge, immobilized sludge, brush filtering, physical bioreactor model, air regeneration

For citation: Kulkov VN, Solopanov EYu. Wastewater treatment in a bioreactor with a variable number of immobilized sludge carriers. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(1):61–68. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-61-68>

ВВЕДЕНИЕ

Увеличение концентрации активного ила в аэротенках с применением иммобилизованного ила на носителях является одним из разрабатываемых способов биологической очистки сточных вод. Микроорганизмы, адсорбированные на инертной загрузке, менее подвержены высоким залповым концентрациям ядовитых веществ, неконтролируемому выносу их из вторичных отстойников, нитчатому вспуханию и воздействию других негативных технологических параметров очистки стоков. Иммобилизованный биоценоз позволяет равномерно распределить активный ил по всему объему биореактора, поддерживая его оптимальную и фиксированную массу [1–5].

Адсорбция должна осуществляться на загрузке, отвечающей следующим требованиям: быть химически стойкой в используемой среде, иметь максимальную удельную поверхность и минимальный объем. Синтетические носители иммобилизованного биоценоза нуждаются в их периодическом обновлении, очищении от различных крупных примесей и желеподобной массы с иммобилизованными микроорганизмами [6–10]. Количество наполнителя не должно превышать 30% от общего объема аэрационной части [2, 11].

Загрузочные материалы с адсорбированным биоценозом, позволяющие повысить эффективность биологической очистки стоков, целесообразно устанавливать при модернизации существующих аэротенков.

Носителями иммобилизованного биоценоза могут быть свободно плавающие и стационарно закрепленные в блоке биологической загрузки насадки разнообразной формы, выполненные из различных материалов, способные увеличить дозу ила в биореакторе до 8–10 г/дм³, с надежной работой вторичных отстойников. Наличие прикрепленного биоценоза в аэротенках способствует снижению илового индекса свободно плавающего активного ила, улучшению его гидробиологического состава, повышению общей биомассы прикрепленного ила в блоке биореактор – вторичный отстойник и последующему увеличению окислительной мощности биореактора [2, 12–16].

Распространенным материалом инертного носителя прикрепленной микрофлоры является ершовая загрузка из капронового волокна, на которой происходит седиментация и равномерное распределение значительной удельной массы микроорганизмов. Биологическая очистка

стоков осуществляется сообществом прикрепленных к волокнистой (ершовой) насадке и свободно плавающих микроорганизмов, поддерживаемых в объеме сооружений системой аэрации [10, 17–19].

Используемая в глубокой биологической очистке сточных вод ершовая загрузка изготавливается из искусственного материала в виде щетины, укрепленной равномерно по длине стальной нержавеющей проволоки, обеспечивающей надежную установку ершей в блоке. В блоках ершовая загрузка крепится вертикально определенным способом с различной плотностью, и затем блоки помещаются в расчетном количестве в объеме аэрируемого сооружения или фильтрах предварительной доочистки воды. На ершах установленных блоков формируется объемный биоценоз из микроорганизмов разнообразного видового состава, обеспечивающих беспрепятственную фильтрацию насыщенной кислородом водно-иловой смеси [7, 8, 12, 13, 16].

Конструктивной особенностью очистных сооружений с ершовой загрузкой является ее размещение и крепление к каркасу блока биологической загрузки в соответствии с принятым при расчете количеством погонных метров ершей в одном кубической метре объема ступеней биореактора. Для возможности конвекции поперечного гидродинамического потока в аэротенке биореакторе блоки с загрузкой размещаются в аэрируемом сооружении выше дна и ниже поверхности воды [6, 11].

При использовании инертной загрузки (диаметр 120 мм), иммобилизующей ил и повышающей его дозу на погонный метр ершовой загрузки до 15–20 гр, окислительная мощность биореактора возрастает, процесс обработки сточных вод стабилизируется, глубина биологической очистки повышается, а объем аэрируемого очистного сооружения уменьшается [2, 4].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Масса иммобилизованного ила и его соотношение со свободно плавающим илом зависит от количества погонных метров загрузки, приходящейся на один метр кубический объема биореактора. Контролировать соотношение свободно плавающего и иммобилизованного ила возможно по интенсивности потока света, проходящего через смесь, приготовленную из водопроводной воды и ила, взятого на действующих очистных сооружениях [20].

Установка для определения концентрации свободно плавающего ила с переменным количеством носителей иммобилизованного ила состоит из модельного биореактора, выполненного из десятимиллиметрового полированного стекла. Схема установки приведена ранее [8, 9]. Мелкопузырчатую аэрацию водно-иловой смеси осуществляли компрессором, а расход воздуха контролировали ротаметром. Восстановление иммобилизованного биоценоза осуществляли определенной подачей воздуха от компрессора в трубку с отверстиями для создания среднепузырчатой регенерации. Регенератор, представленный медной трубкой диаметром 10 мм с семью отверстиями диаметром по 2 мм, помещался под ершовой занавеской, собранной из семи вертикальных нитей.

В биореакторе размещалась синтетическая ершовая загрузка диаметром 50 мм и длиной ~0,62 м так, чтобы ~50 пог. м ершей приходилось на кубический метр объема модельной ячейки. Для циркуляционного движения водно-иловой смеси в поперечном сечении биореактора ерши крепились вертикально к раме с шагом ~100 мм и размещались на ней так, чтобы расстояние до дна и поверхности водно-иловой смеси составляло ~0,1 м [9]. Ершовая занавеска размещалась в модельном биореакторе таким образом, чтобы с ле-

вой стороны (над мелкопузырчатым аэратором) и с правой стороны ячейки (в интервале 13–17 см) ерши отсутствовали. Интенсивность мелкопузырчатой аэрации – $\sim 5,4 \text{ м}^3/(\text{м}^2 \cdot \text{ч})$.

По интенсивности потока света от лампы подсветки через водно-иловую смесь, для регистрации которой использовали люксметр, определялась концентрация свободно плавающего ила, находящегося в модели биореактора [20].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

По показаниям люксметра построена зависимость интенсивности освещенности λ от удельной длины l носителя иммобилизованного ила (рис. 1).

Переход к последующей уменьшенной длине носителя осуществлялся после воздушной среднепузырчатой регенерации ершовой загрузки интенсивностью $7,5 \text{ м}^3/(\text{м}^2 \cdot \text{ч})$ в течение 1 мин.

На рис. 2 приведена динамика концентрации взвешенного ила $C_{\text{сп}}$ в зависимости от приведенной длины ершовой загрузки l . Для определения концентрации ила использовали калибровочный график – изменение концентрации свободно плавающего ила в зависимости от вариации интенсивности света, проходящего через модельную ячейку со смесью ила и воды.

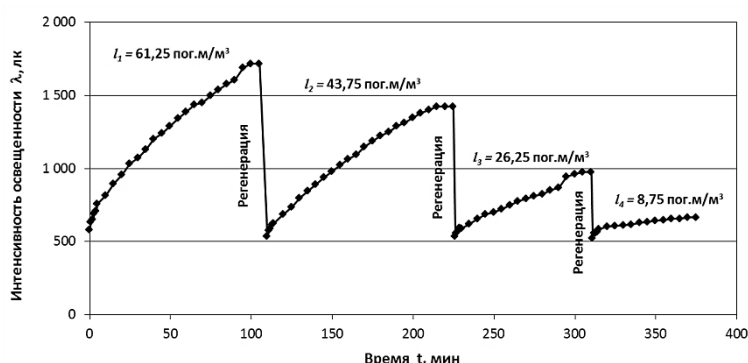


Рис. 1. Динамика интенсивности освещенности при изменении удельной длины загрузки с иммобилизованным илом

Fig. 1. Dynamics of illumination intensity when changing the specific length of the loading with immobilized sludge

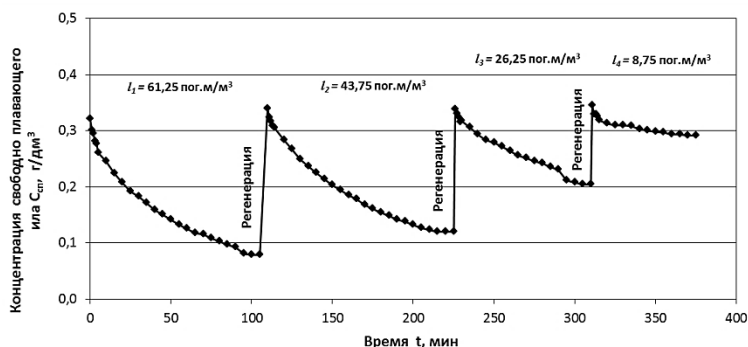


Рис. 2. Изменение концентрации взвешенного ила во времени при вариации удельной длины загрузки с иммобилизованным илом

Fig. 2. Concentration of suspended sludge over the time when varying the specific length of the loading with immobilized sludge

Контроль за $C_{\text{сп}}$ проводили до перехода седиментации ила на ерши в квазистационарное состояние (показания люксметра не изменялись).

Определено, что уменьшение длины ершовой загрузки приводило к повышению концентрации свободно плавающего ила при достижении квазистационарного состояния процесса адсорбции ила. Так, при удельной длине загрузки l , равной $61,25 \text{ пог. м/м}^3$, квазистационарная концентрация свободно плавающего ила $C_{\text{сп}}$ равна $0,078 \text{ г/дм}^3$, а при $l = 8,75 \text{ пог. м/м}^3$ $C_{\text{сп}} = 0,29 \text{ г/дм}^3$, что приблизительно в четыре раза больше. Из эксперимента видно, что эффективность средне-пузырчатого воздушного способа обновления адсорбированного ила не зависит от длины нитей ершовой загрузки [9]. Уменьшение удельной длины загрузки с ~ 60 до $\sim 10 \text{ пог. м/м}^3$ во всех опытах соответствовало $\sim 93\%$ эффективности регенерации.

Известно, что концентрация свободно плавающего ила в биореакторе зависит от длины носителей иммобилизованного ила. С увеличе-

нием длины нитей ершовой загрузки происходило уменьшение концентрации ила по степенной зависимости (рис. 3) с высоким коэффициентом детерминации – 0,9967:

$$C_{\text{сп}} = 4 \cdot 10^{-5} \cdot l^2 - 0,0067 \cdot l + 0,348,$$

где $C_{\text{сп}}$ – концентрация свободно плавающего ила, г/дм^3 ; l – удельная длина загрузки, пог. м/м^3 .

В нашем эксперименте концентрация свободно плавающего ила уменьшилась примерно в четыре раза при увеличении удельной длины ершовой загрузки. По полученной математической зависимости можно подобрать удельную длину носителя иммобилизованного ила при заданной дозе свободно плавающего ила.

Количество иммобилизованного ила, приходящегося на погонный метр ершовой загрузки, уменьшается с увеличением удельного количества ершей по квадратичной зависимости (рис. 4).

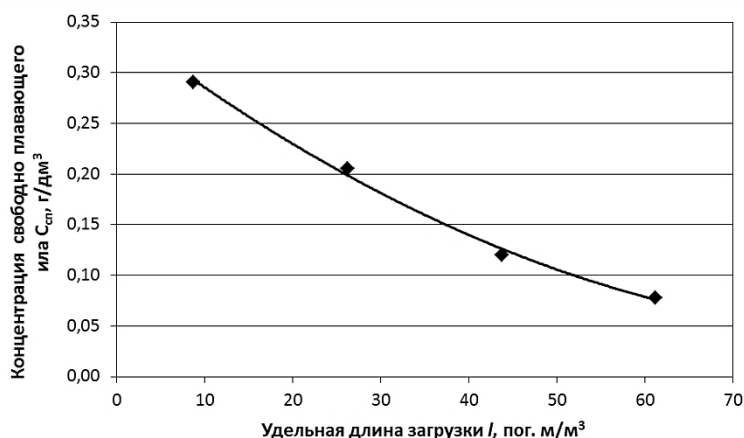


Рис. 3. Зависимость концентрации свободно плавающего ила от количества удельных погонных метров ершовой загрузки в биореакторе

Fig. 3. Relationship between free-floating sludge concentration and the number of specific linear meters of brush loading in the bioreactor

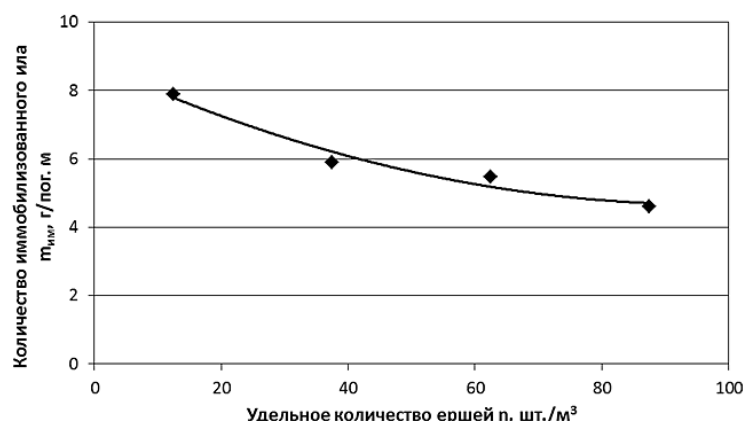


Рис. 4. Зависимость количества иммобилизованного ила от удельного количества ершей в биореакторе

Fig. 4. Relationship between the immobilized sludge amount and specific amount of brush loading in the bioreactor

Поместив заданное удельное количество ершей в биореактор, можно определить количество иммобилизованного ила, приходящегося на метр погонный загрузки. Зависимость описывается степенным выражением с точностью 0,9645:

$$m_{\text{им}} = 4 \cdot 10^{-4} \cdot n^2 - 0,085 \cdot n + 8,7786,$$

где $m_{\text{им}}$ – количество иммобилизованного ила, г/пог. м; n – удельное количество ершей длиной 0,7 м, шт./м³.

Уменьшение количества иммобилизованного ила, приходящегося на метр погонный ершовой загрузки, с увеличением удельного количества ершей объясняется газогидродинамической обстановкой в зоне установки ершовых носителей в биореакторе. На рис. 5 приведена диаграмма движения жидкости в вертикальной модели аэрируемого сооружения размерами 0,05×1,50×1,10 м. Интенсивность аэра-

ции в модели составляла 7,3 м³/(м²·ч) [6].

На представленной диаграмме определяется центр вращения исследуемой жидкости. Центр смещен вправо от барботера и расположен на пересечении 11-й вертикали и VII-й горизонтали. Центральная зона поперечного вертикального сечения биореактора при боковом расположении аэратора водно-иловой смеси характеризуется гидропотоками со скоростями менее 0,075 м/с, что недостаточно для смывания иммобилизованного ила с загрузки.

Установка ершей вправо и влево от центрального ерша с шагом 0,1 м приводит к их попаданию в гидродинамическое поле со скоростями потока ~0,2 м/с, что способствует частичному смыванию иммобилизованного ила с ершовой загрузки.

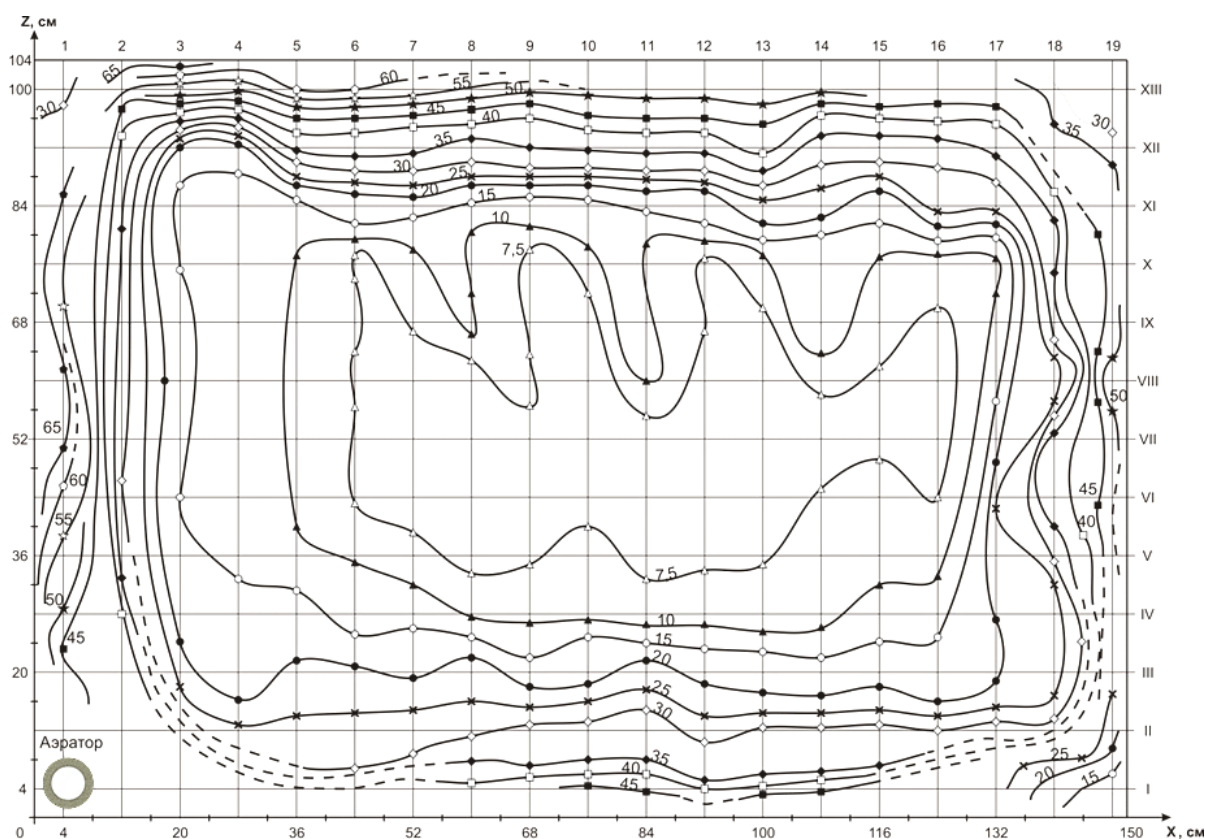


Рис. 5. Диаграмма скорости движения водно-иловой смеси в прямоугольной модели биореактора с нижним боковым расположением мелкопузырчатого барботера. Скорость течения воды (см/с):

Δ – 7,5; ▲ – 10; ○ – 15; ● – 20; × – 25; ◇ – 30; ◆ – 35; □ – 40; ■ – 45; ★ – 50; ☆ – 55; ⬠ – 60; ⬡ – 65

Fig. 5. Speed diagram of the water-sludge mixture movement in a rectangular model of a bioreactor with a lower lateral arrangement of a fine bubble bubbler. Water flow rate (cm/s):

Δ – 7,5; ▲ – 10; ○ – 15; ● – 20; × – 25; ◇ – 30; ◆ – 35; □ – 40; ■ – 45; ★ – 50; ☆ – 55; ⬠ – 60; ⬡ – 65

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С использованием физической модели биореактора изучена динамика концентрации свободно плавающего ила при изменении удельной длины загрузки носителей иммобилизованного ила.

Получена зависимость и найдено математическое выражение для определения концентрации свободно плавающего ила в зависимости от количества удельных погонных метров ершовой загрузки в биореакторе. Полученная формула позволяет

рассчитать концентрацию свободно плавающего ила при заданной длине носителей иммобилизованного ила.

Определено количество иммобилизованного ила на погонном метре ершовой загрузки и зависимость этого параметра от удельного количества ершей в биореакторе. Показано, что эффективность воздушной среднепузырчатой регенерации иммобилизованного ила от удельной длины ершовой

загрузки не зависит: уменьшение удельной длины загрузки с ~60 до ~10 пог. м/м³ во всех опытах соответствовало ~93% эффективности регенерации.

Расположение блоков биологической загрузки в центральном пространстве биореактора по его длине позволяет значительно увеличить дозу иммобилизованного ила по сравнению с установкой блоков по его ширине.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ермолин Ю.А., Алексеев М.И. Промышленная очистка сточных вод как управляемый процесс // Вода и экология: проблемы и решения. 2017. N 2 (70). С. 18–26. <https://doi.org/10.23968/2305-3488.2017.20.2.18-27>
2. Жмур Н.С. Технологические и биохимические процессы очистки сточных вод на сооружениях с аэротенками. М.: АКВАРОС, 2003. 512 с.
3. Кирей В.А., Юхневич Г.Г. Влияние технологического режима аэротенков очистных сооружений канализации на видовой состав активного ила // Актуальные проблемы экологии: сб. науч. ст. XII Междунар. науч.-практ. конф. (Гродно, 04–06 октября 2017 г.). Гродно: ЮрСаПринт, 2017. С. 208–210.
4. Швецов В.Н., Морозова К.М., Смирнова И.И., Семенов М.Ю., Лежнев М.Л., Рыжаков Г.Г. [и др.]. Технологическая эффективность биоагрузки производства ООО «Техводполимер» // Водоснабжение и санитарная техника. 2007. N 2. С. 33–40.
5. Швецов В.Н., Морозова К.М., Смирнова И.И., Семенов М.Ю., Лежнев М.Л., Рыжаков Г.Г. [и др.]. Использование блоков биологической загрузки на сооружениях очистки сточных вод // Водоснабжение и санитарная техника. 2010. N 10. ч. 2. С. 25–31.
6. Долженко Л.И. Иммобилизация активного ила на носителях биореактора в условиях нитрификации и денитрификации // Образование и наука в современном мире. Инновации. 2016. N 4. С. 150–158
7. Залетова Н.А., Воронов Ю.В. Новые технологии для решения современных задач очистки сточных вод // Вестник МГСУ. 2012. N 2. С. 109–111.
8. Саблий Л.А., Бляшина М.В. Использование анаэробно-аэробного биореактора для очистки сточных вод // Водоочистка. 2013. N 4. С. 19–23.
9. Жмур Н.С. Новые аспекты причин вспухания активного ила на очистных сооружениях // Экология и промышленность России. 2011. N 4. С. 44–50.
10. Litti Yu.V., Nekrasova V.K., Kulikov N.I., Siman'kova M.V., Nozhevnikova A.N. Detection of anaerobic processes and microorganisms in immobilized activated sludge of a wastewater treatment plant with intense // Microbiology. 2013. Vol. 82. Issue 6. P. 690–697. <https://doi.org/10.1134/S0026261713060076>
11. Куликов Н.И., Райманов А.Я., Омельченко Н.П., Чернышов В.Н. Теоретические основы очистки воды. Донецк: НОУЛИДЖ, 2009. 298 с.
12. Кульков В.Н., Солопанов Е.Ю., Камалов Р.Т. Динамика и видовой состав биоценоза иммобилизованного ила на ершовой загрузке // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2019. Т. 9. N 1. С. 60–66. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-1-60-66>
13. Кульков В.Н., Солопанов Е.Ю. Восстановление видовой состава биоценоза аэрируемых сооружений после длительного простоя // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2020. Т. 10. N 1. С. 77–83. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-1-77-83>
14. Маркевич Р.М., Гребенчикова И.А., Роденко А.В., Вострова Р.Н. Особенности биоценоза активного ила, находящегося в свободном состоянии и иммобилизованного на полимерном носителе // Труды БГТУ. N 4. Химия, технология органических веществ и биотехнология. 2013. N 4 (160). С. 219–223.
15. Delforno T.P., Lacerda G.V.Jr., Sierra-Garcia I.N., Okada D.Y., Macedo T.Z., Varesche M.B.A., et al. Metagenomic analysis of the microbiome in three different bioreactor configurations applied to commercial laundry wastewater treatment // Science of the Total Environment. 2017. Vol. 587-588. P. 389–398. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.170>
16. Kul'kov V.N., Solopanov E.Yu. Intensification of biological wastewater treatment in a bioreactor // IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. 2019. Vol. 667. P. 012051. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/667/1/012051>
17. Ferrera I., Sánchez O. Insights into microbial diversity in wastewater treatment systems: how far have we come? // Biotechnology Advances. 2016. Vol. 34. Issue 5. P. 790–802. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.04.003>
18. Martí-Calatayud M.C., Schneider S., Yüce S., Wessling M. Interplay between physical cleaning, membrane pore size and fluid rheology during the evolution of fouling in membrane bioreactors // Water Research. 2018. Vol. 147. P. 393–402. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.10.017>
19. Hamza R.A., Sheng Z., Iorhemen O.T., Zaghoul M.S., Tay J.-H. Impact of food-to-microorganisms ratio on the stability of aerobic granular sludge treating high-strength organic wastewater // Water Research. 2018. Vol. 147. P. 287–298. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.09.061>
20. Кульков В.Н., Солопанов Е.Ю. Водовоздушная регенерация ершовой загрузки в аэротенке: монография. Иркутск: Изд-во ИРНИТУ, 2020. 162 с.

REFERENCES

1. Ermolin YuA, Alekseev MI. Industrial wastewater treatment as a controlled process. *Voda i ekologiya: problemy i resheniya* = *Water and Ecology*. 2017;2:18–27. (In Russian) <https://doi.org/10.23968/2305-3488.2017.20.2.18-27>
2. Zhmur NS. *Technological and bio-chemical processes of waste water treatment on constructions with aerotanks*. Moscow: AKVAROS; 2003, 512 p. (In Russian)
3. Kirej VA, Yukhnovich GG. The influence of the technological regime of the aerotanks of sewage treatment facilities on the species composition of active sludge. In: *Aktual'nye problemy ekologii: sbornik nauchnykh statei XII Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii* = *Actual problems of ecology: Proceedings of XII International Scientific and Practical Conference*. 04–06 October 2017, Grodno. Grodno: YurSaPrint; 2017, p. 208–210. (In Russian)
4. Shvetsov VN, Morozova KM, Smirnova II, Semenov MYu, Lezhnev ML, Ryzhakov GG, et al. Technological efficiency of biomedias produced by Tekhvodpolimer Co. Ltd. *Vodosnabzhenie i sanitarnaya tekhnika* = *Water Supply and Sanitary Technique*. 2007;2:33–40. (In Russian)
5. Shvetsov VN, Morozova KM, Smirnova II, Semenov MYu, Lezhnev ML, Ryzhakov GG, Gubaidullin TM. The Use of Bioblocks at Wastewater Treatment Facilities. *Vodosnabzhenie i sanitarnaya tekhnika*. = *Water Supply and Sanitary Technique*. 2010;10:25–31. (In Russian)
6. Dolzhenko LA. Immobilization of the active sludge from carriers in bioreactors under nitrification and denitrification condition. *Obrazovaniye i nauka v so-vremennom mire. Innovatsii*. 2016;4:150–158. (In Russian)
7. Zaletova NA, Voronov JuV. New technologies to solve the present-day challenges of waste water treatment. *Vestnik MGSU. Nauchno-tekhnicheskii zhurnal po stroitel'stvu i arhitekture* = *Vestnik MGSU. Monthly Journal on Construction and Architecture*. 2012;2:109–111. (In Russian)
8. Sabliy LA, Blyashina MV. The use of an anaerobic-aerobic bioreactor for wastewater treatment. *Vodo-ochistka*. 2013;4:19–23. (In Russian)
9. Zhmour NS. New aspects in diagnostics of the causes of active silt swelling at sewage treatment plants. *Ekologiya i promyshlennost' Rossii* = *Ecology and Industry of Russia*. 2011;4:44–50. (In Russian)
10. Litt YuV, Nekrasova VK, Kulikov NI, Siman'kova MV, Nozhevnikova AN. Detection of anaerobic processes and microorganisms in immobilized activated sludge of a wastewater treatment plant with intense. *Microbiology*. 2013;82(6):690–697. <https://doi.org/10.1134/S0026261713060076>
11. Kulikov NI, Raimanov AY, Omelchenko NP, Chernyshov VN. Theoretical based water purification. Donetsk: Noulidzh; 2009, 298 p. (In Russian)
12. Kul'kov VN, Solopanov EYu, Kamalov RT. Dynamics and species composition of biocoenosis in immobilized sludge under brush filtering. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya* = *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2018;9(1):60–66. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-1-60-66>
13. Kulkov VN, Solopanov EYu. Restoring biocoenotic species composition in aerated structures following prolonged downtime. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya* = *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(1):77–83. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-1-77-83>
14. Markevich RM, Grebenchikova IA, Rodenko AV, Vostrova RN. Features of activated sludge biocoenosis in a free state and immobilized on a polymeric carrier. *Trudy BGTU. No. 4. Khimiya, tekhnologiya organicheskikh veshchestv i biotekhnologiya* = *Proceedings of BSTU. No. 4. Chemistry, Organic Substances Technology and Biotechnology*. 2013;4:219–223. (In Russian)
15. Delforno TP, Lacerda GVJr, Sierra-Garcia IN, Okada DY, Macedo TZ, Varesche MBA, et al. Metagenomic analysis of the microbiome in three different bioreactor configurations applied to commercial laundry wastewater treatment. *Science of the Total Environment*. 2017;587–588:389–398. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.170>
16. Kul'kov VN, Solopanov EYu. Intensification of biological wastewater treatment in a bioreactor. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 2019;667:012051. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/667/1/012051>
17. Ferrera I, Sánchez O. Insights into microbial diversity in wastewater treatment systems: how far have we come? *Biotechnology Advances*. 2016; 34(5):790–802. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.04.003>
18. Martí-Calatayud MC, Schneider S, Yüce S, Wessling M. Interplay between physical cleaning, membrane pore size and fluid rheology during the evolution of fouling in membrane bioreactors. *Water Research*. 2018;147:393–402. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.10.017>
19. Hamza RA, Sheng Z, Iorhemen OT, Zaghloul MS, Tay J-H. Impact of food-to-microorganisms ratio on the stability of aerobic granular sludge treating high-strength organic wastewater. *Water Research*. 2018;147:287–298. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.09.061>
20. Kulkov VN, Solopanov EYu. *Water-air regeneration of a brush loading in the aerotank*. Irkutsk: Izdatel'stvo IRNITU; 2020. 162 p. (In Russian)

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Кульков Виктор Николаевич,
д.т.н., профессор, профессор кафедры инженерных коммуникаций и систем жизнеобеспечения,
Иркутский национальный исследовательский технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
✉ e-mail: kulkof.viktor@yandex.ru

Солопанов Евгений Юрьевич,
к.т.н., доцент отделения прикладной математики и информатики,
Иркутский национальный исследовательский технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
e-mail: evgursolo@mail.ru

Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

*Поступила в редакцию 03.03.2020.
Одобрена после рецензирования 21.04.2020.
Принята к публикации 28.02.2021.*

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Victor N. Kulkov,
Dr. Sci. (Engineering), Professor,
Department of Engineering Communications and Life Support Systems,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
✉ e-mail: kulkof.viktor@yandex.ru

Evgeny Yu. Solopanov,
Cand. Sci. (Engineering),
Department of Applied Mathematics and Computer Science,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
e-mail: evgursolo@mail.ru

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

The final manuscript has been read and approved by all the co-authors.

*The article was submitted 03.03.2020.
Approved after reviewing 21.04.2020.
Accepted for publication 28.02.2021.*

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Кульков Виктор Николаевич,
д.т.н., профессор, профессор кафедры инженерных коммуникаций и систем жизнеобеспечения,
Иркутский национальный исследовательский технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
✉ e-mail: kulkof.viktor@yandex.ru

Солопанов Евгений Юрьевич,
к.т.н., доцент отделения прикладной математики и информатики,
Иркутский национальный исследовательский технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
e-mail: evgursolo@mail.ru

Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

*Поступила в редакцию 03.03.2020.
Одобрена после рецензирования 21.04.2020.
Принята к публикации 28.02.2021.*

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Victor N. Kulkov,
Dr. Sci. (Engineering), Professor,
Department of Engineering Communications and Life Support Systems,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
✉ e-mail: kulkof.viktor@yandex.ru

Evgeny Yu. Solopanov,
Cand. Sci. (Engineering),
Department of Applied Mathematics and Computer Science,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
e-mail: evgursolo@mail.ru

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

The final manuscript has been read and approved by all the co-authors.

*The article was submitted 03.03.2020.
Approved after reviewing 21.04.2020.
Accepted for publication 28.02.2021.*

Оригинальная статья / Original article

УДК 574; 574.9; 581.5; 613.1; 631.46

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-69-79>



Влияние белого фосфора на клеточную морфологию и белковый профиль штаммов гриба *Aspergillus niger*

© А.З. Миндубаев*, С.В. Федосимова**, Т.В. Григорьева**,
В.А. Романова**, В.М. Бабаев***, Д.Н. Бузюрова***,
Э.В. Бабынин**, Е.К. Бадеева***, С.Т. Минзанова***,
Л.Г. Миронова***, Й.А. Акосах**, Ю.В. Караева*

* Институт энергетики и перспективных технологий ФИЦ КазНЦ РАН,
г. Казань, Российская Федерация

** Казанский (Приволжский) федеральный университет,
г. Казань, Российская Федерация

*** Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова ФИЦ КазНЦ РАН,
г. Казань, Российская Федерация

Резюме: Известна способность микроорганизмов легко приспосабливаться к любым условиям окружающего пространства, формируя специфические экосистемы, существующие в самых экстремальных средах. Белый фосфор является одним из самых опасных загрязнителей окружающей среды. Однако его широкое использование в различных отраслях промышленности и в военных целях создает возможность попадания данного токсиканта в окружающую среду. Ранее было показано, что некоторые микробные культуры адаптировались к присутствию в среде белого фосфора, окисляя его до фосфата и используя в качестве источника биогенного макроэлемента. В предыдущих исследованиях нами впервые была продемонстрирована биodeградация белого фосфора штаммами плесневого гриба *Aspergillus niger*. Тем не менее, важной задачей является изучение механизмов устойчивости гриба к столь токсичному веществу. Таких механизмов может быть несколько, в том числе наиболее вероятны: клеточная стенка гриба является барьером на пути проникновения белого фосфора в клетку, в таком случае в ответ на воздействие токсиканта должен наблюдаться рост толщины клеточной стенки; механизм, связанный с экспрессией генов стресса и выработкой грибом белков, участвующих в обезвреживании токсикантов, в том числе белого фосфора. Помимо этого белый фосфор вызывает общую активацию метаболизма, сопровождающуюся ростом числа и размеров митохондрий в клетках. Возможно, продуцируемые митохондриями активные формы кислорода участвуют в детоксикации белого фосфора и продуктов его превращений. Проведенные микроскопические и протеомные исследования подтвердили наличие рассмотренных механизмов устойчивости.

Ключевые слова: белый фосфор, *Aspergillus niger*, биodeградация, электронная микроскопия, протеомный анализ, двумерный электрофорез, масс-спектрометрия

Благодарности: Авторы выражают благодарность Фонду содействия инновациям за финансовую поддержку проекта № С1-34299. Просвечивающая электронная микроскопия проводилась на базе Междисциплинарного центра «Аналитическая микроскопия» Казанского (Приволжского) федерального университета. Масс-спектрометрические исследования проведены в распределенном коллективном спектро-аналитическом Центре изучения строения, состава и свойств веществ и материалов Института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН.

Для цитирования: Миндубаев А.З., Федосимова С.В., Григорьева Т.В., Романова В.А., Бабаев В.М., Бузюрова Д.Н., Бабынин Э.В., Бадеева Е.К., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Акосах Й.А., Караева Ю.В. Влияние белого фосфора на клеточную морфологию и белковый профиль штаммов гриба *Aspergillus niger*. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т. 11. N 1. С. 69–79. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-69-79>

Effects of white phosphorus on the cellular morphology and protein profile of *Aspergillus niger*

Anton Z. Mindubaev*, Svetlana V. Fedosimova**, Tatiana V. Grigoryeva**,
Valeriia A. Romanova**, Vasily M. Babaev***, Daina N. Buzuyrova***,
Edward V. Babynin**, Elena K. Badeeva***, Salima T. Minzanova***,
Lyubov' G. Mironova***, Yaw A. Akosah**, Julia V. Karaeva*

* Institute of Power Engineering and Advanced Technologies,
FRC Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Kazan, Russian Federation

** Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russian Federation

*** Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry of Kazan,
FRC Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Kazan, Russian Federation

Abstract: Microorganisms are known for their ability to adapt easily to any environment, forming specific ecosystems capable of surviving in harsh media. White phosphorus is one of the most dangerous and toxic pollutants, whose widespread use for various industrial and military purposes creates conditions for environmental pollution. It has previously been shown that some microbial cultures can adapt to the presence of white phosphorus in the environment, oxidizing it to a phosphate and then using it as a source of biogenic macronutrients. In prior studies, we have demonstrated the possibility of white phosphorus biodegradation by the fungal strains of *Aspergillus niger*. However, it is important to study the resistance of this species to such a toxic substance as white phosphorus. There may be several probable mechanisms, including the following: the cell wall of the fungus is a barrier to the penetration of white phosphorus into the cell, in which case an increase in the thickness of the cell wall should be observed in response to the impact of the toxicant; a mechanism associated with the expression of stress genes and the production of proteins involved in the disposal of toxins, including white phosphorus. In addition, white phosphorus causes an overall activation of metabolism, accompanied by an increase in the number and size of mitochondria in the cells. It is likely that the active forms of oxygen produced by mitochondria are involved in the detoxification of both white phosphorus and its transformation products. Microscopic and proteomic studies have confirmed the presence of the above-mentioned resistance mechanisms.

Keywords: white phosphorus, *Aspergillus niger*, biodegradation, electron microscopy, proteomic analysis, two-dimensional electrophoresis, mass spectrometry

Acknowledgments: The authors express their appreciation to the Innovation Assistance Fund for their financial support for the Project C1-34299. Transmission electron microscopy was carried out on the basis of the Interdisciplinary Centre "Analytic Microscopy" of the Kazan (Volga) Federal University. Mass spectrometric studies were conducted at the distributed Collective Spectro-Analytical Centre for the Study of the Structure, Composition and Properties of Substances and Materials of the Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry of the Kazan Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences.

For citation: Mindubaev AZ, Fedosimova SV, Grigoryeva TV, Romanova VA, Babaev VM, Buzyurova DN, Babynin EV, Badeeva EK, Minzanova ST, Mironova LG, Akosah YA, Karaeva JV. Effects of white phosphorus on the cellular morphology and protein profile of *Aspergillus niger*. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(1):69–79. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-69-79>

ВВЕДЕНИЕ

Биодеградация является одним из наиболее практически значимых методов обезвреживания промышленных стоков, содержащих высокотоксичные неприродные вещества [1, 2]. Преимущество этого метода заключается в том, что при его использовании в окружающую среду не попадают новые химические соединения.

Белый фосфор (P_4) относится к самым опасным загрязнителям¹. Но в окисленном состоянии этот элемент абсолютно необходим для всех форм жизни [3]. Фосфор играет важнейшую роль в биосфере, в том числе в жизнедеятельности микробиоты. Согласно данным, представленным в работе «Современная микробиология. Прокариоты»², микробные культуры содержат около 30 мг/г общего фосфора, или 0,5% на сухой вес. По процентному содержанию в биологических

тканях фосфор занимает третье место после углерода и азота, несколько превосходя серу. Его содержание в золе микробной биомассы осадка сточных вод составляет 6–10% [4]. Показано, что бактерии *Acinetobacter* накапливают до 36% запасных полифосфатов, а у некоторых генетически модифицированных микроорганизмов их содержание еще больше, до 50% [5]. Важную роль в ассимиляции почвенного фосфата играют грибы. Высшие растения получают фосфат от симбиотических грибов через микоризу – контакты корней и грибницы [6]. Ряд бактерий и грибов специализируются на превращении минерального фосфата в растворимую форму (фосфатрастворяющие микроорганизмы). У некоторых из них это даже нашло отражение в видовом названии [7]. Фосфор настолько важен для микроорганизмов и грибов, что существует целый

¹Duerksen-Hughes P., Richter P., Ingerman L., Ruoff W., Thampi S., Donkin S. Toxicological profile for white phosphorus. U.S. Department of health and human services. USA. 1997. 248 p.

²Ленгелер Й., Дреус Г., Шлегель Г. Современная микробиология. Прокариоты. В 2 т. М.: Мир, 2005. Т. 1. – 654 с.; т. 2 – 493 с.

класс белков – переносчиков фосфата, кодируемых специфичными генами [8]. Их единственная функция – формировать комплекс с гидрофильным остатком фосфорной кислоты и переносить его через липидную клеточную мембрану. Но микроорганизмы усваивают не только фосфаты. Ферментативное окисление восстановленных соединений фосфора описано в обзорах [9–11]. Метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР) подтвердил биологическую трансформацию белого фосфора и продуктов его химических превращений, а также снижение концентрации этих токсичных веществ в сравнении со стерильной средой-контролем [12]. Исходя из сказанного представляется целесообразным использовать микроорганизмы для полной детоксикации элементного фосфора.

Цель данного исследования, являющегося продолжением более ранних работ нашего коллектива [13–15], – структурно-морфологическое и биохимическое изучение микроорганизмов, обезвреживающих белый фосфор, с помощью конфокальной и электронной микроскопии, а также их протеома.

Показано, что в присутствии белого фосфора в септах мицелия грибов происходят морфологические изменения, которые могут быть направлены на усиление защищенности от негативного воздействия внешней среды. Наблюдаются резкие различия белкового профиля у грибов, растущих в присутствии и в отсутствии белого фосфора. Идентифицированы три белка, вырабатываемые аспергиллом AM1 в присутствии белого фосфора, и отсутствующие у гриба, растущего в контроле. Вероятно, они принимают участие в увеличении устойчивости к токсичному ксенобиоту.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штаммы *Aspergillus niger*, имеющие авторские кодовые названия AM1 и AM2, зарегистрированы во Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ).

Подготовка проб, разделение и анализ белков, электронная микроскопия, масс-спектрометрия пептидов описаны в ранее изданной публикации [16].

Измерение толщины клеточных стенок на микрофотографиях проводилось при помощи программы Xara Xtreme Pro 5, позволяющей наносить на изображения линии с указанием их точной длины. На каждой фотографии измерение толщины проводилось не менее чем в десяти местах по окружности. Определение размеров митохондрий проводилось в этой же программе. Поскольку митохондрии на срезах имеют форму, приближающуюся к эллипсу, измерялся их максимальный диаметр.

Анализ и статистическая обработка данных проведены в программе GraphPad Prism 8.4.0. Результаты представлены в виде диаграмм.

Общее межгрупповое сравнение проводили по критерию однофакторного дисперсионного анализа, а затем попарное сравнение – по критерию Тьюки с учетом статистического значимого различия при $P \leq 0,05$. На диаграммах обозначения ns, *, **, ***, **** равны $P > 0,05$; $P \leq 0,05$; $P \leq 0,01$; $P \leq 0,001$, и $P \leq 0,0001$ соответственно. Данные были проверены на нормальность и однородность дисперсии с использованием критерия Д'Агостини – Пирсона. На основе полученных результатов проверки на нормальность был использован критерий однофакторного дисперсионного анализа для дальнейшей обработки данных. Данные представлены в виде $M \pm SEM$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На полученных с помощью электронного микроскопа фотографиях хорошо различимы клетки, обранные клеточной стенкой (рис. 1).

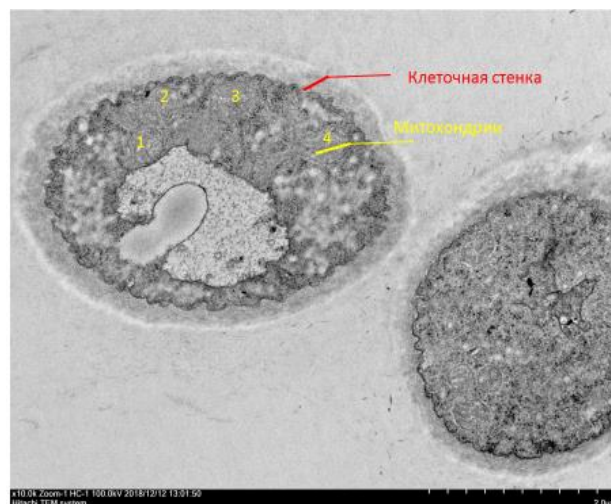


Рис. 1. ТЭМ-изображение поперечного среза гифы штамма AM1, инкубированного в среде с фосфатом (желтыми цифрами обозначены митохондрии)

Fig. 1. TEM image of hyphae cross-section of strain AM1 incubated in a medium with phosphate (yellow numbers indicate mitochondria)

В опыте проводилась одновременная обработка клеток белым фосфором. При воздействии белого фосфора на клетки главным образом меняется морфология клеточной стенки: ее толщина заметно увеличивается, наблюдается изменение плотности, на поверхности появляется протеогликановый волокнистый слой, придающий поверхности гифов ворсистую структуру, не наблюдаемую в контроле [17, 18]. Также определенно увеличивается число митохондрий в клетках гиф – с 4 до 10 (рис. 2). Увеличивается размер митохондрий.

Следует отметить, что штамм AM2, более адаптированный к существованию в присутствии белого фосфора по сравнению с предковым штаммом AM1 [19], и в контроле, в отсутствие белого фосфора, имеет видоизмененную клеточную стенку с вористой поверхностью

(рис. 3). Можно предположить, что признаки реакции на стрессирующий фактор в результате отбора стали для этого специализированного штамма постоянными морфологическими признаками. Следует особо подчеркнуть, что штамм AM2 – дочерний к AM1 и возник уже в нашей лаборатории. Поэтому присутствие белого фосфора в среде – единственный стрессирующий фактор, с которым он сталкивался за период своего существования. Количество и размер митохондрий у AM2 также возрастают в присутствии белого фосфора, достигая более высоких значений, чем у AM1, однако, характерного для предкового штамма утолщения клеточной стенки в опыте у AM2 не наблюдается (рис. 4).

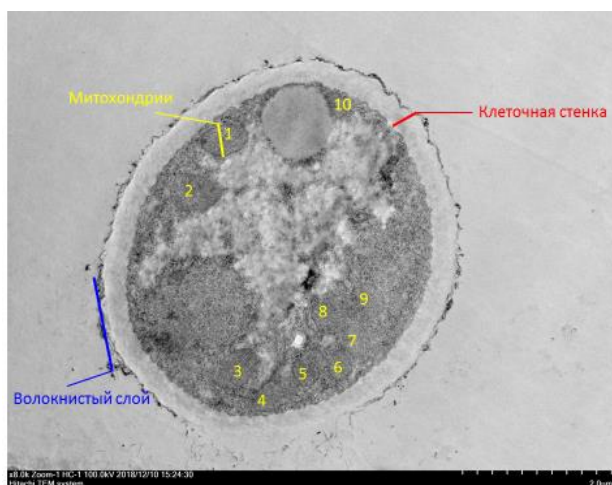


Рис. 2. ТЭМ-изображение поперечного среза гифы штамма AM1, инкубированного в среде с белым фосфором (желтыми цифрами обозначены митохондрии)

Fig. 2. TEM image of hyphae cross-section of strain AM1 incubated in a medium with white phosphorus (yellow numbers indicate mitochondria)

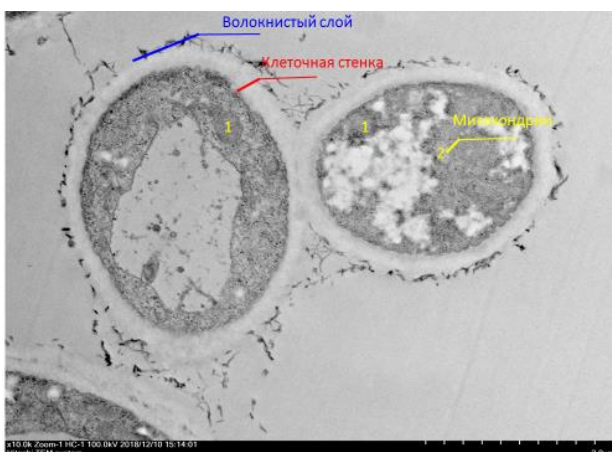


Рис. 3. ТЭМ-изображение поперечного среза двух гиф штамма AM2, инкубированного в среде с фосфатом (желтыми цифрами обозначены митохондрии)

Fig. 3. TEM image of two hyphae cross-section of strain AM2 incubated in a medium with phosphate (yellow numbers indicate mitochondria)

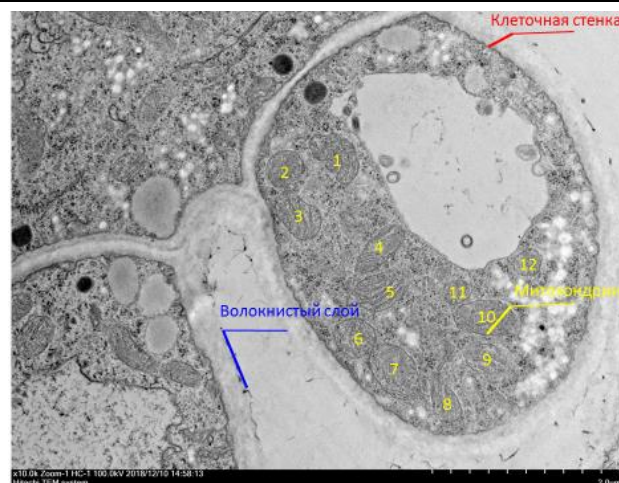


Рис. 4. ТЭМ-изображение поперечного среза двух гиф штамма AM2, инкубированного в среде с белым фосфором (желтыми цифрами обозначены митохондрии)

Fig. 4. TEM image of hyphae cross-section of strain AM2 incubated in a medium with white phosphorus (yellow numbers indicate mitochondria)

По данным статистической обработки результатов, у AM1 толщина клеточной стенки сильно различается в опыте и контроле ($F[3, 44] = 11,86; P < 0,0001$), а у AM2 данного различия нет (рис. 5, а). Размер митохондрий статистически отличается в опыте и контроле для каждого штамма (рис. 5, б).

В процессе исследований был разработан метод, позволяющий экстрагировать белки из мицелия аспергилла. Одномерный электрофорез подтвердил присутствие белков в экстракте, что говорит об эффективности данного метода (рис. 6).

Исследования протеома, описанные в работе [16], продемонстрировали четкие различия белкового профиля при росте аспергилла в отсутствии и в присутствии белого фосфора. Белковый профиль в свою очередь определяется экспрессией генов, следовательно, есть основания говорить об ответе на загрязнение белым фосфором на этом уровне. Данное предположение подтверждается двумерным электрофорезом. На рис. 7 белым цветом выделены вырезанные белковые пятна, каждое из которых соответствует отдельному белку. Белки контроля (без белого фосфора) окрашены красной флуоресцентной краской, белки образца, обработанного белым фосфором, – зеленой флуоресцентной краской. При наложении белков контроля и опыта возникает желтая флуоресценция. Однако в данном случае желтое излучение наблюдается только у единичных пятен, что говорит о существенном различии белковых профилей контроля и опыта.

После получения спектров MALDI и обработки данных были идентифицированы белки № 6, 9 и 22, по нумерации окрашенных пятен белков на геле (см. рис. 7). Белок № 6 оказался дигид-

ронеоптеринальдолазой, продукты которой, вероятно, задействованы в метаболических процессах и способствуют детоксикации токсичных производных фосфора [20–23]. Белок № 9 является поверхностной оксидоредуктазой. Возможно, он является ферментом, принимающим участие в окислении токсичных ксенобиотиков [24]. На рис. 8 приведен масс-спектр белка № 22, чья функция неизвестна. Его появление в ответ на

действие белого фосфора дает основание предположить, что данный белок имеет отношение к защите от стрессирующих воздействий. Например, он может оказаться одним из белков, инициирующих каскадный механизм реакции на стрессирующие воздействия, ферментом, обезвреживающим белый фосфор, или его транспортером внутрь клетки.

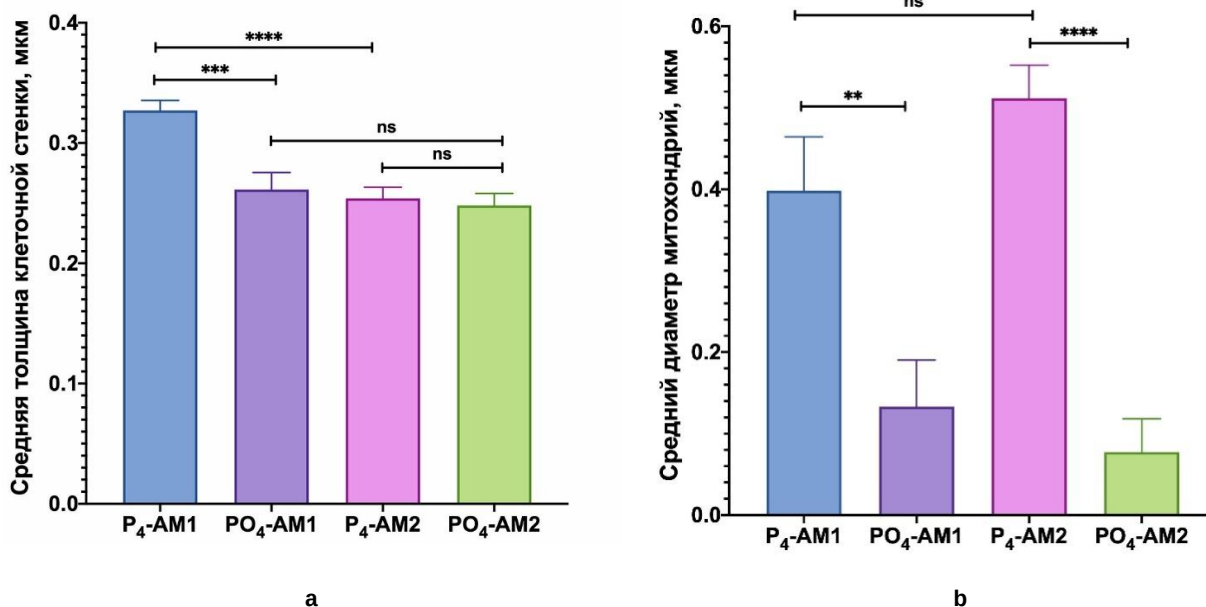


Рис. 5. Сравнительный анализ различий толщины клеточных стенок (а) и диаметра митохондрий (б). P₄ – белый фосфор (опыты), PO₄ – фосфат (контроль). Данные представлены в виде M±SEM

Fig. 5. Comparative analysis of cell wall thickness (a) and mitochondrial diameter (b) in *A. niger* strains. P₄ – white phosphorus (experiments); PO₄ – phosphate (controls). Data are presented as M±SEM

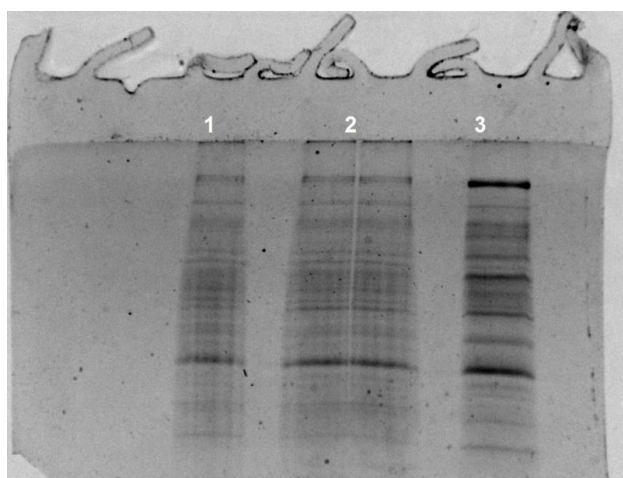


Рис. 6. Изображение одномерного геля с белками, выделенными из образцов *A. niger*

Fig. 6. Image of a one-dimensional gel with proteins isolated from *A. niger* samples

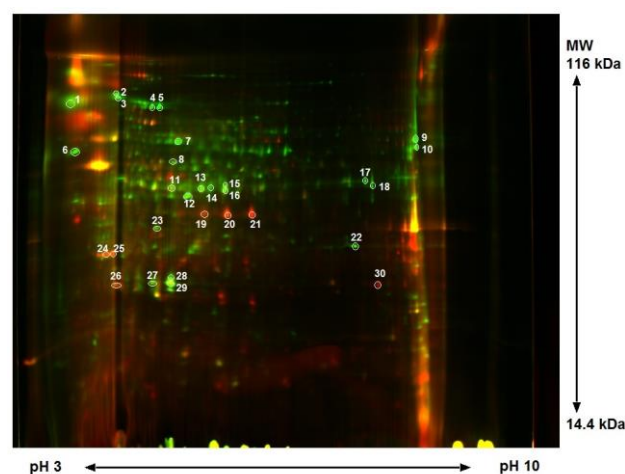


Рис. 7. Сканированное изображение двумерного геля протеома *A. niger*

Fig. 7. Scanned image of a two-dimensional gel of *A. niger* proteome

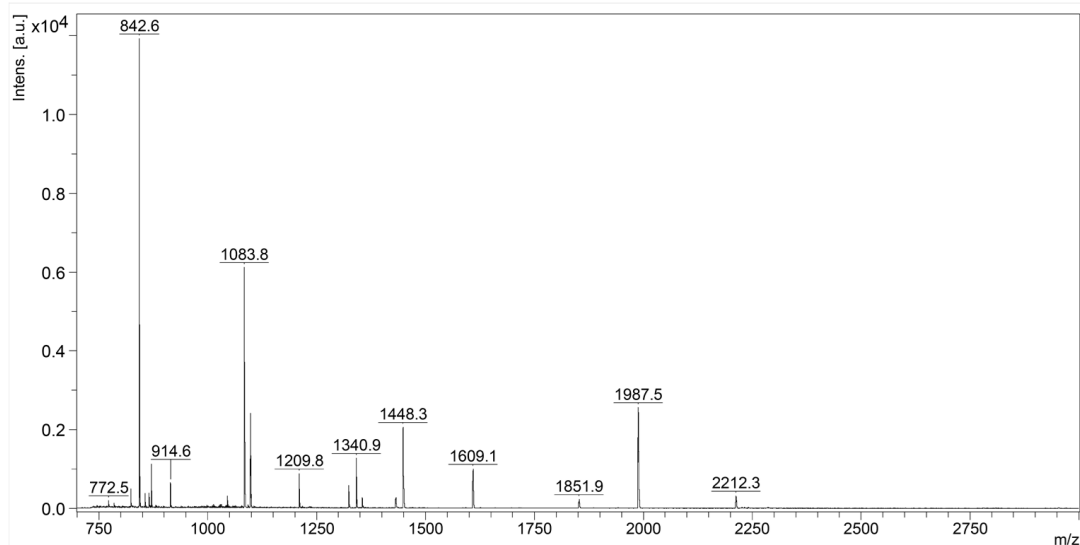


Рис. 8. Масс-спектр белка № 22

Fig. 8. Mass spectrum of protein no. 22

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты очень интересны и имеют научную новизну. Более ранние наши исследования показали, что все изучаемые нами штаммы черного аспергилла обладают устойчивостью к белому фосфору [25]. Наличие у *A. niger* защитных механизмов позволяет им быть устойчивыми к такому токсичному загрязнителю окружающей среды, как белый фосфор. Поскольку эти механизмы, слабо выраженные у бактерий, наиболее ярко проявляются у штамма *A. niger* AM1, возникло предположение, что этот механизм устойчивости связан с морфологией грибов, в первую очередь со строением клеточной стенки. Дальнейшие исследования, проведенные с помощью оптической и электронной микроскопии, подтвердили обоснованность данного предположения. Показанные в опыте у штамма AM1 такие признаки, как заметное утолщение клеточных стенок, появление на их поверхности волокнистого слоя, увеличение числа и размеров митохондрий в гифах, могут являться защитой от вредных воздействий – клеточная стенка служит барьером, а митохондрии поддерживают энергетический обмен. Однако у AM2 утолщения клеточной стенки в опыте не наблюдалось. Можно предположить, что устойчивость к белому фосфору у AM2 возросла настолько, что необходимость в срабатывании данного защитного механизма исчезла. Согласно литературным источникам [26], продуцируемые митохондриями активные формы кислорода используются живыми клетками для детоксикации ксенобиотиков. Для обезвреживания белого фосфора и большинства продуктов его превращений они подходят, поскольку данные ксенобиотики являются восстановителями. Следует обратить внимание на то, что один из продуктов

превращений белого фосфора – фосфин – является высокотоксичным респираторным ядом, подавляющим активность митохондрий [27]. Поэтому увеличение размеров и числа митохондрий может служить компенсаторным механизмом (гипертрофией), возникающим в ответ на угнетение их метаболизма.

Одним из предположений было, что механизм устойчивости связан с наличием ферментов оксидаз, обезвреживающих белый фосфор. Протеомное исследование показало, что эта гипотеза тоже имеет под собой реальное основание. Стоит отметить большую разницу белкового профиля у грибов в контроле и опыте. Причем один из не характерных для контроля белков обладает неизвестной функцией.

Интересно, что некоторые из признаков, перечисленных для штамма *A. niger* AM2, проявляются в контроле. Так, волокнистый слой на внешней поверхности клеточной стенки присутствует и в культуральной среде, не содержащей белый фосфор. Мы предполагаем, что это может быть результатом дальнейшей адаптации к обитанию в токсичной среде и более узкой специализации. Но биология штамма требует дальнейшего изучения, которое даст возможность сделать обоснованные выводы. В настоящий момент мы не знаем, являются ли различия штаммов AM1 и AM2 следствием мутационной или модификационной изменчивости, либо иных микрорезволюционных изменений.

Таким образом, на основании проведенного исследования можно заключить:

– что присутствие белого фосфора в культуральной среде оказывает влияние на морфологию гриба *Aspergillus niger* AM1: происходит утолщение и усложнение структуры клеточной стенки, увеличивается число и размер митохон-

дрий. У штамма *A. niger* AM2 данные признаки реакции на стрессирующий фактор проявляются и в контроле;

– реакцией на белый фосфор является существенное изменение экспрессии генов и белкового профиля черного аспергилла;

– перечисленные изменения морфологических и биохимических признаков являются, вероятно, защитной реакцией, позволяющей аспергиллам адаптироваться к неблагоприятным факторам окружающей среды, в том числе, к токсическому действию белого фосфора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wackett L.P. The metabolic pathways of biodegradation // *The Prokaryotes*. 2013. Vol. 2. P. 383–393.
2. Meckenstock R.U., Elsner M., Griebler C., Lueders T., Stumpp C., Aamand J., et al. Biodegradation: updating the concepts of control for microbial cleanup in contaminated aquifers // *Environmental Science & Technology*. 2015. Vol. 49. Issue 12. P. 7073–7081. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00715>
3. Cummins C.C. Phosphorus: from the stars to land & sea // *Daedalus*. 2014. Vol. 143. Issue 4. P. 9–20. https://doi.org/10.1162/DAED_a_00301
4. Cohen Y. Phosphorus dissolution from ash of incinerated sewage sludge and animal carcasses using sulphuric acid // *Environmental Technology*. 2009. Vol. 30. Issue 11. P. 1215–1226. <https://doi.org/10.1080/09593330903213879>
5. Кулаев И.С. Неорганические полифосфаты и их роль на разных этапах клеточной эволюции // Соросовский образовательный журнал. 1996. N 2. С. 28–35.
6. Smith S.E., Jakobsen I., Grønlund M., Smith F.A. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus nutrition: interactions between pathways of phosphorus uptake in arbuscular mycorrhizal roots have important implications for understanding and manipulating plant phosphorus acquisition // *Plant Physiology*. 2011. Vol. 156. Issue 3. P. 1050–1057. <https://doi.org/10.1104/pp.111.174581>
7. Amalraj E.L.D., Maiyappan S., Peter A.J. *In vivo* and *in vitro* studies of *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum* on nutrient mobilization, antagonism and plant growth promoting traits // *Journal of Ecobiotechnology*. 2012. Vol. 4. Issue 1. P. 35–42.
8. Pedersen B.P., Kumar H., Waight A.B., Risenmay A.J., Roe-Zurz Z., Chau B.H., et al. Crystal structure of a eukaryotic phosphate transporter // *Nature*. 2013. Vol. 496. Issue 7446. P. 533–536. <https://doi.org/10.1038/nature12042>
9. Relyea H.A., van der Donk W.A. Mechanism and applications of phosphite dehydrogenase // *Bioorganic Chemistry*. 2005. Vol. 33. Issue 3. P. 171–189. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2005.01.003>
10. Kononova S.V., Nesmeyanova M.A. Phosphonates and their degradation by microorganisms // *Biochemistry (Moscow)*. 2002. Vol. 67. Issue 2. P. 184–195. <https://doi.org/10.1023/a:1014409929875>
11. Ternan N.G., Mc Grath J.W., Mc Mullan G., Quinn J.P. Review: Organophosphonates: occurrence, synthesis and biodegradation by microorganisms // *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 1998. Vol. 14. Issue 5. P. 635–647. <https://doi.org/10.1023/A:1008848401799>
12. Миндубаев А.З., Бадеева Е.К., Минзанова С.Т., Бабынин Э.В., Миронова Л.Г., Низамов И.С. [и др.]. Метаболизм соединений фосфора и таксономическое положение гриба *Aspergillus niger* AM1 // Бутлеровские сообщения. 2020. Т. 62. N 6. С. 98–124. <https://doi.org/10.37952/ROI-jbc-01/20-62-6-98>
13. Миндубаев А.З. От яда к удобрению // Наука и жизнь. 2019. N 3. С. 46–47.
14. Миндубаев А.З., Бабынин Э.В., Бадеева Е.К., Пискунов Д.Б., Махиянов А.Н., Минзанова С.Т. [и др.]. Генотоксичность и цитогенетическое действие белого фосфора // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2019. Т. 9. N 1. С. 81–94. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-1-81-94>
15. Mindubaev A.Z., Babynin E.V., Voloshina A.D., Saparmyradov K.A., Akosah Y.A., Badeeva E.K., et al. The possibility of neutralizing white phosphorus using microbial cultures // Известия Национальной академии наук Республики Казахстан. Серия химии и технологии. 2019. Т. 5. P. 122–128. <https://doi.org/10.32014/2019.2518-1491.63>
16. Mindubaev A.Z., Kuznetsova S.V., Evtyugin V.G., Daminova A.G., Grigoryeva T.V., Romanova Y.D., et al. Effect of White Phosphorus on the Survival, Cellular Morphology, and Proteome of *Aspergillus niger* // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2020. Vol. 56. Issue 2. P. 194–201. <https://doi.org/10.1134/S0003683820020118>
17. Kang X., Kirui A., Muszyński A., Widanage M.C.D., Chen A., Azadi P., et al. Molecular architecture of fungal cell walls revealed by solid-state NMR // *Nature Communications*. 2018. Vol. 9. Article number 2747. 12 p. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05199-0>
18. Willger S.D., Puttikamonkul S., Kim K.-H., Burritt J.B., Grahl N., Metzler L.J., et al. A sterol-regulatory element binding protein is required for cell polarity, hypoxia adaptation, azole drug resistance, and virulence in *Aspergillus fumigatus* // *PLoS Pathogens*. 2008. Vol. 4. Issue 11. P. e1000200. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000200>
19. Миндубаев А.З., Волошина А.Д., Бадеева Е.К., Стробыкина А.С., Бабаев В.М., Минзанова С.Т., [и др.]. Динамика превращений белого фосфора культурой черного аспергилла // Бутлеровские сообщения. 2017. Т. 51. N 8. С. 1–26.
20. Haussmann C., Rohdich F., Lottspeich F., Eberhardt S., Scheuring J., Mackamul S., et al. Dihydroneopterin triphosphate epimerase of *Escherichia coli*: purification, genetic cloning, and expres-

sion // Journal of Bacteriology. 1997. Vol. 179. Issue 3. P. 949–951. <https://doi.org/10.1128/jb.179.3.949-951.1997>

21. Sankaran B., Bonnett S.A., Shah K., Gabriel S., Reddy R., Schimmel P., et al. Zinc-independent folate biosynthesis: genetic, biochemical, and structural investigations reveal new metal dependence for GTP cyclohydrolase IB // Journal of Bacteriology. 2009. Vol. 191. Issue 22. P. 6936–6949. <https://doi.org/10.1128/JB.00287-09>

22. Auerbach G., Herrmann A., Bracher A., Bader G., Gütlisch M., Fischer M., et al. Zinc plays a key role in human and bacterial GTP cyclohydrolase I // PNAS. 2000. Vol. 97. Issue 25. P. 13567–13572. <https://doi.org/10.1073/pnas.240463497>

23. Nar H., Huber R., Meining W., Schmid C., Weinkauff S., Bacher A. Atomic structure of GTP cyclohydrolase I // Structure. 1995. Vol. 3. Issue 5. P. 459–466. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(01\)00179-4](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(01)00179-4)

24. Harrieff M.J., Danelishvili L., Wu M., Wilder C., McNamara M., Kent M.L., et al. *Mycobacterium avium* genes MAV-5138 and MAV-3679 are tran-

scriptional regulators That play a role in invasion of epithelial cells, in part by their regulation of CipA, a putative surface protein interacting with host cell signaling pathways // Journal of Bacteriology. 2009. Vol. 191. Issue 4. P. 1132–1142. <https://doi.org/10.1128/JB.01359-07>

25. Миндубаев А.З., Бадеева Е.К., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Бабынин Э.В., Акосах Й.А. [и др.]. Устойчивость штаммов *Aspergillus niger* и бактерий к белому фосфору. Влияние двухвалентной меди на биodeградацию // Бутлеровские сообщения. 2018. Т. 56. N 11. С. 1–24.

26. Starkov A.A. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling // Annals of the New York Academy of Sciences. 2008. Vol. 1147. Issue 1. P. 37–52. <https://doi.org/10.1196/annals.1427.015>

27. Sciuto A.M., Wong B.J., Martens M.E., Hoard-Fruchey H., Perkins M.W. Phosphine toxicity: a story of disrupted mitochondrial metabolism // Annals of the New York Academy of Sciences. 2016. Vol. 1374. Issue 1. P. 41–51. <https://doi.org/10.1111/nyas.13081>

REFERENCES

1. Wackett LP. The metabolic pathways of biodegradation. *The Prokaryotes*. 2013;2:383–393.

2. Meckenstock RU, Elsner M, Griebler C, Lueders T, Stumpp C, Aamand J, et al. Biodegradation: updating the concepts of control for microbial cleanup in contaminated aquifers. *Environmental Science & Technology*. 2015;49(12):7073–7081. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00715>

3. Cummins CC. Phosphorus: from the stars to land & sea. *Daedalus*. 2014;143(4):9–20. https://doi.org/10.1162/DAED_a_00301

4. Cohen Y. Phosphorus dissolution from ash of incinerated sewage sludge and animal carcasses using sulphuric acid. *Environmental Technology*. 2009;30(11):1215–1226. <https://doi.org/10.1080/09593330903213879>

5. Kulaev IS. Inorganic polyphosphates and their role at different stages of cellular evolution. *Sorosovskii obrazovatel'nyi zhurnal = Soros Educational Journal*. 1996;2:28–35 (In Russian)

6. Smith SE, Jakobsen I, Grønlund M, Smith FA. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus nutrition: interactions between pathways of phosphorus uptake in arbuscular mycorrhizal roots have important implications for understanding and manipulating plant phosphorus acquisition. *Plant Physiology*. 2011;156(3):1050–1057. <https://doi.org/10.1104/pp.111.174581>

7. Amalraj ELD, Maiyappan S, Peter AJ. *In vivo* and *in vitro* studies of *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum* on nutrient mobilization, antagonism and plant growth promoting traits. *Journal of Eco-biotechnology*. 2012;4(1):35–42.

8. Pedersen BP, Kumar H, Waight AB, Riskenmay AJ, Roe-Zurz Z, Chau BH, et al. Crystal

structure of a eukaryotic phosphate transporter. *Nature*. 2013;496(7446):533–536. <https://doi.org/10.1038/nature12042>

9. Relyea HA, van der Donk WA. Mechanism and applications of phosphite dehydrogenase. *Bioorganic Chemistry*. 2005;33(3):171–189. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2005.01.003>

10. Kononova SV, Nesmeyanova MA. Phosphonates and their degradation by microorganisms. *Biochemistry (Moscow)*. 2002;67(2):184–195. <https://doi.org/10.1023/a:1014409929875>

11. Ternan NG, Mc Grath JW, Mc Mullan G, Quinn JP. Review: Organophosphonates: occurrence, synthesis and biodegradation by microorganisms. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 1998;14(5):635–647. <https://doi.org/10.1023/A:1008848401799>

12. Mindubaev AZ, Badeeva EK, Minzanova ST, Babynin EV, Mironova LG, Nizamov IS, et al. Metabolism of phosphorus compounds and taxonomic position of the *Aspergillus niger* AM1 mold. *Butlerovskie soobshcheniya = Butlerov Communications*. 2020;62(6):98–124. (In Russian) <https://doi.org/10.37952/ROI-jbc-01/20-62-6-98>

13. Mindubaev AZ. From a poison to a fertilizer. *Nauka i zhizn'*. 2019;3:46–47 (In Russian)

14. Mindubaev AZ, Babynin EV, Badeeva EK, Piskunov DB, Makhyanov AN, Minzanova ST, et al. Genotoxicity and cytogenetic effects of white phosphorus. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2019;9(1):81–94. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-1-81-94>

15. Mindubaev AZ, Babynin EV, Voloshina AD,

Saparmyradov KA, Akosah YA, Badeeva EK, et al. The possibility of neutralizing white phosphorus using microbial cultures. *Izvestiya Natsional'noi akademii nauk Respubliki Kazakhstan. Seriya himii i tekhnologii = News of the Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan*. 2019;5:122–128. (In English) <https://doi.org/10.32014/2019.2518-1491.63>

16. Mindubaev AZ, Kuznetsova SV, Evtyugin VG, Daminova AG, Grigoryeva TV, Romanova YD, et al. Effect of White Phosphorus on the Survival, Cellular Morphology, and Proteome of *Aspergillus niger*. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2020;56(2):194–201. <https://doi.org/10.1134/S0003683820020118>

17. Kang X, Kirui A, Muszyński A, Widanage MCD, Chen A, Azadi P, et al. Molecular architecture of fungal cell walls revealed by solid-state NMR. *Nature Communications*. 2018;9. Article number 2747. 12 p. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05199-0>

18. Willger SD, Puttikamonkul S, Kim K-H, Burritt JB, Grahl N, Metzler LJ, et al. A sterol-regulatory element binding protein is required for cell polarity, hypoxia adaptation, azole drug resistance, and virulence in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathogens*. 2008;4(11):e1000200. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000200>

19. Mindubaev AZ, Voloshina AD, Badeeva EK, Strobyskina AS, Babaev VM, Minzanova ST, et al. Dynamics of white phosphorus transformation by a culture of blackaspergill. *Butlerovskie soobshcheniya = Butlerov Communications*. 2017;51(8):1-26. (In Russian)

20. Haussmann C, Rohdich F, Lottspeich F, Eberhardt S, Scheuring J, Mackamul S, et al. Dihydroneopterin triphosphate epimerase of *Escherichia coli*: purification, genetic cloning, and expression. *Journal of Bacteriology*. 1997;179(3):949–951. <https://doi.org/10.1128/jb.179.3.949-951.1997>

21. Sankaran B, Bonnett SA, Shah K, Gabriel S, Reddy R, Schimmel P, et al. Zinc-independent folate biosynthesis: genetic, biochemical, and structural investigations reveal new metal dependence for GTP cyclohydrolase IB. *Journal of Bacteriology*. 2009;191(22):6936–6949. <https://doi.org/10.1128/JB.00287-09>

22. Auerbach G, Herrmann A, Bracher A, Bader G, Gütllich M, Fischer M, et al. Zinc plays a key role in human and bacterial GTP cyclohydrolase I. *PNAS*. 2000;97(25):13567–13572. <https://doi.org/10.1073/pnas.240463497>

23. Nar H, Huber R, Meining W, Schmid C, Weinkauff S, Bacher A. Atomic structure of GTP cyclohydrolase I. *Structure*. 1995;3(5):459–466. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(01\)00179-4](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(01)00179-4)

24. Harriff MJ, Danelishvili L, Wu M, Wilder C, McNamara M, Kent ML, et al. *Mycobacterium avium* genes MAV-5138 and MAV-3679 are transcriptional regulators That play a role in invasion of epithelial cells, in part by their regulation of CipA, a putative surface protein interacting with host cell signaling pathways. *Journal of Bacteriology*. 2009;191(4):1132–1142. <https://doi.org/10.1128/JB.01359-07>

25. Mindubaev AZ, Badeeva EK, Minzanova ST, Mironova LG, Babynin EV, Akosah YA. et al. The resistance of *Aspergillus niger* strains and bacteria to white phosphorus. The impact of divalent copper on biodegradation. *Butlerovskie soobshcheniya = Butlerov Communications*. 2018;56(11):1–24. (In Russian)

26. Starkov AA. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008;1147(1):37–52. <https://doi.org/10.1196/annals.1427.015>

27. Sciuto AM, Wong BJ, Martens ME, Hoard-Fruchey H, Perkins MW. Phosphine toxicity: a story of disrupted mitochondrial metabolism. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2016;1374(1):41–51. <https://doi.org/10.1111/nyas.13081>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Миндубаев Антон Зуфарович,
к.х.н., старший научный сотрудник,
Институт энергетики и перспективных
технологий ФИЦ «Казанский научный
центр РАН»,
420111, г. Казань, ул. Лобачевского, 2/31,
Российская Федерация,
✉ e-mail: mindubaev@iopc.ru;
mindubaev-az@yandex.ru; a.mindubaev@knc.ru

Федосимова Светлана Владимировна,
младший научный сотрудник,
Междисциплинарный центр
«Аналитическая микроскопия»,
Казанский (Приволжский) федеральный
университет,
420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18,
Российская Федерация,
e-mail: svtkuzn@gmail.com

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Anton Z. Mindubaev,
Cand. Sci. (Chemistry), Senior Scientist,
Institute of Power Engineering and Advanced
Technologies, FRC Kazan Scientific Center RAS,
2/31, Lobachevsky St., Kazan, 420111,
Russian Federation,
✉ e-mail: mindubaev@iopc.ru;
mindubaev-az@yandex.ru; a.mindubaev@knc.ru

Svetlana V. Fedosimova,
Junior Researcher,
Interdisciplinary Center for Analytical Microscopy,
Kazan (Volga region) Federal University,
18, Kremlevskaya St., Kazan, 420008,
Russian Federation,
e-mail: svtkuzn@gmail.com

Григорьева Татьяна Владимировна,
к.б.н., старший научный сотрудник,
директор Междисциплинарного центра
протеомных исследований,
Институт фундаментальной медицины
и биологии,
Казанский (Приволжский) федеральный
университет,
420021, г. Казань, ул. Парижской Коммуны, 9,
Российская Федерация,
e-mail: tatabio@inbox.ru

Романова Валерия Александровна,
младший научный сотрудник,
Междисциплинарный центр протеомных
исследований,
Институт фундаментальной медицины
и биологии
Казанский (Приволжский) федеральный
университет,
420021, г. Казань, ул. Парижской Коммуны, 9,
Российская Федерация,
e-mail: avonamora-94@mail.ru

Бабаев Василий Михайлович,
к.х.н., старший научный сотрудник, доцент,
заведующий лабораторией физико-
химического анализа,
Институт органической и физической химии
им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН,
420088, г. Казань, ул. Академика Арбузова, 8,
Российская Федерация,
e-mail: babaev-84@mail.ru

Бузюрова Дaina Нурлановна,
младший научный сотрудник,
Институт органической и физической химии
им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН,
420088, г. Казань, ул. Академика Арбузова, 8,
Российская Федерация,
e-mail: daina-i@yandex.ru

Бабынин Эдуард Викторович,
к.б.н., доцент,
Институт фундаментальной медицины
и биологии,
Казанский (Приволжский) федеральный
университет,
420000, г. Казань, ул. Университетская, 18,
Российская Федерация,
e-mail: edward.b67@mail.ru

Бадеева Елена Казимировна,
к.х.н., научный сотрудник,
Институт органической и физической химии
им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН,
420088, г. Казань, ул. Академика Арбузова, 8,

Tatiana V. Grigoryeva,
Cand. Sci. (Biology), Senior Scientist,
Director of Interdisciplinary Centre
for Proteomic Research,
Institute of Fundamental Medicine
and Biology,
Kazan (Volga region) Federal University,
9, Parizhskoi Kommuny St., Kazan, 420021,
Russian Federation,
e-mail: tatabio@inbox.ru

Valeriia A. Romanova,
Junior Researcher,
Interdisciplinary Centre for Proteomic Research,
Institute of Fundamental Medicine and Biology,
Kazan (Volga region) Federal University,
9, Parizhskoi Kommuny St., Kazan, 420021,
Russian Federation,
e-mail: avonamora-94@mail.ru

Vasily M. Babaev,
Cand. Sci. (Chemistry), Senior Scientist,
Associate Professor,
Head of Laboratory of Physicochemical Analysis,
A.E. Arbuzov Institute of Organic and Physical
Chemistry,
Kazan Scientific Center RAS,
8, Arbuzov St., Kazan, 420088,
Russian Federation,
e-mail: babaev-84@mail.ru

Daina N. Buzyurova,
Junior Researcher,
A.E. Arbuzov Institute of Organic and Physical
Chemistry,
Kazan Scientific Center RAS,
8, Arbuzov St., Kazan, 420088,
Russian Federation,
e-mail: daina-i@yandex.ru

Edward V. Babynin,
Cand. Sci. (Biology), Associate Professor,
Institute of Fundamental Medicine and Biology,
Kazan (Volga region) Federal University,
18, Universitetskaya St., Kazan, 420000,
Russian Federation,
e-mail: edward.b67@mail.ru

Elena K. Badeeva,
Cand. Sci. (Chemistry), Researcher,
A.E. Arbuzov Institute of Organic and Physical
Chemistry,
Kazan Scientific Center RAS,

Российская Федерация,
e-mail: ybadeev.61@mail.ru

8, Arbuzov St., Kazan, 420088,
Russian Federation,
e-mail: ybadeev.61@mail.ru

Минзанова Салима Тахиятулловна,
к.т.н., доцент, старший научный сотрудник,
Институт органической и физической химии
им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН,
420088, г. Казань, ул. Академика Арбузова, 8,
Российская Федерация,
e-mail: minzanova@iopc.ru

Salima T. Minzanova,
Cand. Sci. (Engineering), Associate Professor,
Senior Scientist,
A.E. Arbuzov Institute of Organic and Physical
Chemistry,
Kazan Scientific Center RAS,
8, Arbuzov St., Kazan, 420088,
Russian Federation,
e-mail: minzanova@iopc.ru

Миронова Любовь Геннадьевна,
инженер-исследователь,
Институт органической и физической химии
им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН,
420088, г. Казань, ул. Академика Арбузова, 8,
Российская Федерация,
e-mail: mironoval1963@gmail.com

Lyubov' G. Mironova,
Research Engineer,
A.E. Arbuzov Institute of Organic and Physical
Chemistry,
Kazan Scientific Center RAS,
8, Arbuzov St., Kazan, 420088,
Russian Federation,
e-mail: mironoval1963@gmail.com

Акосах Йав Абайе,
аспирант,
Институт фундаментальной медицины
и биологии,
Казанский (Приволжский) федеральный
университет,
420000, г. Казань, ул. Университетская, 18,
Российская Федерация,
e-mail: akosah2005@gmail.com

Yaw A. Akosah,
Postgraduate Student,
Institute of Fundamental Medicine and Biology,
Kazan (Volga region) Federal University,
18, Universitetskaya St., Kazan, 420000,
Russian Federation,
e-mail: akosah2005@gmail.com

Караева Юлия Викторовна,
к.т.н., ведущий научный сотрудник,
Институт энергетики и перспективных
технологий ФИЦ «Казанский научный центр
РАН»,
420111, г. Казань, ул. Лобачевского, 2/31,
Российская Федерация,
e-mail: julieenergy@list.ru

Julia V. Karaeva,
Cand. Sci. (Engineering),
Institute of Power Engineering and Advanced
Technologies, FRC Kazan Scientific Center RAS,
2/31, Lobachevsky St., Kazan, 420111,
Russian Federation,
e-mail: julieenergy@list.ru

Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests re-
garding the publication of this article.

*Все авторы прочитали и одобрили оконча-
тельный вариант рукописи.*

*The final manuscript has been read and approved
by all the co-authors.*

*Поступила в редакцию 21.09.2020.
Одобрена после рецензирования 25.12.2020.
Принята к публикации 28.02.2021.*

*The article was submitted 21.09.2020.
Approved after reviewing 25.12.2020.
Accepted for publication 28.02.2021.*

Оригинальная статья / Original article

УДК 578.7:615.32

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-80-89>



Влияние синего света при культивировании мицелия *Inonotus rheades* на биологические свойства водных экстрактов

© Г.Б. Боровский*, Т.Г. Горностай*, М.С. Полякова*,
М.К. Боровская*, М.А. Хаснатинов**,
И.С. Соловаров**, Г.А. Данчинова**

*Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
г. Иркутск, Российская Федерация

**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»
г. Иркутск, Российская Федерация

Резюме: Цель работы – определить, зависят ли антиоксидантные, цитотоксические и вирулицидные свойства водных экстрактов из мицелия *Inonotus rheades* от условий освещения при его культивировании. Было изучено влияние освещения синим светом на мицелий *I. rheades*, который культивировали на древесине березы при температуре $25 \pm 1^\circ \text{C}$ в темноте или при постоянном освещении синими светодиодами мощностью $12,8 \text{ Вт/м}^2$. В ходе работы были получены две фракции водорастворимых полисахаридов: ВР-5 – выделенные из мицелия, выращенного при освещении синим светом; ВР-6 – выделенные из мицелия, выращенного в темноте. Экстракт из мицелия, выросшего в условиях освещения синим светом, проявлял большую антиоксидантную активность, чем экстракт из мицелия, выращенного в темноте. Исследование действия экстрактов на тестовую культуру опухолевых клеток показало, что экстракты вызывают небольшую гибель клеток на 6-е сутки совместной инкубации. Цитостатическое действие экстрактов также проявлялось спустя 6 суток. Плотность культуры при максимальных концентрациях уменьшалась до 60% от контроля для экстракта ВР-6 и до 20% – для экстракта ВР-5. Результаты измерения противовирусной активности экстрактов показали, что экстракты ВР-5 и ВР-6 полностью уничтожают вирус клещевого энцефалита. Экспериментально показано, что после нормализации значений pH экстрактов в обоих экстрактах присутствуют компоненты, проявляющие существенное противовирусное действие. Индекс ингибирования для экстракта ВР-5 составил 3, а для ВР-6 – 2 Ig БОЕ/мл. Это позволяет предположить, что концентрация вирулицидных компонентов в экстракте из мицелия, выращенного в условиях освещения синим светом, приблизительно в 10 раз выше, чем в экстракте из мицелия, выращенного в темноте. Таким образом, в экстрактах из мицелия *I. rheades*, выращенного на дисках березы, содержатся вещества, имеющие антиоксидантные, цитостатические вирулицидные свойства. Их накопление стимулируется синим светом.

Ключевые слова: *Inonotus rheades*; водорастворимые полисахариды; биологическая, антиоксидантная, цитостатическая и противовирусная активность; вирус клещевого энцефалита; действие синего света

Благодарности: Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Иркутской области в рамках научного проекта № 20-44-380010.

Для цитирования: Боровский Г.Б., Горностай Т.Г., Полякова М.С., Боровская М.К., Хаснатинов М.А., Соловаров И.С., Данчинова Г.А. Влияние синего света при культивировании мицелия *Inonotus rheades* на биологические свойства водных экстрактов. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2021. Т. 11. N 1. С. 80–89. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-80-89>

Impact of blue light on the biological properties of aqueous extracts during the cultivation of the *Inonotus rheades* mycelium

Gennadii B. Borovskii*, Tatyana G. Gornostai*, Marina S. Polyakova*,
Marina K. Borovskaja*, Maxim A. Khasnatinov**,
Innokentiy S. Solovarov**, Galina A. Danchinova**

*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS,
Irkutsk, Russian Federation

**Federal State Public Scientific Institution
“Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems”
Irkutsk, Russian Federation

Abstract: The aim was to determine whether the antioxidant, cytotoxic and virucidal properties of aqueous extracts isolated from the *Inonotus rheades* basidiomycete depend on the illumination of the mycelium during cultivation. Effects of blue light illumination on the mycelium of *I. rheades*, which was cultivated on birch wood at 25 ± 1 °C in the dark and under a constant illumination of 12.8 W/m^2 were studied. In the course of the work, two fractions of water-soluble polysaccharides were obtained: BP-5 – isolated from the mycelium grown under blue light; BP-6 – isolated from mycelium grown in the dark. Two fractions of water-soluble polysaccharides were obtained during the study: BP-5 – water-soluble polysaccharides isolated from the mycelium grown under blue light; BP-6 – water-soluble polysaccharides isolated from the mycelium grown in the dark. The extract from the mycelium grown under blue light showed a greater antioxidant activity than that from the mycelium grown in the dark. An analysis of the effect of the extracts under study on a test culture of tumour cells showed that the extracts cause the death of some amount of the cells on the 6th day of co-incubation. The cytostatic effect of the extracts was also manifested following 6 days. In comparison with the control, the density of the culture at maximum concentrations decreased to 60% and 20% for BP-6 and BP-5, respectively. The results of measuring the antiviral activity of the extracts showed that BP-5 and BP-6 completely destroy tick-borne encephalitis viruses. It was experimentally shown that, after normalisation of the pH values, both extracts contain components exhibiting a significant antiviral effect. The inhibition index for BP-5 and BP-6 comprised 3 and 2 lg PFU/ ml, respectively. This suggests that the concentration of virucidal components in the extract from mycelium grown under blue light is approximately 10 times higher than that in the extract from the mycelium grown in the dark. Thus, the extracts from the mycelium of *I. rheades* grown on birch discs contain substances exhibiting antioxidant, cytostatic and virucidal properties. The accumulation of these properties can be stimulated by blue light illumination.

Keywords: *Inonotus rheades*; water-soluble polysaccharides; biological, antioxidant, cytostatic and antiviral activity; tick-borne encephalitis virus; blue light action

Acknowledgments: The study was carried out with the financial support of the Russian Fund for Basic Research and the Government of the Irkutsk Region as part of the scientific project No. 20-44-380010.

For citation: Borovskii GB, Gornostai TG, Polyakova MS, Borovskaja MK, Khasnatinov MA, Solovarov IS, Danchinova GA. Impact of blue light on the biological properties of aqueous extracts during the cultivation of the *Inonotus rheades* mycelium. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(1):80–89. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-80-89>

ВВЕДЕНИЕ

Свет служит важнейшим фактором, в целом влияющим на рост и развитие грибов [1]. Известно, что грибы имеют светочувствительные системы – хроматофоры, воспринимающие свет и участвующие в ответных реакциях грибного организма [2]. Отмечено существование механизмов восприятия УФ-излучения, синего, зеленого и красного света [2, 3]. Развитие технологий культивирования грибов в биотехнологических целях с использованием искусственного подсвечивания, в частности, с применением светодиодных ламп, дало возможность более детального исследования влияния света разных участков спектра на рост грибов. Так, использование красного света приводило к усилению роста и увеличению выхода биомассы мицелия *Laetiporus sulphureus* [4], *Coriolus vaporarius* и *Serpula lacrimans* [5]. Получению большого количества плодовых тел *Hypsizygus marmoreus* способствовало облучение синими и зелеными диодами [6], а для *Pleurotus citrinopileatus* – красными, при

этом полученные плодовые тела имели более высокую биологическую эффективность [7]. Повышение биологической активности также обнаружено при облучении глубинной культуры *Pleurotus ostreatus*. Низкоинтенсивное лазерное облучение с длиной волны 632,8 нм в непрерывном и импульсном режиме позволило увеличить антимикробную активность мицелия и культуральной жидкости *P. ostreatus* по отношению к *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* и *Bacillus mycoides* на 10–20% [4].

В настоящее время доказано влияние света на метаболизм и содержание многих метаболитов у грибов [1, 8]. Использование синего света при выращивании гриба *Ganoderma lucidum* приводило к большему накоплению полисахаридов на каждой стадии его развития, чем при культивировании в темноте [9, 10]. Применение УФ-излучения увеличивало содержание полисахаридов в мицелии *Inonotus obliquus* до 2,4% [11]. Облучение синим и красным светом мицелия *G. lucidum* увеличивало накопление экзо- и эндо-

полисахаридов [12]. Частичное подавление образования фелигридинов и даваллиялактонов было отмечено для погруженной культуры *I. obliquus*, выращенной в синем и красном свете, в темноте содержание этих соединений было выше [13]. Для *I. rheades* также была обнаружена зависимость химического состава мицелия от длины волны света, которым он освещался при росте. В частности, было обнаружено влияние освещения на жирнокислотный состав мицелия [14], а также было установлено существенное повышение содержания стирилпионов при освещении мицелия синим светом [15].

Таким образом, изменяя такой параметр культивирования, как свет, можно управлять морфогенезом и биосинтезом метаболитов грибного организма. Использование света как контролируемого экологического фактора, регулирующего рост, развитие и химический состав грибов, является актуальным. В связи с расширением темы исследования была поставлена цель – определить, зависят ли антиоксидантные, цитотоксические и вирулицидные свойства водных экстрактов из мицелия *Inonotus rheades* от условий освещения при его культивировании.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектом исследования являлся мицелий базидиального гриба *Inonotus rheades* штамм 287 из коллекции грибных культур Центра коллективного пользования «Биоресурсный центр» Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН, который культивировали на древесных дисках *Betula pendula* Roth (Betulaceae). Субстрат был стерилизован и затем инокулирован мицелием *I. rheades*. Культивирование мицелия вели при температуре 25 ± 1 °C в темноте, а также при освещении синими светодиодами мощностью $12,8 \text{ Вт/м}^2$. Из полученного мицелия выделяли фракцию водорастворимых полисахаридов (ВРПС) с использованием методики, представленной в работе [16]. Переработку экстракта делали с использованием стерильной воды, далее экстракт пропускали через бактериальный фильтр с порами диаметром 22 мкм. Раствор ВРПС хранили при минус 20 °C.

Определение общего антиоксидантного потенциала (ТАС) экстрактов проводили по методике, представленной в работе [17], определение активности экстрактов, направленной на нейтрализацию радикалов, – с использованием свободного радикала ABTS^+ – по методике авторов работы [18].

В качестве тестовой культуры клеток была использована клеточная линия А-549, полученная из карциномы легкого человека [19], приобретенная в ООО «БиолоТ» (Россия). Клетки А-549 культивировали при 37 °C и 5% CO_2 в сре-

де DMEM с добавлением антибиотиков и 10% фетальной бычьей сыворотки. Эксперименты по цитотоксическому и тормозящему рост действию ВРПС на клетки культуры проводили в стандартных 96-луночных планшетах (Sarstedt, Германия): при достижении стадии 100% конфлюэнтности – для исследования цитотоксического действия, стадии 50–60% конфлюэнтности – для исследования цитостатического влияния. Для оценки влияния ВРПС на жизнеспособность клеток монослой инкубировали с тестируемым образцом в серии двукратных разведений в течение 1, 3 и 6 суток. Параллельно инкубировали контрольные образцы клеток, в которых вместо экстрактов использовали стерильный фосфатно-солевой буфер. Эксперимент воспроизводили в 3–4-х независимых повторях. Для определения тормозящего рост культуры действия ВРПС экстракты вносили в лунки по достижении 50-60% конфлюэнтности, что происходило после 24 ч, и инкубировали с растущей культурой клеток в течение указанных сроков.

Для определения эффекта действия ВРПС по истечении срока инкубации слой клеток промывали стерильным фосфатно-солевым буфером, фиксировали 10%-м формалином и окрашивали кристаллическим фиолетовым. Для сравнительной оценки количества жизнеспособных клеток, проводили экстракцию красителя в 100 мкл метанола и измеряли оптическую плотность (ОП) экстрактов при длине волны 630 нм с помощью спектрофотометра FLUOstar Omega (BMG Labtech, Германия). Долю жизнеспособных клеток после контакта с исследуемым экстрактом в заданной концентрации рассчитывали как отношение ОП экстракта кристаллического фиолетового в лунке с препаратом к ОП экстракта кристаллического фиолетового в лунке с контрольным монослоем и выражали в процентах.

Для оценки противовирусной активности использовали охарактеризованный ранее изолят вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) 92М [20]. Культивирование ВКЭ проводили в клеточной линии почки эмбриона свиньи СПЭВ (НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург). Инфекционность вируса определяли с помощью титрования бляшкообразующих единиц в культуральной среде и выражали в виде lg БОЕ/мл . Поддержание культур клеток осуществляли на среде RPMI1640 с добавлением антибиотиков и 5% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) HyClone (Thermo Scientific, Россия).

Противовирусную активность определяли в соответствии с методикой, предложенной в работе [21], с учетом дальнейших модификаций. Для оценки ингибирующего действия экстрактов на вирионы ВКЭ, 100 мкл среды RPMI 1640 (без сыворотки), содержащей 30000 БОЕ ВКЭ, смешивали с равным объемом тестируемого экстракта в концентрации 8 мг/мл. Таким образом,

рабочая концентрация экстрактов составляла 4 мг/мл. Референс-образец приготавливали, смешивая 100 мкл вирусной суспензии с равным объемом стерильной бидистиллированной воды. В качестве положительного контроля использовали донорский иммуноглобулин человека против клещевого энцефалита производства НПО «Микроген» МЗ РФ (Томск) в концентрации 1 мг/мл. Смеси инкубировали при 37 °С в течение 30 мин и затем определяли концентрацию инфекционного ВКЭ в каждом образце с помощью титрования БОЕ согласно уже указанной методике [21]. Индекс ингибирования (ИИ) рассчитывали как разницу титра ВКЭ (в логарифмическом выражении) в референс-образце и титра ВКЭ в образце, обработанном исследуемым препаратом.

Все эксперименты проводили в трех независимых повторах, результаты представляли в виде средних значений. Для оценки внутригрупповой вариабельности результатов рассчитывали стандартное отклонение. Обработку результатов производили с помощью программы MSOffice EXCEL (Microsoft, США). Исследования противовирусной активности проводились в лаборатории, лицензированной для работ с возбудителями инфекционных заболеваний II–IV группы патогенности.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Выход и антиоксидантные свойства экстрактов ВРПС из мицелия, выращенного в темноте и при освещении. В ходе работы были получены две фракции ВРПС: ВР-5 – ВРПС мицелия, выращенного на древесных дисках при освещении синим светом, ВР-6 – ВРПС мицелия, выращенного на древесных дисках в темноте.

Данные, приведенные в таблице, показывают положительное влияние освещения на содержание ВРПС в мицелии. Так, экстракты ВРПС, выделенные из мицелия, выращенного в условиях освещения синим светом, проявляют большую антиоксидантную активность, чем ВРПС из мицелия, культивированного в темноте. Подобное влияние синего света на метаболизм *I. rhodes* ранее было показано нами для фенольных соединений стирилпионов (веществ, имеющих высокий антиоксидантный потенциал) [15]. Из литературы также известно, что при освещении синим светом происходит увеличение содержания полисахаридов при культивировании *Ganoderma lucidum* [9, 10].

Характеристика ВРПС из *I. rhodes* при различных световых режимах выращивания
Characterization of WSPS from *I. rhodes* under different light growing regimes

ВРПС	Выход, г	ТАС, мг/г	ABTS [•] (IC ₅₀ , мг/г)
ВР-5	2,13	63,51±1,95	17,19±1,72
ВР-6	1,06	34,98±1,46	55,73±0,41

Примечание. Представлены средние значения (M ± SE).

Действие экстрактов ВРПС на раковые клетки человека. Результаты исследования цитотоксической активности экстрактов ВР-5 и ВР-6 показали, что действие экстрактов на клетки А-549 довольно слабое. Так, после 1-х и 3-х суток инкубации значимого влияния экстрактов ВР-5 и ВР-6 отмечено не было. После 6-ти суток было замечено уменьшение количества живых клеток на 20–30% от контроля при максимальной исследованной концентрации 1000 мкг/мл (данные не представлены).

При определении цитостатического действия ВРПС на культуру клеток оказалось, что спустя трое суток совместной инкубации с клетками экстракты тормозили рост достаточно сильно только в высокой концентрации. На рис. 1 показано антипролиферативное действие экстрактов ВРПС из мицелия *I. rhodes* на культуру клеток А-549 после 6-ти суток совместной инкубации.

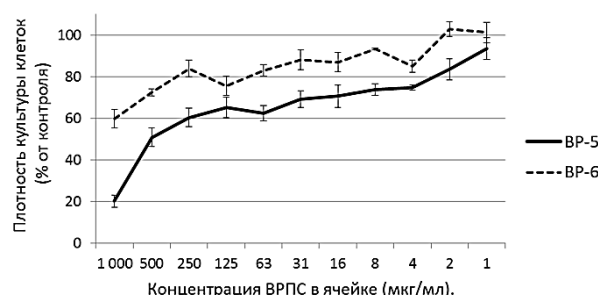


Рис. 1. Антипролиферативное действие экстрактов ВРПС из мицелия *I. rhodes* на культуру клеток А-549 после 6-ти суток совместной инкубации. Планки погрешностей отражают стандартное отклонение средних значений по результатам четырех независимых воспроизведений эксперимента

Fig. 1. Antiproliferative effect of extracts of VRPS from *I. rhodes* mycelium on A-549 cell culture after 6 days of co-incubation. Error bars represent the standard deviation of the means from four independent replicates of the experiment

Из представленных на рис. 1 графиков видно, что наиболее четко тормозящее рост и деление клеток действие ВР-5 и ВР-6 проявлялось спустя 6 суток. Плотность культуры уменьшалась до 60% от контроля для экстракта ВР-6 и до 20% – для экстракта ВР-5. При разведении экстракта интенсивность угнетения роста культуры довольно быстро уменьшалась. Таким образом, экстракты тормозили деление и рост клеточной культуры карциномы легкого (А-549) дозозависимым способом, при этом, стоит отметить, экстракт из мицелия, выращенного при синем свете (ВР-5) приводил к большему торможению роста плотности культуры А-549.

Известно, что полисахариды грибов проявляют противоопухолевую активность главным образом посредством активации иммунной системы организма [22, 23], а не прямым действи-

ем на раковые клетки. Тем не менее, ВРПС из *I. rheades* продемонстрировали регистрируемый цитостатический эффект, причем он также оказался светозависимым.

Противовирусные свойства экстрактов ВРПС. Результаты измерения противовирусной активности экстрактов, представленные в виде диаграммы на рис. 2, показывают, что экстракты ВР-5 и ВР-6 полностью уничтожили ВКЭ. На рис. 2 также представлены данные по референс-образцу ВКЭ, обработанному стерильной бидистиллированной водой. Контролем служил иммуноглобулин человека против клещевого энцефалита в концентрации 1 мг/мл.

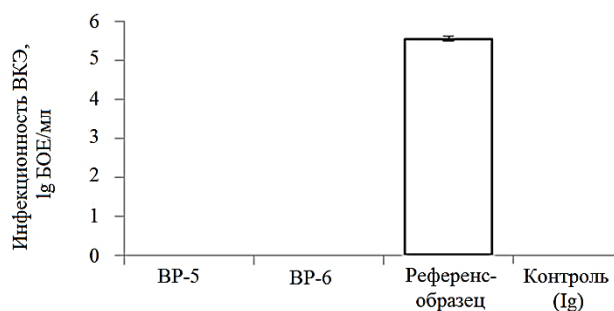


Рис. 2. Вирулицидное действие водных экстрактов ВРПС из мицелия, выращенного при освещении синим светом (ВР-5) и в темноте (ВР-6), по отношению к ВКЭ (рабочая концентрация – 0,4 мг/мл). Планки погрешностей отражают стандартное отклонение средних значений по результатам трех независимых воспроизведений эксперимента

Fig. 2. Antiviral effect of aqueous extracts of WSPS from mycelium grown under the blue light (ВР-5) and in the dark (ВР-6) against TBEV (working concentration – 0.4 mg/ml). Error bars represent the standard deviation of the means from three independent replicates of the experiment

Однако измерение pH экстрактов показало, что экстракты ВР-5 и ВР-6 определенно закислены – $\text{pH} < 5,8$. Это могло вызывать неспецифическое снижение инфекционности за счет необратимого pH-зависимого изменения конформации оболочечного белка вируса. Для нейтрализации кислотности экстрактов *I. rheades*, стоковые экстракты были растворены в стерильном фосфатно-солевом буфере ($\text{pH} = 7,4$) до концентрации 0,8 мг/мл, что обеспечивало рабочую концентрацию 0,4 мг/мл. Итоговая кислотность была близка к нейтральным значениям pH. Оказалось, что при нейтральных значениях pH экстракты ВР-5 и ВР-6 также проявляют вирулицидные свойства в концентрации 0,4 мг/мл и снижают количество инфекционного ВКЭ в 1000 и 100 раз соответственно (рис. 3).

Сравнение полученных данных показывает, что исключительные вирулицидные свойства экстрактов ВР-5 и ВР-6 в значительной мере обусловлены кислотностью растворов. Однако даже при приведении кислотности среды к

нейтральной в обоих экстрактах присутствуют компоненты, проявляющие существенное специфическое противовирусное действие. Индекс ингибирования для экстракта ВР-5 составил 3, а для ВР-6 – 2 lg БОЕ/мл. Это позволяет предположить, что концентрация вирулицидных компонентов (или индивидуального компонента) в экстракте из мицелия, выращенного в условиях освещения синим светом (ВР-5), приблизительно в 10 раз выше, чем в экстракте из мицелия, выращенного в темноте (ВР-6). Ранее, мы определили, что *I. rheades* содержит в мицелии водорастворимые вещества, обладающие вирулицидными свойствами в отношении ВКЭ [24]. В данной работе было показано, что их накопление стимулируется освещением синим светом.

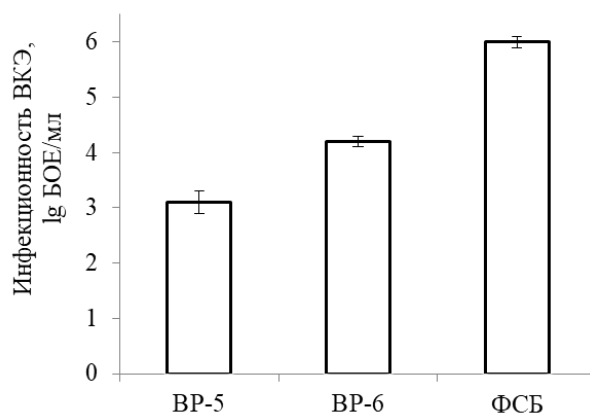


Рис. 3. Вирулицидное действие в отношении ВКЭ экстрактов ВРПС, приведенных к нормальной кислотности растворов (рабочая концентрация 0,4 мг/мл). ВР-5 – экстракт из мицелия, выращенного при освещении синим светом; ВР-6 – экстракт из мицелия, выращенного в темноте; ФСБ – образец ВКЭ, обработанный фосфатно-солевым буфером ($\text{pH} = 7,4$). Планки погрешностей отражают стандартное отклонение средних значений по результатам трех независимых воспроизведений эксперимента

Fig. 3. Virucidal action against TBEV of extracts of WSPS reduced to normal acidity of solutions (working concentration 0.4 mg/ml). ВР-5 – extract from mycelium grown under blue light illumination; ВР-6 – extract from mycelium grown in the dark; ФСБ – TBEV sample treated with phosphate-buffered saline ($\text{pH} = 7.4$). Error bars represent the standard deviation of the means from three independent replicates of the experiment

Несмотря на то что грибы не содержат хлорофилла, они весьма чувствительны к свету. Свет регулирует развитие и рост грибов, морфогенез и биосинтез веществ первичного и вторичного метаболизма. Большинство видов «видят» синий свет. Некоторые виды грибов реагируют и на остальную часть видимого спектра, а также на ультрафиолет (см., например, [25]). Работ по стимуляции антиоксидантных свойств экстрактов из грибов и накоплению потенциально противоопухолевых веществ освещением не так уж мало [26–32]. Но в то же время практически не встре-

чаются публикации по исследованию стимуляции накопления веществ, имеющих противовирусную активность. В качестве близкой по тематике можно привести работу [33], где показано многократное увеличение биосинтеза шикимовой кислоты – предшественника синтетического ингибитора вирусной нейраминидазы в противовирусном препарате Тамифлю, в мицелии вещества в ответ на освещение синим светом. Нет сомнений, что вещества, имеющие противовирусные свойства и накапливающиеся в грибах в ответ на стимуляцию светом, существуют. Более того, возможно, они уже известны науке, учитывая широкий спектр найденных противовирусных свойств экстрактов из грибов [34], но светочувствительность индукции их накопления пока не исследовалась.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные эксперименты подтвердили гипотезу о том, что в мицелии *I. rheades* содержатся соединения, проявляющие противовирусную, антипролиферативную и антиоксидантную активность. Как было обнаружено ранее, возможность синтеза этих соединений определяется субстратом, на котором выращивается мицелий. В данной работе показано, что их накопление стимулируется освещением синим светом. Необходимы дальнейшие исследования для более точной идентификации активных соединений, выявления их биологических свойств, определения мишеней воздействия. Регуляция параметров освещения мицелия, используемого в качестве сырья в биотехнологии, является актуальной, поскольку позволяет существенно увеличить выход и повысить эффективность биологических свойств целевых веществ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tisch D., Schmoll M. Light regulation of metabolic pathways in fungi // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010. Vol. 85. P. 1259–1277. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2320-1>
2. Purschwitz J., Müller S., Kastner C., Fischer R. Seeing the rainbow: light sensing in fungi // *Current Opinion in Microbiology*. 2006. Vol. 9. Issue 6. P. 566–571. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.10.011>
3. Herrera-Estrella A., Horwitz B.A. Looking through the eyes of fungi: molecular genetics of photoreception // *Molecular Microbiology*. 2007. Vol. 64. Issue 1. P. 5–15. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05632.x>
4. Поединок Н.Л., Ефременкова О.В., Михайлова О.Б., Негрийко А.М. Биосинтетическая активность некоторых высших лекарственных грибов после световых воздействий // *Успехи медицинской микологии*. 2007. Т. 9. С. 176–178.
5. Manachere G. Research on the fruiting rhythm of a basidiomycete mushroom *Coprinus congregatus* Bull. Ex Fr. // *Journal of interdisciplinary cycle research*. 1971. Vol. 2. Issue 2. P. 199–209.
6. Namba K., Inatomi S., Mori K., Shimosaka M., Okazaki M. Effects of LED lights on fruiting-body production in *Hypsizygus marmoreus* // *Mushroom Science and Biotechnology*. 2002. Vol. 10. P. 141–146. https://doi.org/10.24465/apmsb.10.3_141
7. Hu S.-H., Wu C.-Y., Chen Y.-K., Wang J.-C., Chang S.-J. Effect of light and atmosphere on the cultivation of the golden oyster culinary-medicinal mushroom, *Pleurotus citrinopileatus* (higher Basidiomycetes) // *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2013. Vol. 15. P. 101–111. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v15.i1.110>
8. Nakano Y., Fujii H., Kojima M. Identification of blue-light photoresponse genes in Oyster Mushroom mycelia // *Biochemistry & Molecular Biology Communications*. 2010. Vol. 74. Issue 10. P. 2160–2165. <https://doi.org/10.1271/bbb.100565>
9. Hao J. Chen X., Lan J. Effect of light quality on growth and polysaccharides content of *Ganoderma lucidum* // *China Journal of Chinese Materia Medica*. 2010. Vol. 35. Issue 17. P. 2242–2245.
10. Mei X.-L., Zhao Z., Chen X.-D., Lan J. Light quality regulation of growth and endogenous IAA metabolism of *Ganoderma lucidum* mycelium // *Chinese Journal of Natural Medicines*. 2013. Vol. 38. Issue 12. P. 1887–1892. <https://doi.org/10.4268/cjcmm.20131209>
11. Zhang L.Q. Effect of UV on the growth of *Inonotus obliquus* and the content of polysaccharide // *Renshen Yanjiu*. 2008. Vol. 9. P. 16–19.
12. Poyedinok N.L., Mykhailova O.B., Shcherba V.V., Buchalo A.S., Negryko A.M. Light regulation of growth and biosynthetic activity of Ling Zhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllphoromycetideae), in pure culture // *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2008. Vol. 10. Issue 4. P. 369–378. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v10.i4.100>
13. Zheng W., Zhang M., Zhao Y., Miao K., Jiang H. NMR-based metabonomic analysis on effect of light on production of antioxidant phenolic compounds in submerged cultures of *Inonotus obliquus* // *Bioresource Technology*. 2009. Vol. 100. Issue 19. P. 4481–4487. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.04.027>
14. Горностай Т.Г., Полякова М.С., Боровский Г.Б., Оленников Д.Н. Липиды *Inonotus rheades* (Hymenochaetaceae): влияние субстрата и светового режима на жирнокислотный профиль мицелия // *Химия растительного сырья*. 2018. N 1. С. 105–111. <https://doi.org/10.14258/jcprm.2018012713>
15. Gornostai T.G., Borovskii G.G., Kashchenko N.I., Olennikov D.N. Phenolic Compounds of *Inonotus rheades* (Agaricomycetes) Mycelium: RP-UPLC-DAD-ESI/MS Profile and Effect of Light Wavelength on the Styrylpyrone Content // *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2018. Vol. 20. Issue 7. P. 637–645 <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.2018026595>
16. Babitskaya V.G., Shcherba V.V., Puchkova

T.A., Smirnov D.A., Bis'ko N.A., Poyedinok N.L. Effect of conditions of submerged culturing of a medicinal fungus *Ganoderma lucidum* (reishi) on polysaccharide production // *Biotechnology in Russia*. 2007. Issue 6. P. 42–52.

17. Preito P., Pineda M., Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E // *Analytical Biochemistry*. 1999. Vol. 269. Issue 2. P. 337–341. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4019>

18. Ding H.-Y., Chou T.-H., Liang C.-H. Antioxidant and antimelanogenic properties of rosmarinic acid methyl ester from *Origanum vulgare* // *Food Chemistry*. 2010. Vol. 123. Issue 2. P. 254–262. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.04.025>

19. Giard D.J., Aaronson S.A., Todaro G.J., Arnstein P., Kersey J.H., Dosik H., et al. *In vitro* cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors // *Journal of the National Cancer Institute*. 1973. Vol. 51. P. 1417–1423. <https://doi.org/10.1093/jnci/51.5.1417>

20. Хаснатинов М.А., Данчинова Г.А., Злобин В.И., Ляпунов А.В., Арбатская Е.В., Чапоргина Е.А. [и др.]. Вирус клещевого энцефалита в Монголии // *Сибирский медицинский журнал (Иркутск)*. 2012. Т. 111. N 4. С. 9–12.

21. Gould E.A., Clegg J.C.S. Growth, titration and purification of togaviruses. In: Mahy B.W.J. (ed.), *Virology: A Practical Approach*. Oxford: IRL Press Ltd., 1985. P. 43–78.

22. Kim G.-Y., Lee J.-Y., Lee J.-O., Ryu C.-H., Choi B.T., Jeong Y.-K., et al. Partial Characterization and Immunostimulatory Effect of a Novel Polysaccharide-Protein Complex Extracted from *Phellinus linteus* // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2006. Vol. 70. Issue 5. P. 1218–1226. <https://doi.org/10.1271/bbb.70.1218>

23. Fan L., Ding S., Ai L., Deng K. Antitumor and immunomodulatory activity of water-soluble polysaccharide from *Inonotus obliquus* // *Carbohydrate Polymers*. 2012. Vol. 90. Issue 2. P. 870–874. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.06.013>

24. Горностай Т.Г., Хаснатинов М.А., Соловаров И.С., Данчинова Г.А., Боровский Г.Б. Противовирусные свойства водных экстрактов мицелия *Inonotus rheades* в отношении вируса клещевого энцефалита *in vitro* // *Актуальные проблемы науки Прибайкалья: сб. ст. / отв. ред. И.В. Бычков, А.Л. Казаков. Вып. 3. Иркутск: Изд-во ИГУ, 2020. С. 21–25.*

25. Corrochano L.M. Light in the Fungal World: From Photoreception to Gene Transcription and Be-

yond // *Annual Review of Genetics*. 2019. Vol. 53. P. 149–170. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120417-031415>

26. Vance C.P., Tregunna E.B., Nambudiri A.M., Towers G.H. Styrylpyrone biosynthesis in *Polyporus hispidus*: I. Action spectrum and photoregulation of pigment and enzyme formation // *Biochimica et Biophysica Acta*. 1974. Vol. 343. Issue 1. P. 138–147. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(74\)90245-1](https://doi.org/10.1016/0304-4165(74)90245-1)

27. Oh T.-J., Hyun S.-H., Lee S.-G., Chun Y.-J., Sung G.-H., Choi H.-K. NMR and GC-MS based metabolic profiling and free-radical scavenging activities of *Cordyceps pruinosa* mycelia cultivated under different media and light conditions // *PLoS One*. 2014. Vol. 9. Issue 6. P. e90823. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090823>

28. Buffoni Hall R.S., Bornman J.F., Bjorn L.O. UV-induced changes in pigment content and light penetration in the fruticose lichen *Cladonia arbuscula* ssp. mitis // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2002. Vol. 66. Issue 1. P. 13–20. [https://doi.org/10.1016/s1011-1344\(01\)00270-6](https://doi.org/10.1016/s1011-1344(01)00270-6)

29. Avalos J., Schrott E.L. Photoinduction of carotenoid biosynthesis in *Gibberella fujikuroi* // *FEMS Microbiology Letters*. 1990. Vol. 66. Issue 1-3. P. 295–298. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1990.tb04014.x>

30. Kim H., Son H., Lee Y.W. Effects of light on secondary metabolism and fungal development of *Fusarium graminearum* // *Journal of Applied Microbiology*. 2013. Vol. 116. Issue 2. P. 380–389. <https://doi.org/10.1111/jam.12381>

31. Zalokar M. Biosynthesis of carotenoids in *Neurospora* action spectrum of photoactivation // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1955. Vol. 56. Issue 2. P. 318–25. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(55\)90252-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(55)90252-6)

32. Poyedinok N.L. Light regulation of growth and melanin formation in *Inonotus obliquus* (Pers.) Pilat // *Biotechnologia Acta*. 2013. Vol. 6. Issue 2. P. 115–20. <https://doi.org/10.15407/biotech6.02.115>

33. Kojima M., Kimura N., Miura R. Regulation of primary metabolic pathways in Oyster Mushroom mycelia induced by blue light stimulation: accumulation of shikimic acid // *Scientific Reports*. 2015. Vol. 5. P. 8630. <https://doi.org/10.1038/srep08630>

34. Linnakoski R., Reshamwala D., Veteli P., Cortina-Escribano M., Vanhanen H., Marjomäki V. Antiviral agents from fungi: diversity, mechanisms and potential applications // *Frontiers in Microbiology*. 2018. Vol. 9. P. 2325. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02325>

REFERENCES

1. Tisch D, Schmoll M. Light regulation of metabolic pathways in fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010;85:1259–1277. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2320-1>

2. Purschwitz J, Müller S, Kastner C, Fischer R. Seeing the rainbow: light sensing in fungi. *Current*

Opinion in Microbiology. 2006;9(6):566–571. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.10.011>

3. Herrera-Estrella A, Horwitz BA. Looking through the eyes of fungi: molecular genetics of photoreception. *Molecular Microbiology*. 2007;64(1):5–15. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05632.x>

4. Poyedinok NL, Yefremenkova OV, Mikhaylova OB, Negriyko AM. Biosynthetic activity of some higher medicinal mushrooms after exposure to light. *Uspekhi meditsinskoi mikologii = Advances in Medical Mycology*. 2007;9:176-178. (In Russian)
5. Manachere G. Research on the fruiting rhythm of a basidiomycete mushroom *Coprinus congregatus* Bull. Ex Fr. *Journal of interdisciplinary cycle research*. 1971;2(2):199–209.
6. Namba K., Inatomi S., Mori K., Shimosaka M., Okazaki M. Effects of LED lights on fruiting-body production in *Hypsizygus marmoreus*. *Mushroom Science and Biotechnology*. 2002;10:141–146. https://doi.org/10.24465/apmsb.10.3_141
7. Hu S-H, Wu C-Y, Chen Y-K, Wang J-C, Chang S-J. Effect of light and atmosphere on the cultivation of the golden oyster culinary-medicinal mushroom, *Pleurotus citrinopileatus* (higher Basidiomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2013;15:101–111. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v15.i1.110>
8. Nakano Y, Fujii H, Kojima M. Identification of blue-light photoreponse genes in Oyster Mushroom mycelia. *Biochemistry & Molecular Biology Communications*. 2010;74(10):2160–2165. <https://doi.org/10.1271/bbb.100565>
9. Hao J, Chen X, Lan J. Effect of light quality on growth and polysaccharides content of *Ganoderma lucidum*. *China Journal of Chinese Materia Medica*. 2010;35(17):2242–2245.
10. Mei X-L, Zhao Z, Chen X-D, Lan J. Light quality regulation of growth and endogenous IAA metabolism of *Ganoderma lucidum* mycelium. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 2013;38(12):1887–1892. <https://doi.org/10.4268/cjcm.20131209>
11. Zhang LQ. Effect of UV on the growth of *Inonotus obliquus* and the content of polysaccharide. *Renshen Yanjiu*. 2008;9:16–19.
12. Poyedinok NL, Mykhailova OB, Shcherba VV, Buchalo AS, Negriyko AM. Light regulation of growth and biosynthetic activity of Ling Zhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllphoromycetidae), in pure culture. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2008;10(4):369–378. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v10.i4.100>
13. Zheng W, Zhang M, Zhao Y, Miao K, Jiang H. NMR-based metabonomic analysis on effect of light on production of antioxidant phenolic compounds in submerged cultures of *Inonotus obliquus*. *Biore-source Technology*. 2009;100(19):4481–4487. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.04.027>
14. Gornostai TG, Poliakova MS, Borovskii GB, Olennikov DN. Lipids of *Inonotus rheades* (Hymenochaetaceae): Influence of substrate and light mode on fatty acid profile of mycelium. *Khimija rastitel'nogo syr'ya = Chemistry of plant raw material*. 2018;1:105–111. (In Russian) <https://doi.org/10.14258/jcprm.2018012713>
15. Gornostai TG, Borovskii GG, Kashchenko NI, Olennikov DN. Phenolic Compounds of *Inonotus rheades* (Agaricomycetes) Mycelium: RP-UPLC-DAD-ESI/MS Profile and Effect of Light Wavelength on the Styrylpyrone Content. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2018;20(7):637–645 <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.2018026595>
16. Babitskaya VG, Shcherba VV, Puchkova TA, Smirnov DA, Bis'ko NA, Poyedinok NL. Effect of conditions of submerged culturing of a medicinal fungus *Ganoderma lucidum* (reishi) on polysaccharide production. *Biotechnology in Russia*. 2007;6:42–52.
17. Preto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*. 1999;269(2):337–341. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4019>
18. Ding H-Y, Chou T-H, Liang C-H. Antioxidant and antimelanogenic properties of rosmarinic acid methyl ester from *Origanum vulgare*. *Food Chemistry*. 2010;123(2):254–262. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.04.025>
19. Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, et al. *In vitro* cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute*. 1973;51:1417–1423. <https://doi.org/10.1093/jnci/51.5.1417>
20. Khasnatinov MA, Danchinova GA, Zlobin VI, Lyapunov AV, Arbatskaya EV, Chaporgina EA, et al. Tick-borne encephalitis virus in Mongolia. *Sibirskii meditsinskii zhurnal (Irkutsk) = Siberian Medical Journal (Irkutsk)*. 2012;111(4):9–12. (In Russian)
21. Gould EA, Clegg JCS. Growth, titration and purification of togaviruses. In: Mahy BWJ. (ed.), *Virology: A Practical Approach*. Oxford: IRL Press Ltd.; 1985. p. 43–78.
22. Kim G-Y, Lee J-Y, Lee J-O, Ryu C-H, Choi BT, Jeong Y-K, et al. Partial Characterization and Immunostimulatory Effect of a Novel Polysaccharide-Protein Complex Extracted from *Phellinus linteus*. *Bio-science, Biotechnology, and Biochemistry*. 2006; 70(5): 1218–1226. <https://doi.org/10.1271/bbb.70.1218>
23. Fan L, Ding S, Ai L, Deng K. Antitumor and immunomodulatory activity of water-soluble polysaccharide from *Inonotus obliquus*. *Carbohydrate Polymers*. 2012;90(2):870–874. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.06.013>
24. Gornostai TG, Khasnatinov MA, Solovarov IS, Danchinova GA, Borovskii GB. Antiviral properties of water extracts of mycelium *Inonotus rheades*, against the virus of tick-borne encephalitis virus *in vitro*. In: Bychkov IV, Kazakov AL (eds.). *Aktualnye problemy nauki Pribaikalya*. Issue 3. Irkutsk: Izdatel'stvo Irkutskogo gosudarstvennogo universiteta; 2020. p. 21–25. (In Russian)
25. Corrochano LM. Light in the Fungal World: From Photoreception to Gene Transcription and Beyond. *Annual Review of Genetics*. 2019;53:149–170. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120417-031415>

26. Vance CP, Tregunna EB, Nambudiri AM, Towers GH. Styrylpyrone biosynthesis in *Polyporus hispidus*: I. Action spectrum and photoregulation of pigment and enzyme formation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1974;343(1):138–147. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(74\)90245-1](https://doi.org/10.1016/0304-4165(74)90245-1)
27. Oh T-J, Hyun S-H, Lee S-G, Chun Y-J, Sung G-H, Choi H-K. NMR and GC-MS based metabolic profiling and free-radical scavenging activities of *Cordyceps pruinosa* mycelia cultivated under different media and light conditions. *PLoS One*. 2014;9(6):e90823. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090823>
28. Buffoni Hall RS, Bornman JF, Bjorn LO. UV-induced changes in pigment content and light penetration in the fruticose lichen *Cladonia arbuscula* ssp. *Mitis*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2002;66(1):13–20. [https://doi.org/10.1016/s1011-1344\(01\)00270-6](https://doi.org/10.1016/s1011-1344(01)00270-6)
29. Avalos J, Schrott EL. Photoinduction of carotenoid biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. *FEMS Microbiology Letters*. 1990;66(1-3):295–298. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1990.tb04014.x>
30. Kim H, Son H, Lee YW. Effects of light on secondary metabolism and fungal development of *Fusarium graminearum*. *Journal of Applied Microbiology*. 2013;116(2):380–389. <https://doi.org/10.1111/jam.12381>
31. Zalokar M. Biosynthesis of carotenoids in *Neurospora* action spectrum of photoactivation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1955;56(2):318–25. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(55\)90252-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(55)90252-6)
32. Poyedinok NL. Light regulation of growth and melanin formation in *Inonotus obliquus* (Pers.) Pilat. *Biotechnologia Acta*. 2013;6(2):115–20. <https://doi.org/10.15407/biotech6.02.115>
33. Kojima M, Kimura N, Miura R. Regulation of primary metabolic pathways in Oyster Mushroom mycelia induced by blue light stimulation: accumulation of shikimic acid. *Scientific Reports*. 2015;5:8630. <https://doi.org/10.1038/srep08630>
34. Linnakoski R, Reshamwala D, Veteli P, Cortina-Escribano M, Vanhanen H, Marjomäki V. Antiviral agents from fungi: diversity, mechanisms and potential applications. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9:2325. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02325>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Боровский Геннадий Борисович,
д.б.н., профессор,
главный научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
✉ e-mail: borovskii@sifibr.irk.ru

Горностай Татьяна Геннадьевна,
к.фарм.н., научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
e-mail: t.g.gornostay@yandex.ru

Полякова Марина Станиславовна,
ведущий инженер,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
e-mail: poljakova.m@gmail.com

Боровская Марина Казимировна,
ведущий инженер,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
e-mail: marbor1964@yandex.ru

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Gennadii B. Borovskii,
Dr. Sci. (Biology), Professor,
Chief Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
✉ e-mail: borovskii@sifibr.irk.ru

Tatyana G. Gornostai,
Cand. Sc. (Pharmacy), Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
e-mail: t.g.gornostay@yandex.ru

Marina S. Polyakova,
Leading Engineer,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
e-mail: poljakova.m@gmail.com

Marina K. Borovskaja,
Leading Engineer,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
e-mail: marbor1964@yandex.ru

Хаснатинов Максим Анатольевич,
д.б.н., ведущий научный сотрудник,
Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение
«Научный центр проблем здоровья семьи
и репродукции человека»,
664033, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16,
Российская Федерация,
e-mail: khasnatinov@yandex.ru

Соловаров Иннокентий Сергеевич,
младший научный сотрудник,
Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение
«Научный центр проблем здоровья семьи
и репродукции человека»,
664033, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16,
Российская Федерация,
e-mail: keschass@mail.ru

Данчинова Галина Анатольевна,
д.б.н., заведующая лабораторией
трансмиссивных инфекций,
Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение
«Научный центр проблем здоровья семьи
и репродукции человека»,
664033, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16,
Российская Федерация,
e-mail: dan-chin@yandex.ru

Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

*Все авторы прочитали и одобрили оконча-
тельный вариант рукописи.*

*Поступила в редакцию 12.03.2020.
Одобрена после рецензирования 26.05.2020.
Принята к публикации 28.02.2021.*

Maxim A. Khasnatinov,
Dr. Sci. (Biology), Leading Research,
Federal State Public Scientific Institution
“Scientific Centre for Family Health
and Human Reproduction Problems”,
16, Timiryazeva St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
e-mail: khasnatinov@yandex.ru

Innokentiy S. Solovarov,
Junior Research,
Federal State Public Scientific Institution
“Scientific Centre for Family Health
and Human Reproduction Problems”,
16, Timiryazeva St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
e-mail: keschass@mail.ru

Galina A. Danchinova,
Dr. Sci. (Biology),
Head of the Lab. of Vector-borne Infections,
Federal State Public Scientific Institution
“Scientific Centre for Family Health
and Human Reproduction Problems”,
16, Timiryazeva St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
e-mail: dan-chin@yandex.ru

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests re-
garding the publication of this article.

*The final manuscript has been read and approved
by all the co-authors.*

*The article was submitted 12.03.2020.
Approved after reviewing 26.05.2020.
Accepted for publication 28.02.2021.*

Оригинальная статья / Original article

УДК 577.1: 543.42: 547.1

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-90-98>



Образование первичных метаболитов и хлорофилла в растениях *Cucumis sativus* L. при воздействии конъюгата *l*-рамнозы с *m*-аминобензойной кислотой

© И.С. Черепанов, А.А. Журавлева

Удмуртский государственный университет, г. Ижевск, Российская Федерация

Резюме: Изучен характер влияния конъюгата *L*-рамнозы с *m*-аминобензойной кислотой на динамику образования первичных метаболитов и хлорофилла при проращивании семян огурца (*Cucumis sativus* L.). Синтетический аминоконъюгат (рамнозилламин) оказывает ингибирующее влияние на рост тест-растения, ослабевающее с уменьшением концентрации его раствора от 0,05 до 0,0005%. Анализ изменения профилей ИК-Фурье спектров образцов корней и hypocotyle пророщенных семян показывает наиболее существенные изменения в углеводном пуле и протеиновой составляющей биоматериала. С уменьшением содержания аминоконъюгата до 0,0005% происходит увеличение интенсивности полос 1060, 1100 и 1158 см⁻¹, указывающее на накопление целлюлозных полисахаридов. Аналогичным образом меняется интенсивность амидных полос, при этом значения волновых чисел вторых производных спектральных сигналов в области 1600–1700 см⁻¹ свидетельствуют о конформационных изменениях белков в процессе прорастания. Электронные спектры экстрактов и колебательные спектры образцов семядолей демонстрируют более интенсивное образование хлорофилла в системах с аминоконъюгатом, увеличивающееся с уменьшением содержания в среде последнего, при этом дополнительно свидетельствуют о различном состоянии фотосинтетических пигментов в контрольном и исследуемых образцах. По нашему предположению, влияние аминоконъюгата на параметры роста, образование первичных метаболитов и фотосинтетических пигментов обусловлено его присутствием в среде совместно с *m*-аминобензойной кислотой и *L*-рамнозой, образующимися в качестве продуктов гидролиза, протекание которого подтверждается поляриметрическими измерениями. Результаты исследований подтверждают перспективность поиска и испытаний соединений, содержащих в структуре активные компоненты разного спектра действия.

Ключевые слова: *Cucumis sativus* L., метаболиты, *L*-рамноза, *m*-аминобензойная кислота, аминоконъюгат, регуляторы роста, спектроскопия

Для цитирования: Черепанов И.С., Журавлева А.А. Образование первичных метаболитов и хлорофилла в растениях *Cucumis sativus* L. при воздействии конъюгата *l*-рамнозы с *m*-аминобензойной кислотой. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т. 11. N 1. С. 90–98. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-90-98>

Formation of primary metabolites and chlorophyll in the plants of *Cucumis sativus* L. when exposed to *l*-ramnose conjugated with *m*-aminobenzoic acid

Igor S. Cherepanov, Alina A. Zhuravleva

Udmurt State University, Izhevsk, Russian Federation

Abstract: This article studies the effect of *L*-rhamnose conjugated with *m*-aminobenzoic acid on the formation of primary metabolites and chlorophyll during germination of cucumber (*Cucumis sativus* L.) seeds. This synthetic aminoconjugate (rhamnosylamine) has an inhibitory effect on the growth of the plant under study, which weakens with a decrease in the solution concentration from 0.05 to 0.0005%. An analysis of changes in the FTIR spectra of the root and hypocotyl samples of germinated seeds showed significant changes in the carbohydrate pool and protein structure of the biomaterial. As the aminoconjugate content decreases to 0.0005%, the intensity of the bands at 1060, 1100 and 1158 cm⁻¹ increases, indicating the ac-

cumulation of cellulose polysaccharides. The intensity of the amide bands changes in a similar way, while the values of the wave numbers of the second derivatives of the spectral signals in the 1600-1700 cm^{-1} range indicate conformational changes in proteins during germination. The electronic spectra of extracts and the vibrational spectra of cotyledon samples demonstrated a more intense formation of chlorophyll in the systems comprising the aminoconjugate; the chlorophyll content increases with a decrease in the content of the aminoconjugate in the medium. These spectra additionally indicate a different state of the photosynthetic pigments in the control and experimental samples. According to our assumption, the effect of the aminoconjugate on the growth parameters, the formation of primary metabolites and photosynthetic pigments can be explained by its presence in the medium simultaneously with *m*-aminobenzoic acid and *L*-rhamnose. The latter substances are formed as the products of hydrolysis, the course of which was confirmed by polarimetric measurements. The obtained results confirm the prospects of searching and testing compounds containing structural components of different action.

Keywords: *Cucumis sativus* L., metabolites, *L*-rhamnose, *m*-aminobenzoic acid, aminoconjugate, growth regulators, spectroscopy

For citation: Cherepanov IS, Zhuravleva AA. Formation of primary metabolites and chlorophyll in the plants of *Cucumis sativus* L. when exposed to *L*-rhamnose conjugated with *m*-aminobenzoic acid. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(1):90–98. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-90-98>

ВВЕДЕНИЕ

Важным элементом агротехнологий в настоящее время является применение регуляторов роста, способных в малых дозах влиять на процессы метаболизма в растениях, что приводит к существенным изменениям в их росте и развитии. Поскольку применение регуляторов роста позиционируется как экологически чистый и экономически выгодный способ влияния на растительные организмы, к ним предъявляется ряд требований, обеспечивающих их максимально эффективное использование. Большое внимание исследователей к синтетическим регуляторам роста объясняется рядом недостатков их природных аналогов, таких как быстрое разложение на свету, низкая водорастворимость, используемые при обработке высокие концентрации [1]. В связи с этим остается актуальной проблема поиска новых синтетических аналогов регуляторов, вектор которого направлен в первую очередь на исследование в качестве ростовых препаратов, достоверно обладающих биологической активностью веществ [2].

Ранее была показана возможность модифицирования ароматических аминов с целью увеличения их растворимости и снижения токсичности для их испытаний в качестве рострегулирующих препаратов, в частности, *m*,*p*-замещенных анилинов [3]. Компьютерное моделирование и экспериментальные данные показывают перспективность использования *m*-замещенных ариламинов в качестве биологически активных в отношении роста растений веществ. Для оптимизации ключевых свойств ариламина, в частности, повышения водорастворимости и снижения токсичности, в качестве регуляторов роста перспективны конъюгаты ароматических аминов с углеводами, содержащие *N*-гликозидные связи, лабильные в условиях испытаний [3].

Одной из основных проблем при изучении действия рострегулирующих препаратов является

исследование механизмов их влияния в различные фазы развития растений, что в значительной степени определяется химической структурой рострегуляторов и ее возможным изменением в процессе активной фазы действия [1, 2]. Вариации состава и структуры клеточных стенок растений традиционно изучаются различными физическими методами, такими как ЯМР-спектроскопия и газовая хроматография. Данные методы являются дорогостоящими, зачастую требуют значительного количества образца биоматериала и применения специфических растворителей. Методы молекулярной спектроскопии, в частности электронной и ИК-Фурье спектроскопии, более доступны и оперативны; последний является также одним из наиболее информативных в отношении исследования структурно-группового состава, установления динамики изменения содержания метаболитов в образцах исследуемого биоматериала в ходе морфологических процессов [4–8]. Конформационная чувствительность полос поглощения биополимеров позволяет исследовать их структурные особенности, а также происходящие в динамике изменения их содержания. Так, полоса колебаний $\nu_{\text{C=O}}$ амидных групп белков (Амид I) расщепляется в зависимости от величины межмолекулярных взаимодействий, что позволяет получать информацию о геометрическом расположении групп в макромолекулах.

Анализ литературных данных по обозначенной проблеме показывает наличие как исследований, направленных на изучение динамики изменения содержания биологически активных веществ в различных частях растений в ходе вегетационных экспериментов [4–6], так и работ по анализу деталей механизма действия регуляторов роста варьируемой структуры на различных стадиях развития растения [6–11]. По нашему мнению, целесообразно объединить назван-

ные направления исследований. В связи с этим целью настоящей работы являлось изучение характера и механизма влияния конъюгата *L*-рамнозы с *m*-аминобензойной кислотой на динамику образования первичных метаболитов и хлорофилла при проращивании семян огурца (*Cucumis sativus* L.).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для синтеза целевого продукта смесь эквивалентных (0,002 моль) количеств *L*-рамнозы (Fluka) и *m*-аминобензойной кислоты (ч.д.а.) растворяли в 15 мл этанола (96% EtOH, Merck). Реакционную систему термостатировали в колбах с обратным холодильником в бане с водяным нагревом 70–75 °С в течение 30 мин до полного растворения реагентов. По окончании измерений к раствору добавляли равный объем диэтилового эфира и оставляли реакционную смесь при температуре 18 °С для кристаллизации, после чего промывали абсолютным эфиром, высушивали и идентифицировали методом ИК-Фурье спектроскопии и элементного анализа. Спектры регистрировали в режиме поглощения в таблетках KBr (1:200) на ИК-Фурье спектрометре ФСМ 2201 (ООО «Инфраспек», Россия) в интервале волновых чисел 4000–500 см⁻¹ со спектральным разрешением по волновому числу 2 см⁻¹ при 40 сканах с предварительной регистрацией опорных спектров. Спектры вторых производных получены в результате численного дифференцирования с использованием сглаживания полиномом 4-го порядка в окнах до 15 точек, анализ и отнесение проводились по экстремумам ниже нулевой линии. Спектры многократного нарушенного полного внутреннего отражения (МНПВО) растворов снимали на приставке МНПВО-36 в интервале волновых чисел 4000–650 см⁻¹. Обработку спектров проводили в среде программы FSpec 4.2.0.9. Температуру плавления аминоконъюгата определяли в открытых капиллярах в установках Кьельдаля, элементный анализ проводили на анализаторе Vario MICRO Cube (Elemental Analyzer GmbH, Германия), поляриметрические измерения проводили на поляриметре СМ-3 (АООТ «ЗОМЗ», Россия).

Синтезированный аминоконъюгат – *N*-*m*-карбоксифенилрамнозилламин, представляет собой растворимый в воде порошок серого цвета. Выход – 85%, температура плавления – 112–113 °С. Элементный анализ: найдено, %: С – 55,25; Н – 6,25; N – 4,91; вычислено, %: C₁₃H₁₇NO₆ С – 55,12; Н – 6,00; N – 4,91. ИК-Фурье спектр: 1700 см⁻¹ (ν_{C=O}); 1608, 1521, 746 см⁻¹ (ν_{C=C}, γ_{C-H}); 1495, 1005 см⁻¹ (N-гликозид).

Биотестирование полученных препаратов проводили с использованием в качестве тест-растений семян огурца сорта Нежинский в трех параллелях. В чашки Петри, выложенные фильтровальной бумагой, полностью смоченной рабочими растворами (0,05; 0,005 и 0,0005%) выкладывали по 10 семян и помещали в термостат.

После четырех суток инкубации при 25 °С оценивали количество нормально проросших семян и изменение длины проростков в сравнении с контрольной пробой (дистиллированная вода). Для изучения характера действия синтезированного продукта на ростовые процессы пробы (4 мг) корней и гипокотилей биотестируемых образцов высушивали, измельчали до однородной массы, таблетировали с KBr (1:300) и исследовали ИК-Фурье спектроскопически в трех параллелях. Спектры характеризовались достаточным разрешением и ровной базовой линией, что свидетельствовало о химической стабильности исследуемых образцов.

Влияние синтезированного продукта на синтез хлорофилла изучали на изолированных семядолях, для чего последние после окончания проращивания отделяли от оболочек и высушивали в течение 4 ч при 60 °С, затем пробы измельчали, таблетировали с KBr (1:200) и исследовали ИК-Фурье спектроскопически. Для количественной оценки изменения динамики содержания хлорофилла в ходе экспериментов проводили экстракцию из 10 мг образцов семядолей 5 мл 96% этанола, после чего отфильтровывали, доводили объем до 10 мл и снимали спектры экстрактов в кварцевых кюветах (1 см) в интервале длин волн 300–800 нм на спектрофотометре СФ-2000 (ОКБ «Спектр», Россия). Расчет содержания фотосинтетических пигментов проводили по формулам, приведенным в работе [6].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Динамика развития ростовых процессов при проращивании семян тест-растений в растворах рамнозиламина представлена в табл. 1. Анализ данных показывает ингибирование прорастания семян в растворах исследуемого препарата, снижающееся с уменьшением его концентрации.

Таблица 1. Влияние концентрации растворов синтезированного продукта на ростовые характеристики семян огурца сорта Нежинский
Table 1. Influence of synthesized product solutions concentration on germination characteristics of Nezhinsky variety cucumber seeds

Концентрация, %	Длина проростка, см	Прирост, %	Всхожесть, %
Контроль	7,7±0,2	100	96±2
0,05	2,4±0,3	31±2	54±3
0,005	4,6±0,2	60±3	86±2
0,0005	5,1±0,2	66±2	86±2

Анализ профиля ИК-Фурье спектра контрольного образца показывает наличие характерных для исследуемого биоматериала полос поглощения (рис. 1, спектр 1) [5–13].

Отмечается сравнительно интенсивная карбонильная полоса (1732 см⁻¹; ν_{C=O}), относимая к колебаниям сложноэфирных фрагментов, а так-

же интенсивная полоса при 1406 см^{-1} (δ_{OH} , ν_{COO^-} ; полисахариды, пектины). Отмеченное положение максимума $\nu_{\text{C=O}}$, смещенное от традиционно наблюдаемых для сложноэфирных групп (1740 см^{-1}) [11], связывают с образованием водородных связей карбонильной группы с гидроксогруппами липидов и полисахаридов, а также с низкой степенью этерификации пектинов [13]. Пептидная полоса Амид I ($\nu_{\text{C=O}}$, $\nu_{\text{C-N}}$, $\delta_{\text{N-H}}$) наблюдается в виде дублета 1632 (β -слои), 1657 (α -спирали) см^{-1} , полосы Амид II (1544 см^{-1} ; $\delta_{\text{N-H}}$, $\nu_{\text{C=N}}$) и Амид III + P=O , C-O (1240 см^{-1} ; $\nu_{\text{C-N}}$, $\delta_{\text{N-H}}$, $\nu_{\text{PO}_2^-}$, $\nu_{\text{C-O}}$) выражены слабее. Участок в области $1310\text{--}1370\text{ см}^{-1}$ содержит полосы колебаний CH_2 -фрагментов целлюлозы, комбинация C-O-C , C-O , C-OH полос углеводных компонентов проявляется широким сигналом с пиками, характерными для различных сахаров [13].

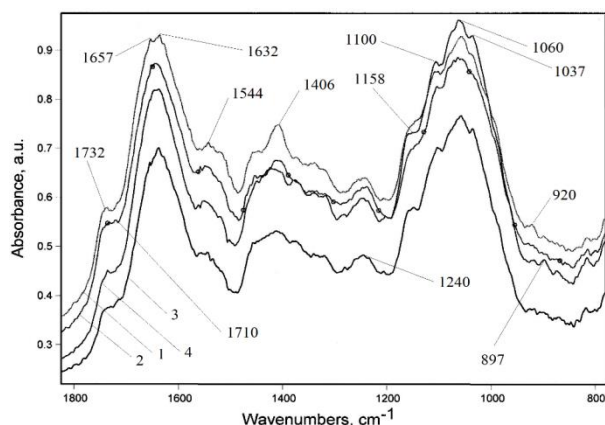


Рис. 1. ИК-Фурье спектры образцов корней тест-растений, пророщенных в растворах: 1 – контроль; 2 – 0,05%; 3 – 0,005%; 4 – 0,0005%

Fig. 1. IR-Fourier transform spectra of test-plant roots germinated in solutions: 1 – control; 2 – 0.05%; 3 – 0.005%; 4 – 0.0005%

Спектры пророщенных в среде регулятора образцов корней показывают некоторые изменения в положении и интенсивности полос поглощения. Размытость и варьируемая интенсивность $\nu_{\text{C=O}}$ -полосы связаны с наличием карбонильных групп в различном структурном окружении (эфиры фенолов, липиды, пектины) [10, 11]. Появление слабых сигналов при 1710 см^{-1} , относимых к колебаниям C=O жирных кислот и альдегидов, указывает на частичную деградацию клеточных мембран [7]. Сигнал 1406 см^{-1} также снижает интенсивность, более выраженно проявляясь с уменьшением концентрации раствора аминоконъюгата. Полоса Амид I для образца, пророщенного в 0,05% растворе, сохраняет слабовыраженный максимум при 1635 см^{-1} , тогда как для двух других центрирована при 1640 см^{-1} , что указывает на конформационные изменения [12]. Полоса $1220\text{--}1240\text{ см}^{-1}$ и плечо при 1082 см^{-1} ($\nu_{\text{PO}_2^-}$) практически не изменяются, при этом полосы 1060 , 1100 и 1158 см^{-1} , относимые к

$\nu_{\text{CO,CC,COC}}$ -колебаниям целлюлозных фрагментов, интенсивны для контрольного образца и образца, пророщенного в 0,0005% растворе [9, 14]. Полосы 1037 см^{-1} (ν_{CONH}) и 897 , 816 см^{-1} ($\delta_{\text{HCC+HCO}}$) в спектре 4 также являются характерными для фрагментов целлюлозы и некоторых других полисахаридов [11]. Подобные изменения указывают на возрастание содержания полисахаридной составляющей с уменьшением концентрации рамнозилamina, что характеризует последний как ингибитор синтеза целлюлозы [14].

Спектры образцов hypocotyle имеют практически те же полосы поглощения, при этом характеризуются более низкой интенсивностью углеводной области $1200\text{--}900\text{ см}^{-1}$, тонкая структура полос которой проявляется слабее (рис. 2).

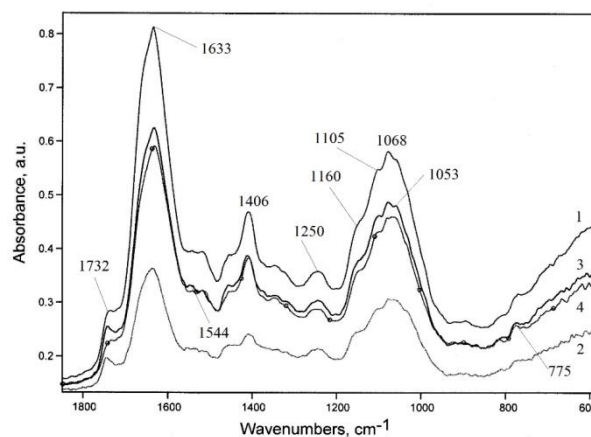


Рис. 2. ИК-Фурье спектры образцов hypocotyle тест-растений, пророщенных в растворах: 1 – контроль; 2 – 0,05%; 3 – 0,005%; 4 – 0,0005 %

Fig. 2. IR-Fourier transform spectra of test-plant hypocotyls germinated in solutions: 1 – control; 2 – 0.05%; 3 – 0.005%; 4 – 0.0005%

Полоса 1515 см^{-1} ($\nu_{\text{C=C}}$) проявляется наиболее интенсивно в спектре контрольного образца, при этом, вероятно, сливается со слабой полосой Амид II (1544 см^{-1}). Полоса Амид I показывает плечо на высокочастотном крыле, что так же, как и для спектров образцов корней, может свидетельствовать о трансформации вторичной структуры в процессе испытаний.

Затруднительность анализа составного контура амидной полосы обусловлена превышением ширины отдельных полос над их максимумами, поэтому более детальная информация может быть получена при анализе вторых производных спектральных полос в области $1600\text{--}1700\text{ см}^{-1}$ (рис. 3) [12]. В спектре контрольного образца наиболее интенсивны полосы 1618 и 1635 см^{-1} , что подтверждает вторичную структуру в форме β -слоев, тогда как для пророщенного в 0.0005% растворе образца уже достаточно отчетливо проявляется сигнал при 1654 см^{-1} , свидетельствующий о наличии α -спиралей в структуре белка [10, 12]. Соотношение интенсивностей «дальнего» (1654 см^{-1}) и «ближнего» (1635 см^{-1}) сиг-

налов полосы Амид I характеризует степень структурирования белковой структуры водородными связями [13]: рост данного соотношения при переходе от контрольного образца к исследуемым указывает на снижение интенсивности Н-связей протеиновых структур.

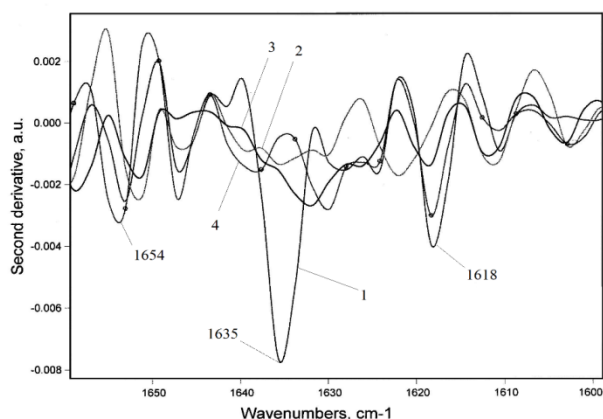


Рис. 3. Вторые производные полос ИК-Фурье спектров образцов гипокотилей тест-растений, пророщенных в растворах: 1 – контроль; 2 – 0,05%; 3 – 0,005%; 4 – 0,0005%

Fig. 3. Second derivative of IR-Fourier transform spectra bands of test-plant hypocotyls germinated in solutions: 1 – control; 2 – 0.05%; 3 – 0.005%; 4 – 0.0005%

Варьирование интенсивности полос 1406 и 1732 cm^{-1} для обоих типов образцов можно связать с изменением скорости накопления пектинов [11] и синтеза ростовых гормонов в присутствии рамнозиламина [8]. Следует также отметить, что как в спектрах корней, так и гипокотилей полосы в интервале 2850–2970 cm^{-1} ($\nu_{\text{C-H}}$) не изменяют своей интенсивности и положения; ширина полосы с максимумом 2925 cm^{-1} также практически не меняется, что указывает на отсутствие структурных изменений, в том числе конформационной упорядоченности мембранных липидов [15].

Колебательные спектры образцов семядолей тест-растений представлены на рис. 4. Характерные для хлорофиллов полосы поглощения наблюдаются для всех образцов с несколько изменяющейся интенсивностью.

Характеристические сигналы 1745, 1651 cm^{-1} относятся к колебаниям С=О-групп, 1543 cm^{-1} – к $\nu_{\text{C=C, C=N}}$ пиррольного цикла [16]. Полоса 1745 cm^{-1} указывает на наличие неассоциированных Н-связями сложноэфирных карбонильных групп. Наложение полос протеинов и липидов в тех же интервалах волновых чисел не позволяет оценивать поглощение фотосинтетических пигментов в чистом виде [17]. Тем не менее дополнительная структурная информация может быть получена анализом тонкой структуры ряда полос. Так, для образцов растений, пророщенных в растворах рамнозиламина, ИК-полоса, центрированная в спектре

контроля при 1651 cm^{-1} , проявляется в виде дублета 1635 и 1670 cm^{-1} , что указывает на сложные межмолекулярные взаимодействия молекул хлорофилла, в том числе с протеинами растений, сопровождающиеся сопутствующими конформационными изменениями [16].

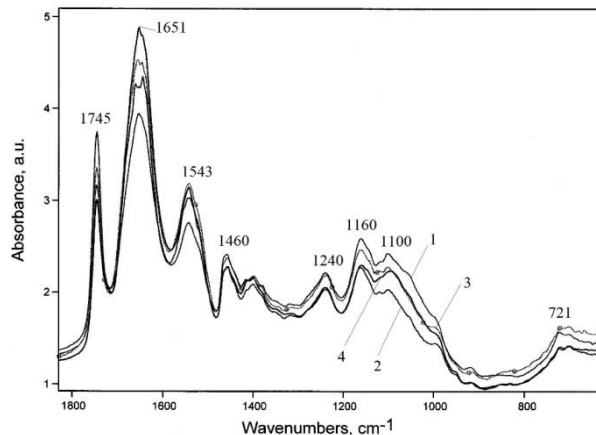


Рис. 4. ИК-Фурье спектры образцов семядолей тест-растений, пророщенных в растворах: 1 – контроль; 2 – 0,05%; 3 – 0,005%; 4 – 0,0005%

Fig. 4. IR-Fourier transform spectra of test-plant cotyledons germinated in solutions: 1 – control; 2 – 0.05%; 3 – 0.005%; 4 – 0.0005%

Полосы поглощения в электронных спектрах экстрактов отличаются для контрольных и пророщенных под влиянием аминоконъюгата растений. Данные электронной и колебательной спектроскопии указывают на различное состояние фотосинтетических пигментов в исследуемых системах, которое может контролироваться влиянием аминоконъюгата [15, 16]. Последнее обстоятельство, возможно, влияет на динамику изменения значений оптической плотности, характеризующую накопление хлорофилла (табл. 2).

Таблица 2. Максимумы поглощения электронных спектров и содержание хлорофилла (a + b) в спиртовых экстрактах семядолей тест-растений, пророщенных в растворах с различной концентрацией аминоконъюгата

Table 2. Absorption maxima UV-Vis spectra and chlorophyll (a+b) content in ethanolic cotyledons extracts of test-plants, germinated in solutions with various aminoconjugate concentration

Концентрация, %	Хлорофилл (a + b), мг/г	λ_{max} , нм
Контроль	2,47±0,03	380, 590, 670
0,05	2,55±0,08	410, 590, 667
0,005	3,67±0,10	430, 610, 660
0,0005	4,46±0,10	430, 610, 660

Механизмы действия регуляторов роста на морфологические процессы в значительной степени обусловлены их химической структурой, при этом детали влияния структурных парамет-

ров на рост (ингибирование) остаются малоизученными. Проявление рострегулирующего действия реализуется в ходе двух последовательных процессов – транспорт регулятора через биомембраны и его взаимодействие с макромолекулами. Авторами работы [18] было показано влияние структуры замещенных бензойных кислот и их солей на ростовые процессы *Cucumis sativus* L. При этом установлено, что ингибирование роста растений огурца связано с гидрофобностью молекул, обуславливающей способность к диффузии через мембраны, которая в свою очередь зависит от степени ионизации кислот. Неионизированные формы кислот более токсичны в отношении роста в сравнении с ионизированными, при этом есть указания на вклад в токсичность как первых, так и вторых форм. Известно также, что *m*-аминобензойная кислота существует в свободном состоянии в виде биполярной цвиттер-формы, тогда как рамнозиламин, по данным спектроскопии, содержит неионизированный остаток кислоты [3].

Вероятно, что на ростовые процессы оказывает влияние наличие лабильных химических связей, обуславливающих реакции гидролитического расщепления [1]: рострегулирующая активность может быть связана с гидролизом аминоконъюгата с образованием свободного углевода и *m*-аминобензойной кислоты. В пользу протекания гидролиза свидетельствует увеличение удельного вращения 1%-го раствора рамнозиламина от исходного значения $+34,7^\circ$ до значения $+42,5^\circ$ уже через 24 ч, которое далее стабилизировалось, поскольку известно, что негидролизующиеся арилгликозиламины не показывают изменения удельного вращения. Данные МНПВО-спектроскопии подтверждают протекание процессов с участием аминоконъюгата в растворе во времени. В спектре, снятом непосредственно после приготовления раствора, отмечается четкая полоса 1692 см^{-1} , относимая к колебаниям карбонила неионизированной карбоксильной группы, тогда как в спектре, зарегистрированном через сутки после приготовления раствора (пробы хранились в закрытых бюксах при 20°C), данная полоса отсутствует (рис. 5).

Таким образом, увеличение ростовой активности, образование полисахаридов, протеинов и фотосинтетических пигментов с уменьшением концентрации раствора может быть обусловлено снижением содержания оказывающей ингибирующее действие *m*-аминобензойной кислоты [19]. С другой стороны, превышение содержания хлорофилла в сравнении с контролем может быть связано с влиянием аминоконъюгата (или свободного углевода): известна положительная динамика образования пигментов под действием *L*-рамнозы и ее производных¹. Данный вопрос

требует дальнейшего изучения, в то же время можно предположить перспективность поиска и испытаний соединений, содержащих в структуре активные компоненты разного спектра действия. Лабильные гликозидные связи между компонентами, способные к разрыву в условиях проращивания, обеспечивают возможность их контролируемого образования, что может быть положено в основу разработки рострегулирующих препаратов, содержащих структурные фрагменты различной биологической активности.

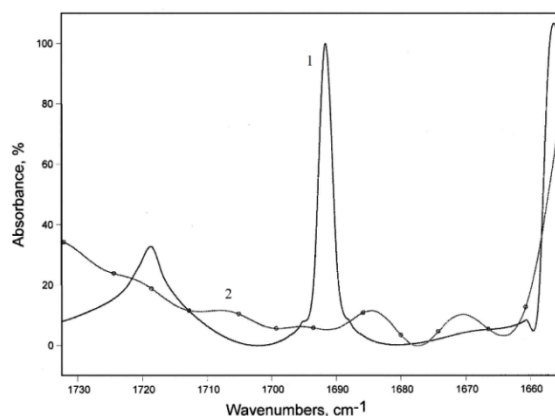


Рис. 5. ИК-Фурье МНПВО-спектры 1%-го раствора аминоконъюгата, снятые через: 1 – 0 ч; 2 – 24 ч

Fig. 5. IR-Fourier transform ATR-spectra of 1% aminoconjugate solution recorded after: 1 – 0 h; 2 – 24 h

ВЫВОДЫ

Методами электронной и ИК-Фурье спектроскопии изучено влияние конъюгата *L*-рамнозы с *m*-аминобензойной кислотой (рамнозиламина) на динамику морфологических процессов тест-растений *Cucumis sativus* L. На фоне общего ростингибирующего действия аминоконъюгата показано увеличение содержания полисахаридной и белковой структурных составляющих образцов корней и гипокотилей при снижении концентрации раствора рамнозиламина. Содержание липидных фрагментов и их структурная организация во всех системах остается приблизительно на одном уровне, тогда как анализ полос Амид I исходных спектров и их вторых производных подтверждает конформационные изменения белков в ходе ростовых процессов. Динамика изменения содержания фотосинтетических пигментов для 0,05, 0,005 и 0,0005%-х растворов аминоконъюгата коррелирует с ростовыми параметрами, при этом концентрация хлорофилла во всех случаях превышает данный показатель для контрольных образцов. Описанное действие аминоконъюгата, по нашему предположению, обусловлено его совместным с продуктами гидролиза (*m*-аминобензойной кислоты, *L*-рамнозы) влиянием.

¹Posner H. Inhibitory effect of carbohydrate on flowering in *Lemna perpusilla*. II. Reversal by glycine and L-aspartate correlation with reduced levels of β -carotene and chlorophyll // Plant Physiology. 1970. Vol. 45. Issue 6. P. 687–690. <https://doi.org/10.1104/pp.45.6.687>

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гинак А.И., Сулейманкадиев С.Э., Сулейманкадиева А.Э. Рострегулирующая активность 2-замещенных тиазolidинов на проростках подсолнечника // Известия Волгоградского государственного технического университета. 2008. Т. 1. Вып. 5. С. 98–101
 2. Ольшевская В.А., Черепанов И.А., Спиридонов Ю.А., Спиридонова Г.С., Макаренков А.В., Самарская А.С. [и др.]. Гербицидная активность производных карборанов, сидномина, ферроцена // Агрохимия. 2017. N 4. С. 16–21.
 3. Cherepanov I.S. Spectral characteristics and biological activity of synthetic humic-like substances on the basis of carbohydrates // Journal of Physics: Conference Series. 2019. Vol. 1399. Issue 5. P. 055001. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1399/5/055001>
 4. Butler H.J., McAinsh M.R., Adams S., Martin F.L. Application of vibrational spectroscopy techniques to non-destructively monitor plant health and development // Analytical Methods. 2015. Vol. 7. P. 4059–4070. <https://doi.org/10.1039/c5ay00377f>
 5. Turker-Kaya S., Huck C.W. A review of mid-infrared and near-infrared imaging: principles, concepts and application in plant tissue analysis // Molecules. 2017. Vol. 22. Issue 1. P. 168. <https://doi.org/10.3390/molecules22010168>
 6. Дмитриева Е.Д., Сюндюкова К.В., Акатова Е.В., Леонтьева М.М., Волкова Е.М., Музафаров Е.Н. Биологическая активность гуминовых веществ сапропеля реки Упы Тульской области // Химия растительного сырья. 2017. N 1. С. 137–144. <https://doi.org/10.14528/jcprm2017011418>
 7. Stewart D. Fourier transform infrared microspectroscopy of plant tissues // Applied Spectroscopy. 1996. Vol. 50. Issue 3. P. 357–365. <https://doi.org/10.1366/0003702963906384>
 8. Buensanteai N., Sompong M., Saengchan C., Thumanu K. The cellular components of cucumber seedlings after primed with plant growth promoting rhizobacteria, *Bacillus subtilis* Bs008 // African Journal of Microbiology Research. 2014. Vol. 8. Issue 10. P. 1006–1011. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.1856>
 9. Wu J., Guo J., Hu Y., Gong H. Distinct physiological responses of tomato and cucumber plants in silicon-mediated alleviation of cadmium stress // Frontiers in Plant Science. 2015. Vol. 6. P. 453. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00453>
 10. Thumanu K., Sompong M., Phansak P., Nontapot K., Buensanteai N. Use of infrared microspectroscopy to determine leaf biochemical composition of cassava in response to *Bacillus subtilis* CaSUT007 // Journal of Plant Interactions. 2015. Vol. 10. Issue 1. P. 270–279. <https://doi.org/10.1080/17429145.2015.1059957>
 11. Rico C.M., Peralta-Videa J.R., Gardea-Torresday J.L. Differential effect of cerium oxide nanoparticles on rice, wheat and barley root: a Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy // Applied Spectroscopy. 2015. Vol. 69. Issue 2. P. 287–295. <https://doi.org/10.1366/14-07495>
 12. Chu H.-L., Lu T.-Y., Lin S.-Y. Effect of cyanide concentration on the secondary structures of protein in the crude homogenates of the fish gill tissue // Aquatic Toxicology. 2001. Vol. 55. Issue 3-4. P. 171–176. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(01\)00177-1](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(01)00177-1)
 13. Yang J., Yen H. Early salt stress effect on the changes in chemical composition in leaves of Ice plant and Arabidopsis. A Fourier transform infrared spectroscopy study // Plant Physiology. 2002. Vol. 130. P. 1032–1042.
 14. Mouille G., Robin S., Lecomte M., Pagant S., Hofte H. Classification and identification of *Arabidopsis* cell wall mutants using Fourier-transform infrared (FTIR) microspectroscopy // The Plant Journal. 2003. Vol. 35. Issue 3. P. 393–404. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113X.2003.01807.x>
 15. Gorgulu S.T., Dogan M., Severcan F. The characterization and differentiation of higher plants by Fourier transformed infrared spectroscopy // Applied Spectroscopy. 2007. Vol. 61. Issue 3. P. 300–308. <https://doi.org/10.1366/000370207780220903>
 16. Chapados C., Lemieux S., Carpentier R. Protein and chlorophyll in photosystem II probed by infrared spectroscopy // Biophysical Chemistry. 1991. Vol. 39. Issue 3. P. 225–239. [https://doi.org/10.1016/0301-4622\(91\)80001-8](https://doi.org/10.1016/0301-4622(91)80001-8)
 17. Антонов В.И., Ягодин В.И. Спектральные характеристики препаратов хлорофилла из еловой древесной зелени // Химия растительного сырья. 2006. N 2. С. 47–49.
 18. Crisan M., Grozav M., Kurunczi L., Ilia G., Berteau C.M. Inhibitory effect of some synthetic monoethanolamine salt of *para*-substituted benzoic acids and corresponding benzoic acids on cucumber seed germination // Journal of Plant Interactions. 2007. Vol. 2. P. 53–61. <https://doi.org/10.1080/17429140701422496>
 19. Guikema J., Freeman L., Fleming E.Y. Effect of gabaculine on pigment biosynthesis in normal and nutrient deficient cell of *Anacystis nidulans* // Plant Physiology. 1986. Vol. 82. Issue 1. P. 280–284. <https://doi.org/10.1104/pp.82.1.280>
- #### REFERENCES
1. Ginak AI, Suleimankadiyev SE, Suleimankadiyeva AE. Growth-regulating activity of 2-substituted thiazolidines on sunflower sprouts. *Izvestiya Volgogradskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta = Herald of Volgograd State Technical Institute University*. 2008;1:98–101. (In Russian)
 2. Ol'shevskaya VA, Cherepanov IA, Spiridonov YuA, Spiridonova GS, Makarenkov AV, Samarskaya AS, et al. Herbicidal activity of carboranes, sydnone imine and ferrocene derivatives. *Agrokimiya*. 2017;4:16–21 (In Russian)
 3. Cherepanov IS. Spectral characteristics and biological activity of synthetic humic-like substances on the basis of carbohydrates. *Journal of Physics:*

Conference Series. 2019;1399(5):055001. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1399/5/055001>

4. Butler HJ, McAinsh MR, Adams S, Martin FL. Application of vibrational spectroscopy techniques to non-destructively monitor plant health and development. *Analytical Methods*. 2015;7:4059–4070. <https://doi.org/10.1039/c5ay00377f>

5. Turker-Kaya S, Huck CW. A review of mid-infrared and near-infrared imaging: principles, concepts and application in plant tissue analysis. *Molecules*. 2017;22(1):168. <https://doi.org/10.3390/molecules22010168>

6. Dmitrieva ED, Siundiukova KV, Akatova EV, Leont'eva MM, Volkova EM, Muzafarov EN. Biological activity of humic substances sapropel Upa river Tula region. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya = Chemistry of plant raw material*. 2017;1:137–144 (In Russian) <https://doi.org/10.14528/jcprm2017011418>

7. Stewart D. Fourier transform infrared microspectroscopy of plant tissues. *Applied Spectroscopy*. 1996;50(3):357–365. <https://doi.org/10.1366/0003702963906384>

8. Buensanteai N, Sompong M, Saengchan C, Thumanu K. The cellular components of cucumber seedlings after primed with plant growth promoting rhizobacteria, *Bacillus subtilis* Bs008. *African Journal of Microbiology Research*. 2014;8(10):1006–1011. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.1856>

9. Wu J, Guo J, Hu Y, Gong H. Distinct physiological responses of tomato and cucumber plants in silicon-mediated alleviation of cadmium stress. *Frontiers in Plant Science*. 2015;6:453. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00453>

10. Thumanu K, Sompong M, Phansak P, Nontapot K, Buensanteai N. Use of infrared microspectroscopy to determine leaf biochemical composition of cassava in response to *Bacillus subtilis* CaSUT007. *Journal of Plant Interactions*. 2015;10(1):270–279. <https://doi.org/10.1080/17429145.2015.1059957>

11. Rico CM, Peralta-Videa JR, Gardea-Torresday JL. Differential effect of cerium oxide nanoparticles on rice, wheat and barley root: a Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy. *Applied Spectroscopy*. 2015;69(2):287–295. <https://doi.org/10.1366/14-07495>

12. Chu H-L, Lu T-Y, Lin S-Y. Effect of cyanide concentration on the secondary structures of protein in the crude homogenates of the fish gill tissue. *Aquatic Toxicology*. 2001;55(3–4):171–176. [https://doi.org/10.1016/s0166-445x\(01\)00177-1](https://doi.org/10.1016/s0166-445x(01)00177-1)

13. Yang J, Yen H. Early salt stress effect on the changes in chemical composition in leaves of Ice plant and Arabidopsis. A Fourier transform infrared spectroscopy study. *Plant Physiology*. 2002;130:1032–1042.

14. Mouille G, Robin S, Lecomte M, Pagant S, Hofte H. Classification and identification of *Arabidopsis* cell wall mutants using Fourier-transform infrared (FTIR) microspectroscopy. *The Plant Journal*. 2003;35(3):393–404. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113.2003.01807.x>

15. Gorgulu ST, Dogan M, Severcan F. The characterization and differentiation of higher plants by Fourier transformed infrared spectroscopy. *Applied Spectroscopy*. 2007;61(3):300–308. <https://doi.org/10.1366/000370207780220903>

16. Chapados C, Lemieux S, Carpentier R. Protein and chlorophyll in photosystem II probed by infrared spectroscopy. *Biophysical Chemistry*. 1991;39(3):225–239. [https://doi.org/10.1016/0301-4622\(91\)80001-8](https://doi.org/10.1016/0301-4622(91)80001-8)

17. Antonov VI, Yagodin VI. Spectral characteristics of chlorophyll preparations from fir-tree wood greens. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya = Chemistry of plant raw material*. 2006; 2:47–49 (In Russian)

18. Crisan M, Grozav M, Kurunczi L, Ilia G, Bertea CM. Inhibitory effect of some synthetic monoethanolamine salt of *para*-substituted benzoic acids and corresponding benzoic acids on cucumber seed germination. *Journal of Plant Interactions*. 2007;02:53–61. <https://doi.org/10.1080/17429140701422496>

19. Guikema J, Freeman L, Fleming EY. Effect of gabaculine on pigment biosynthesis in normal and nutrient deficient cell of *Anacystis nidulans*. *Plant Physiology*. 1986;82(1):280–284. <https://doi.org/10.1104/pp.82.1.280>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Черепанов Игорь Сергеевич,

к.х.н., доцент,
Удмуртский государственный университет,
426034, г. Ижевск, ул. Университетская, 1,
Российская Федерация,
✉ e-mail: cherchem@mail.ru

Журавлева Алина Андреевна,

студентка,
Удмуртский государственный университет,
426034, г. Ижевск, ул. Университетская, 1,
Российская Федерация,
e-mail: cherchem@mail.ru

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Igor S. Cherepanov,

Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Udmurt State University,
1, Universitetskaya St., Izhevsk, 426034,
Russian Federation,
✉ e-mail: cherchem@mail.ru

Alina A. Zhuravleva,

Student,
Udmurt State University,
1, Universitetskaya St., Izhevsk, 426034,
Russian Federation,
e-mail: cherchem@mail.ru

Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

*Поступила в редакцию 25.12.2020.
Одобрена после рецензирования 29.01.2021.
Принята к публикации 28.02.2021.*

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

The final manuscript has been read and approved by all the co-authors.

*The article was submitted 25.12.2020.
Approved after reviewing 29.01.2021.
Accepted for publication 28.02.2021.*

Оригинальная статья / Original article

УДК 661.746.2:663.1:633.13(045)

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-99-106>



Получение молочной кислоты из шелухи овса

© Н.А. Шавыркина, Е.А. Скиба

Институт проблем химико-энергетических технологий СО РАН,
г. Бийск, Российская Федерация

Резюме: Полилактиды занимают лидирующую позицию в технологии получения биоразлагаемых полимеров для производства упаковочных материалов. В последнее время все чаще предлагается использовать дешевое целлюлозосодержащее сырье для получения прекурсора полилактидов – молочной кислоты. Авторами настоящей работы впервые в качестве сырья использована шелуха овса. Предварительная химическая обработка шелухи овса проведена в две стадии авторскими способами с использованием разбавленных растворов азотной кислоты и гидроксида натрия с получением технической целлюлозы. Далее техническая целлюлоза была подвергнута ферментативному гидролизу, после чего полученный преимущественно глюкозный ферментативный гидролизат сбраживался продуцентом *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Исследовано влияние на эффективность молочнокислого брожения активной кислотности среды, активизации закваски и дозировки дрожжевого экстракта. По результатам исследований рекомендуется поддерживать активную кислотность культуральной жидкости на уровне 6,5 ед. pH в течение всего процесса брожения, что позволяет повысить выход молочной кислоты в 1,7 раза по сравнению с процессом без корректировки pH. Показано, что активизация закваски путем пересева с молочной среды на глюкозную для переключения ферментативного аппарата продуцента с конверсии лактозы на конверсию глюкозы ускоряет процесс молочнокислого брожения в 2,2 раза и повышает константу сбраживания в 2,7 раза. Установлено, что внесение в среду дрожжевого экстракта в количестве 1% интенсифицирует молочнокислое брожение: процесс молочнокислого брожения ускоряется в 1,8 раза, константа сбраживания увеличивается в 1,4 раза, выход молочной кислоты повышается на 9,6% по сравнению с контролем и составляет 76,7%.

Ключевые слова: шелуха овса, молочная кислота, молочнокислые бактерии, полилактиды, ферментативный гидролизат

Благодарности: Исследование выполнено по бюджетному проекту ИПХЭТ СО РАН «Фундаментальные основы создания интегрированной технологии переработки легковозобновляемого непищевого растительного сырья в востребованные экономикой РФ продукты».

Для цитирования: Шавыркина Н.А., Скиба Е.А. Получение молочной кислоты из шелухи овса. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т. 11. N 1. С. 99–106. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-99-106>

Obtaining lactic acid from oat husks

Nadezhda A. Shavyrkina, Ekaterina A. Skiba

Institute for Problems of Chemical and Energetic Technologies SB RAS,
Biyssk, Russian Federation

Abstract: Polylactides are increasingly being used as biodegradable polymers in the production of packaging materials. It has been recently proposed to obtain a polylactide precursor – lactic acid – from inexpensive cellulose-containing raw materials. For the first time, the authors of the present work used oat husks for this purpose. Preliminary chemical treatment of oat husks was carried out in two stages using dilute solutions of nitric acid and sodium hydroxide to obtain technical cellulose, which was further subject to enzymatic hydrolysis. The as-obtained glucose enzymatic hydrolysate was fermented by the producer *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. The effect of the active acidity of the medium, activation of the starter culture and dosage of the yeast extract on the efficiency of lactic acid fermentation was investigated. According to the obtained results, the active acidity of the culture should be maintained at a pH level of 6.5 during the entire fermentation process, which allows the yield of lactic acid to be increased by 1.7 times compared to the process without adjusting the pH. It was shown that the activation of the starter culture using a glucose medium instead of a milk medium, which switches the fermentation process from lactose conversion to glucose conversion, increases the rate of lactic acid fermentation by 2.2 times and the fermentation constant by 2.7 times. It was established that the introduction of yeast extract into the medium in an amount of 1% intensifies

lactic acid fermentation: the process of lactic acid fermentation accelerates by 1.8 times; the fermentation constant increases by 1.4 times; the yield of lactic acid increases by 9.6% compared to the control thus reaching 76.7%.

Keywords: oat husks, lactic acid, lactic acid bacteria, polylactides, enzymatic hydrolysate

Acknowledgments. The research was carried out according to the budget project of IPCET SB RAS "Fundamentals of the creation of an integrated technology for the processing of easily renewable non-food plant raw materials into products demanded by the Russian economy".

For citation: Shavyrkina NA, Skiba EA. Obtaining lactic acid from oat husks. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(1): 99–106. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-99-106>

ВВЕДЕНИЕ

Молочная кислота – это высокоценное химическое вещество, которое находит применение в пищевой промышленности (в качестве регулятора кислотности и консерванта), фармацевтике, косметологии, ветеринарии, а наиболее ценным техническим направлением является использование его полимерной формы – полилактида, являющегося основой биоразлагаемых пластмасс. Прогнозируется, что до 2025 г. рынок молочной кислоты продолжит расти, при этом совокупный годовой темп роста составит порядка 18,7% [1, 2]. Благодаря соответствию полилактидов критерию биоразлагаемости они используются в составе всевозможных упаковочных материалов [3–5]. Особую ценность биоразлагаемые полимеры на основе полилактидов приобрели ввиду доказанной возможности их применения в медицине – отрасли, крайне чувствительной к составу используемых материалов [6–9].

Несмотря на то что синтез полилактидов дороже, чем получение полимеров из нефти, экологичность данного производства определяет его несомненную приоритетность, а снижение затрат повышает конкурентоспособность производства. Поэтому отказ от получения полилактидов из пищевого сырья, являющегося либо дорогим, либо скоропортящимся, поиск иных сырьевых источников, а также новых технологических решений является актуальным и востребованным. Одним из самых перспективных направлений является получение полилактидов из непищевого целлюлозосодержащего сырья [2, 10–14].

Шелуха овса как крупнотоннажный целлюлозосодержащий сельскохозяйственный отход, имеющаяся в глобальных объемах, была предложена учеными Института проблем химико-энергетических технологий (ИПХЭТ) СО РАН для биотехнологической трансформации еще в 2012 г. [15], в настоящее время приоритет коллектива признан на международном уровне [16, 17]. В данной работе впервые шелуха овса рассматривается в качестве сырья для получения молочной кислоты.

Производство молочной кислоты основано на биотрансформации углеводов молочнокислыми бактериями в процессе молочнокислого брожения. Молочнокислые бактерии способны метаболизировать углеводы по гетероферментативному пути, конечными продуктами являются молочная кислота (порядка 50% от исходной массы углевода), а также уксусная кислота, этанол, углекислый газ и др. Гомоферментативные молочнокислые бактерии трансформируют гексозы в молочную кислоту практически полностью (порядка 98%). Многие молочнокислые бактерии интенсивно сбраживают пентозы, при этом кроме молочной кислоты образуется равное количество уксусной¹. Поэтому для технологических процессов получения лактата наиболее рационально использовать сырье, содержащее шестиуглеродные моносахариды, и в качестве продуцента применять гомоферментативные молочнокислые бактерии.

Опираясь на полученный нами опыт трансформации шелухи овса в ценные продукты биотехнологического синтеза, для получения молочной кислоты был выбран авторский способ предобработки сырья в две стадии разбавленными растворами азотной кислоты и гидроксида натрия при атмосферном давлении [18]. При этом получается химически чистый субстрат, ферментативный гидролиз которого позволяет получить преимущественно глюкозный гидролизат [14]. Доказано, что именно этот способ предобработки позволяет получить биологически доброкачественную среду, пригодную не только для жизнедеятельности дрожжей, которым свойственна устойчивость к неблагоприятным условиям [19], но и для крайне требовательных и чувствительных к составу питательных сред продуцентов бактериальной целлюлозы [20].

Предпосылкой культивирования молочнокислых бактерий на гидролизных углеводных средах является, помимо прочего, схожесть метаболического пути преобразования глюкозы дрожжами и гомоферментативными молочнокислыми бактериями. Из одного моля глюкозы по пути гликолиза

¹Квасников Е.И., Нестеренко О.А. Молочнокислые бактерии и пути их использования. М.: Наука, 1975. 384 с.

образуется два моля пировиноградной кислоты, затем ферментный комплекс дрожжей проводит декарбоксилирование пировиноградной кислоты до ацетальдегида (пируватдекарбоксилаза), который далее восстанавливается в этанол (алкогольдегидрогеназа), в то время как молочнокислые бактерии восстанавливают пировиноградную кислоту до молочной кислоты посредством лактатдегидрогеназы в одну стадию¹.

Целью данной работы являлось изучение молочнокислого брожения при получении молочной кислоты из шелухи овса. Для достижения поставленной цели было проведено изучение влияния на эффективность молочнокислого брожения таких факторов, как уровень активной кислотности среды, активизация закваски и использование дрожжевого экстракта в качестве стимулятора брожения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Предварительная химическая обработка шелухи овса осуществлялась в две стадии с использованием азотной кислоты и гидроксида натрия, использованы разбавленные 4% масс. растворы, процессы проведены при атмосферном давлении в стандартном емкостном оборудовании объемом 250 л [18]. Далее полученная техническая целлюлоза подвергалась ферментативному гидролизу в ферментере объемом 11 л, условия гидролиза подробно описаны в работе [14]. Концентрация редуцирующих веществ (РВ) после проведения гидролиза составила 41,7 г/л, в том числе пентоз – 1,6 г/л. Полученный нативный ферментативный водный гидролизат технической целлюлозы плодовых оболочек овса использовали как питательную среду. В качестве продуцента был использован штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 21В 2369 Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов.

Поскольку известно, что молочная кислота как продукт метаболизма бактерий по мере увеличения ее концентрации в среде приводит к ингибированию синтетической способности продуцента, была исследована возможность поддержания постоянного уровня кислотности в течение всего процесса брожения. Брожение велось в течение 9 суток при температуре 37 °С. Каждые сутки производили корректировку кислотности среды до уровня 6,5 ед. рН раствором гидроксида кальция концентрацией 10% масс. Для сравнения в контрольном опыте проводили сбраживание питательной среды без ежесуточной корректировки рН. Продуцент вносили в среду стерильного гидролизата в количестве 10% от объема гидролизата.

Далее была проведена серия экспериментов, направленных на повышение эффективности

конверсии редуцирующих веществ в молочную кислоту. Для этого подготовку посевного материала производили разными способами и вносили в питательную среду факторы роста.

Приготовление посевного материала производилось двумя способами:

– *одно субкультивирование*. В стерильное солодовое сусло (рН = 6,5) вносили 10% об. инокулята *L. bulgaricus*, полученного на стерилизованном молоке. Молоко натуральное приобретали в частных хозяйствах г. Бийска, затем подвергали сепарации до уровня жирности не более 0,5% масс. и автоклавировали при избыточном давлении 0,5 атм. в течение 30 мин. Далее молоко охлаждали до температуры культивирования (41 °С), вносили закваску *L. bulgaricus* и термостатировали при указанной температуре в течение 6–8 ч до получения плотного однородного сгустка. Культивирование продуцента на солодовом сусле проводили 24 ч при температуре 41 °С в статических условиях;

– *четыре субкультивирования*. С целью реактивации посевной культуры провели три субкультивирования инокулята на среде стерилизованного молока (каждое субкультивирование в течение 12 ч при 41 °С) и одно субкультивирование на среде стерильного солодового сусла (для переключения ферментов продуцента с утилизации лактозы на утилизацию глюкозы), субкультивирование проводили статически в течение 24 ч при температуре 41 °С.

Подготовленный двумя способами посевной материал вносили в количестве 10% от объема питательной среды в стерилизованный ферментативный гидролизат плодовых оболочек овса, стабилизированный по активной кислотности (6,5 ед. рН).

Как известно, молочнокислые бактерии чувствительны к факторам роста, поэтому была изучена динамика молочнокислого брожения гидролизных сред при наличии в их составе дрожжевого экстракта (д.э.) в концентрациях 1 и 3% масс. от объема среды. В состав дрожжевого экстракта входят витамины группы В и аминный азот, которые стимулируют метаболизм молочнокислых бактерий¹. В качестве контрольного использовался образец, в который дрожжевой экстракт не вносился. В данном опыте использовался посевной материал, активированный четырьмя субкультивированиями, дозировка составила 10% об. Молочнокислое брожение контролировалось по убыли РВ в среде и по накоплению продукта реакции – молочной кислоты. Концентрация РВ в процессе молочнокислого брожения определялась спектрофотометрически на UNICO UV-2804 с использованием динитросалицилового реактива в пересчете на глюкозу². Концентрация молочной

¹Miller G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar // Analytical Chemistry. 1959. Vol. 31.Issue 3.P. 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>.

кислоты измерялась титриметрическим способом согласно ГОСТ 490-2006³. Численность микроорганизмов определяли по методу Мак-Креди⁴, при этом в качестве среды использовали стерилизованное обезжиренное молоко. Все опыты повторены трижды.

Работа выполнена при использовании оборудования Бийского регионального центра коллективного пользования «Центр синтеза и исследований высокоэнергетических соединений и специальных материалов» СО РАН (Институт проблем химико-энергетических технологий СО РАН, г. Бийск, Россия).

Расчет констант сбраживания $K_{сб}$ проводился по формуле:

$$K_{сб} = \frac{2,303}{\tau_{сб}} \cdot \lg \frac{s_0}{s} p,$$

где $K_{сб}$ – константа скорости сбраживания, $ч^{-1}$; $\tau_{сб}$ – фиксируемый период времени от начала брожения; s_0 и s – концентрация РВ в начале брожения и в момент времени $\tau_{сб}$ [21].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Зависимость концентрации РВ в процессе брожения при изучении влияния уровня активной кислотности на процесс брожения приведена на рис. 1.

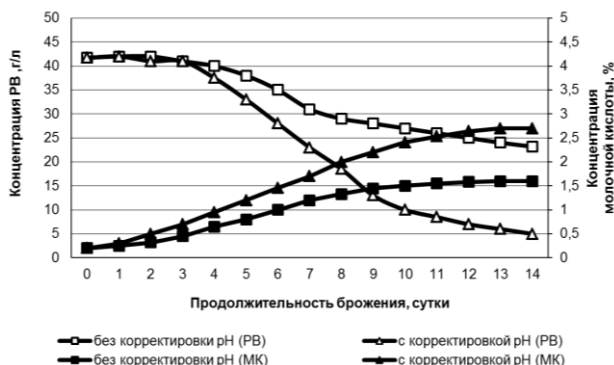


Рис. 1. Зависимость концентрации редуцирующих веществ и молочной кислоты в процессе сбраживания ферментативного гидролизата из шелухи овса от режима коррективы активной кислотности среды

Fig. 1. Dependence of reducing substances concentrations and lactic acid concentration in the oat husks enzymatic hydrolyzate fermentation on the mode of the active acidity correction of the medium

Анализируя полученные данные по влиянию уровня активной кислотности на динамику концентрации РВ, можно отметить наличие лаг-фазы брожения, которая составила 3-е суток. При этом концентрация редуцирующих веществ

в гидролизной среде в случае принудительной коррективы рН снизилась в 8,3 раза (с 41,7 до 5,0 г/л), в то время как в случае без ежесуточной коррективы кислотности среды произошло снижение концентрации РВ всего лишь в 1,8 раза (с 41,7 до 23,2 г/л). Соответственно, концентрация молочной кислоты в случае принудительной коррективы рН составила 2,7% масс. (что соответствует выходу молочной кислоты 67,1% от теоретически возможного); а без коррективы кислотности среды – 1,6% (38,4% от теоретически возможного), то есть в 1,7 раза ниже. Таким образом, при сбраживании гидролизных сред необходимо поддерживать рН на уровне 6,5 ед.

На рис. 2 представлены кривые убыви РВ и нарастания концентрации молочной кислоты в процессе молочнокислого брожения при различных способах подготовки посевного материала.

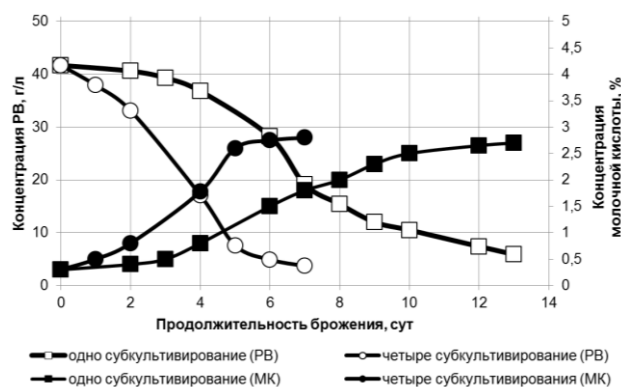


Рис. 2. Зависимость концентрации редуцирующих веществ и концентрации молочной кислоты в процессе молочнокислого брожения от способа подготовки посевного материала

Fig. 2. Dependence of reducing substances concentration and lactic acid concentration in the process of lactic acid fermentation on the method of seed preparation

Способ подготовки посевного материала в четыре субкультивирования позволяет избежать лаг-фазы и сократить продолжительность молочнокислого брожения в 2,2 раза: с 13 до 6 суток. При этом скорость утилизации субстрата возрастает в 2,7 раза: при субкультивировании в четыре стадии $K_{сб}$ составила 0,016 $ч^{-1}$, при субкультивировании в одну стадию – 0,006 $ч^{-1}$. Кроме того, установлено, что количество остаточных сахаров сокращается в 1,6 раза и составляет при субкультивировании в четыре стадии 3,7 г/л; при субкультивировании в одну стадию – 5,9 г/л. Однако конечная концентрация молочной кислоты изменилась незначительно: при субкультивировании в четыре стадии она составила

³ГОСТ 490-2006. Добавки пищевые. Кислота молочная Е270. Технические условия.

⁴Крусь Г.Н., Шалыгина А.М., Волокитина З.В. Методы исследования молока и молочных продуктов: учебник для студентов вузов. М.: Колос, 2000. 368 с.

2,8% масс. (что соответствует выходу молочной кислоты 64,7% от теоретически возможного); при субкультивировании в одну стадию – 2,7% масс. (67,1% от теоретически возможного).

На рис. 3 приведена зависимость концентраций РВ и молочной кислоты в процессе брожения от концентрации дрожжевого экстракта в питательной среде, а в таблице отражены основные показатели молочнокислого брожения при наличии и отсутствии в среде стимуляторов роста.

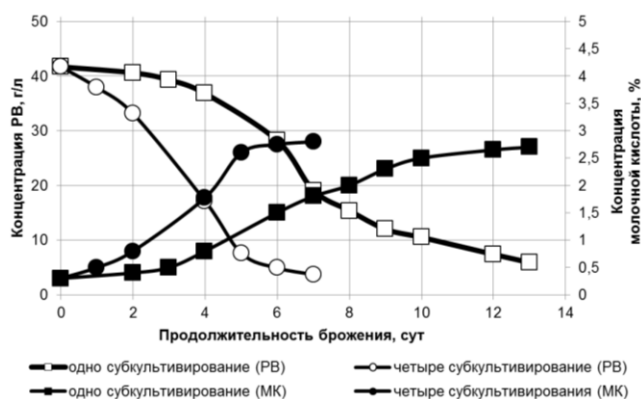


Рис. 3. Зависимость концентрации редуцирующих веществ и молочной кислоты в процессе молочнокислого брожения от концентрации дрожжевого экстракта в питательной среде

Fig. 3. Dependence of reducing substances concentration and lactic acid concentration in the process of lactic acid fermentation on yeast extract concentration in the nutrient medium

Внесение дрожжевого экстракта в качестве стимулятора также позволяет избежать лаг-фазы в процессе молочнокислого брожения и значительно интенсифицировать молочнокислое брожение: продолжительность молочнокислого брожения сокращается в 1,8 раза (с 9 до 5 суток), содержание остаточных РВ сокращается в 2,5 раза (с 3,7 до 1,5 г/л), константа сбраживания РВ повышается в 1,4 раза. При этом константа сбраживания при использовании дрожжевого экстракта не зависит от его концентрации, поэтому достаточно вносить его в среду в количестве 1% масс. Этот вывод подтверждается анализом численности микроорганизмов: добавление 1% дрожжевого экстракта стимулирует размножение клеток на ранней стадии, а добавление 3% масс. дрожжевого экстракта не оказывает значимого влияния на этот показатель.

Внесение дрожжевого экстракта приводит к повышению выхода молочной кислоты на 9,6% по сравнению с контролем (76,7 против 67,1%). Выход молочной кислоты на гидролизных средах существенно зависит от сырья, способа предобработки целлюлозосодержащего сырья и концентрации ингибиторов, обусловленных способом предобработки сырья [10]. Например, в работе [11] при сбраживании продуцентом *Lactobacillus*

plantarum сред, полученных из соломы пшеницы методом автогидролиза, концентрация молочной кислоты составила 2,4 г/л, что соответствует выходу 21% от теоретического. Авторами работы [22] был использован штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, в качестве субстрата выбраны древесина бука и сосны, которые предварительно были обработаны окислительно-органосольвентным способом, и применена технология одновременного осахаривания и сбраживания. Выход молочной кислоты при использовании гидролизата буковой древесины составил 82,7% от теоретически возможного, при использовании в качестве питательной среды гидролизата древесины сосны – 41,4%.

Некоторые показатели молочнокислого брожения в зависимости от дозировки дрожжевого экстракта в среде

Some indicators of lactic acid fermentation depending on the yeast extract dosage in the medium

Показатель брожения	Дозировка дрожжевого экстракта, % масс.		
	1	3	0 (контроль)
Численность <i>L. bulgaricus</i> при продолжительности брожения, сутки:			
2	$5 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^7$
4	$5 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^8$	$5 \cdot 10^8$
6	$5 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^8$	$5 \cdot 10^8$
Константа сбраживания, $K_{сб}$, ч ⁻¹	0,026	0,026	0,019
Остаточная концентрация РВ после брожения, г/л	1,5	1,5	3,7
Выход молочной кислоты, % от теоретически возможного	76,7	76,7	67,1

Выбранный нами способ предобработки обеспечил получение преимущественно глюкозного биологически доброкачественного гидролизата, поэтому получен хороший выход целевого продукта. В то же время использованная двухстадийная обработка является довольно дорогостоящей, поэтому в дальнейшем нами будет рассмотрена возможность упрощения процесса предобработки и сокращения его трудоемкости при условии сохранения высокого выхода молочной кислоты.

ВЫВОДЫ

Таким образом, суммируя полученные в ходе исследований результаты, можно сделать следующие выводы:

1. При молочнокислом сбраживании ферментативных гидролизных сред необходимо в процессе брожения поддерживать кислотность на уровне 6,5 ед. рН, что позволяет повысить выход молочной кислоты в 1,7 раза по сравнению с процессом без корректировки рН.

2. Активизация закваски методом четырехкратного субкультивирования (3 пересева на стерильные молочные среды и 1 пересев на стерильную солодовую среду) позволяет в 2,2 раза сократить продолжительность молочнокислого брожения и

увеличить константу сбраживания в 2,7 раза.

3. Установлено, что внесение дрожжевого экстракта в количестве 1% масс. приводит к повышению выхода молочной кислоты на 9,6% по сравнению с контролем (76,7 против 67,1 %).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. De Oliveira R.A., Komesu A., Vaz Rossell C.E., Wolf Maciel M.R., Filho R.M. A study of the residual fermentation sugars influence on an alternative downstream process for first and second-generation lactic acid // *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. 2020. Vol. 15. P. 100206. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2019.100206>

2. Mazzoli R. Metabolic engineering strategies for consolidated production of lactic acid from lignocellulosic biomass // *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2020. Vol. 67. Issue 1. P. 61–72. <https://doi.org/10.1002/bab.1869>

3. Arfat Y.A., Ahmed J., Ejaz M., Mullah M. Polylactide/graphene oxide nanosheets/clove essential oil composite films for potential food packaging applications // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018. Vol. 107. Part A. P. 194–203. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.156>

4. Pagano N., Campana G., Fiorini M., Morelli R. Laser transmission welding of polylactide to aluminium thin films for applications in the food-packaging industry // *Optics & Laser Technology*. 2017. Vol. 91. P. 80–84. <https://doi.org/10.1016/j.optlastec.2016.12.014>

5. Rapisarda M., Patanè C., Pellegrino A., Malvuccio A., Rizzo V., Muratore G., et al. Compostable Polylactide and Cellulose Based Packaging for Fresh-Cut Cherry Tomatoes: Performance Evaluation and Influence of Sterilization Treatment // *Materials*. 2020. Vol. 13. Issue 15. P. 3432. <https://doi.org/10.3390/ma13153432>

6. Nashchekina Yu., Nikonov P., Nashchekin A., Mikhailova N. Functional Polylactide Blend Films for Controlling Mesenchymal Stem Cell Behaviour // *Polymers*. 2020. Vol. 12. Issue 9. P. 1969. <https://doi.org/10.3390/polym12091969>

7. Su Y., Nan G. Treatment of medial humeral epicondyle fractures in children using absorbable self-reinforced polylactide pins // *Medicine*. 2020. Vol. 99. Issue 17. P. e19861. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000019861>

8. Kolmakov A.G., Baikin A.S., Gudkov S.V., Belosludtsev K.N., Nasakina E.O., Kaplan M.A., et al. Polylactide-based stent coatings: biodegradable polymeric coatings capable of maintaining sustained release of the thrombolytic enzyme streptokinase // *Pure and Applied Chemistry*. 2020. Vol. 92. Issue 8. P. 1329–1340. <https://doi.org/10.1515/pac-2019-1101>

9. Gherasim O., Grumezescu A.M., Grumezescu V., Iordache F., Vasile B.S., Holban A.M. Bioactive surfaces of polylactide and silver nanoparticles for the prevention of Microbial Contamination // *Materials*. 2020. Vol. 13. Issue 3. P. 768. <https://doi.org/10.3390/ma13030768>

10. Zynov'eva M.E., Shnaider K.L., Zaripova S.K. Production of lactic acid on enzymatic hydrolysates of cellulose-containing raw materials // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2020. Vol. 421. P. 052011. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/421/5/052011>

11. Верхотурова Е.В., Лозовая Т.С., Евстафьев С.Н. Биосинтез молочной кислоты на основе продуктов автогидролиза соломы пшеницы // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2016. Т. 6. N 3. P. 36–41. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2016-6-3-36-41>

12. Kobayashi K., et al. Method of producing chemical substance. Patent of United States, no. US 10,378,029 B2. 2019.

13. Stephanopoulos G., et al. Method for producing lactic acid from organic waste. Patent of United States, no. US 10,174,347 B2. 2019.

14. Kashcheyeva E.I., Gismatulina Yu.A., Budaeva V.V. Pretreatments of non-woody cellulosic feedstocks for bacterial cellulose synthesis // *Polymers*. 2019. Vol. 11. Issue 10. P. 1645. <https://doi.org/10.3390/polym11101645>

15. Сакович Г.В., Будаева В.В., Скиба Е.А., Макарова Е.И., Павлов И.Н., Кортусов А.Н. [и др.]. Опыт масштабирования ферментативного гидролиза технических целлюлоз мискантуса и плодовых оболочек овса // *Ползуновский вестник*. 2012. N 4. С. 173–176.

16. Chopda R., Ferreira J.A., Taherzadeh M.J. Biorefining oat husks into high-quality lignin and enzymatically digestible cellulose with acid-catalyzed ethanol organosolv pretreatment // *Processes*. 2020. Vol. 8. Issue 4. P. 435. <https://doi.org/10.3390/pr8040435>

17. Santos J., Ouadi M., Jahangiri H., Hornung A. Thermochemical conversion of agricultural wastes applying different reforming temperatures // *Fuel Processing Technology*. 2020. Vol. 203. P. 106402. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2020.106402>

18. Sakovich G.V., Mikhailov Yu.M., Budaeva V.V., Korchagina A.A., Gismatulina Yu.A., Kozyrev N.V. Cellulose Nitrates from Unconventional Feedstocks // *Doklady Chemistry*. 2018. Vol. 483. Issue 1. P. 287–291. <https://doi.org/10.1134/S0012500818110101>

19. Скиба Е.А., Будаева В.В., Макарова Е.И., Павлов И.Н., Золотухин В.Н., Сакович Г.В. Биэтанол из целлюлозы плодовых оболочек овса // *Вестник Казанского технологического университета*. 2013. Т. 16. N 22. С. 202–205.

20. Гладышева Е.К., Скиба Е.А. Биосинтез бактериальной целлюлозы на ферментативном гидролизате технической целлюлозы из плодовых оболочек овса // *Известия вузов. Прикладная хи-*

мия и биотехнология. 2017. Т. 7. N 1. С. 141–147. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2017-7-1-141-147>

21. Технология спирта / В.Л. Яровенко, В.А. Маринченко, В.А. Смирнов [и др.]; под ред. проф. В.Л. Яровенко. М.: Колос-Пресс, 2002. 466 с.

22. Karnaouri A., Asimakopoulou G., Kalogi-

annis K.G., Lappas A., Topakas E. Efficient D-lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* through conversion of organosolv pretreated lignocellulosic biomass // Biomass and Bioenergy. 2020. Vol. 140. P. 105672. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105672>

REFERENCES

1. De Oliveira RA, Komesu A, Vaz Rossell CE, Wolf Maciel MR, Filho RM. A study of the residual fermentation sugars influence on an alternative downstream process for first and second-generation lactic acid. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. 2020;15:100206. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2019.100206>

2. Mazzoli R. Metabolic engineering strategies for consolidated production of lactic acid from lignocellulosic biomass. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2020;67(1):61–72. <https://doi.org/10.1002/bab.1869>

3. Arfat YA, Ahmed J, Ejaz M, Mullah M. Polylactide/graphene oxide nanosheets/clove essential oil composite films for potential food packaging applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018;107:194–203. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.156>

4. Pagano N, Campana G, Fiorini M, Morelli R. Laser transmission welding of polylactide to aluminium thinfilms for applications in the food-packaging industry. *Optics & Laser Technology*. 2017;91:80–84. <https://doi.org/10.1016/j.optlastec.2016.12.014>

5. Rapisarda M, Patanè C, Pellegrino A, Malvuccio A, Rizzo V, Muratore G, et al. Compostable Polylactide and Cellulose Based Packaging for Fresh-Cut Cherry Tomatoes: Performance Evaluation and Influence of Sterilization Treatment. *Materials*. 2020;13(15):3432. <https://doi.org/10.3390/ma13153432>

6. Nashchekina Yu, Nikonov P, Nashchekin A, Mikhailova N. Functional Polylactide Blend Films for Controlling Mesenchymal Stem Cell Behaviour. *Polymers*. 2020;12(9):1969. <https://doi.org/10.3390/polym12091969>

7. Su Y, Nan G. Treatment of medial humeral epicondyle fractures in children using absorbable self-reinforced polylactide pins. *Medicine*. 2020;99(17):e19861. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000019861>

8. Kolmakov AG, Baikin AS, Gudkov SV, Belosludtsev KN, Nasakina EO, Kaplan MA, et al. Polylactide-based stent coatings: biodegradable polymeric coatings capable of maintaining sustained release of the thrombolytic enzyme streptokinase. *Pure and Applied Chemistry*. 2020;92(8):1329–1340. <https://doi.org/10.1515/pac-2019-1101>

9. Gherasim O, Grumezescu AM, Grumezescu V, Iordache F, Vasile BS, Holban AM. Bioactive surfaces of polylactide and silver nanoparticles for the prevention of Microbial Contamination. *Materials*. 2020;13(3):768. <https://doi.org/10.3390/ma13030768>

10. Zynov'eva ME, Shnaider KL, Zaripova SK. Production of lactic acid on enzymatic hydrolysates of cellu-

lose-containing raw materials. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2020;421:052011. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/421/5/052011>

11. Verkhoturova EV, Lozovaya TS, Evstafev SN. Biosynthesis of lactic acid via fermentation of wheat straw autohydrolysis products. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2016; 6(3):36–41. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2016-6-3-36-41>

12. Kobayashi K, et al. *Method of producing chemical substance*. Patent of United States, no. US 10,378,029 B2; 2019.

13. Stephanopoulos G, et al. *Method for producing lactic acid from organic waste*. Patent of United States, no. US 10,174,347 B2; 2019.

14. Kashcheyeva EI, Gismatulina YuA, Budaeva VV. Pretreatments of non-woody cellulosic feedstocks for bacterial cellulose synthesis. *Polymers*. 2019;11(10):1645. <https://doi.org/10.3390/polym11101645>

15. Sakovich GV, Budaeva VV, Skiba EA, Makarova EI, Pavlov IN, Kortusov AN, et al. Experience of scaling up the enzymatic hydrolysis of technical celluloses from miscanthus and oat hulls. *Polzunovsky vestnik*. 2012;4:173–176. (In Russian)

16. Chopda R, Ferreira JA, Taherzadeh MJ. Bio-refining oat husks into high-quality lignin and enzymatically digestible cellulose with acid-catalyzed ethanol organosolv pretreatment. *Processes*. 2020;8(4):435. <https://doi.org/10.3390/pr8040435>

17. Santos J, Ouadi M, Jahangiri H, Hornung A. Thermochemical conversion of agricultural wastes applying different reforming temperatures. *Fuel Processing Technology*. 2020;203:106402. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2020.106402>

18. Sakovich GV, Mikhailov YuM, Budaeva VV, Korchagina AA, Gismatulina YuA, Kozyrev NV. Cellulose Nitrates from Unconventional Feedstocks. *Doklady Chemistry*. 2018;483(1):287–291. <https://doi.org/10.1134/S0012500818110101>

19. Skiba EA, Budaeva VV, Makarova EI, Pavlov IN, Zolotukhin VN, Sakovich GV. Bioethanol from oat hulls cellulose. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta = Bulletin of Kazan Technological University*. 2013;16(22):202–205 (In Russian)

20. Gladysheva EK, Skiba EA. Biosynthesis of bacterial cellulose on enzymatic hydrolyzate of oat hull pulp. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2017;7(1):141–147. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2017-7-1-141-147>

21. Yarovenko VL. (ed.) *Alcohol technology*. Moscow: Kolos-Press; 2002. 466 p. (In Russian).

22. Karnaouri A, Asimakopoulou G, Kalogiannis KG, Lappas A, Topakas E. Efficient D-lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bul-*

garicus through conversion of organosolv pretreated lignocellulosic biomass. *Biomass and Bioenergy*. 2020;140:105672. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105672>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Шавыркина Надежда Александровна,
к.т.н., доцент, старший научный сотрудник,
Институт проблем химико-энергетических
технологий СО РАН,
659322, г. Бийск, ул. Социалистическая, 1,
Российская Федерация,
✉ e-mail: 32nadina@mail.ru

Скиба Екатерина Анатольевна,
к.т.н., доцент, старший научный сотрудник,
Институт проблем химико-энергетических
технологий СО РАН,
659322, г. Бийск, ул. Социалистическая, 1,
Российская Федерация,
e-mail: eas08988@mail.ru

Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

*Все авторы прочитали и одобрили оконча-
тельный вариант рукописи.*

*Поступила в редакцию 26.10.2020.
Одобрена после рецензирования 08.12.2020.
Принята к публикации 28.02.2021.*

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Nadezhda A. Shavyrkina,
Cand. Sci. (Engineering), Associate Professor,
Senior Scientist,
Institute for Problems of Chemical and Energetic
Technologies SB RAS,
1, Sotsialisticheskaya St., Biysk, 659322,
Russian Federation,
✉ e-mail: 32nadina@mail.ru

Ekaterina A. Skiba,
Cand. Sci. (Engineering), Associate Professor,
Senior Scientist,
Institute for Problems of Chemical and Energetic
Technologies SB RAS,
1, Sotsialisticheskaya St., Biysk, 659322,
Russian Federation,
e-mail: eas08988@mail.ru

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests re-
garding the publication of this article.

*The final manuscript has been read and approved
by all the co-authors.*

*The article was submitted 26.10.2020.
Approved after reviewing 08.12.2020.
Accepted for publication 28.02.2021.*



Образование фталатов при деградации N-фенил-2-нафтиламина почвенными бактериями

© Л.Е. Макарова, А.С. Мориц, Н.А. Соколова

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
г. Иркутск, Российская Федерация

Резюме: N-фенил-2-нафтиламин (N-ФНА) и фталаты относят к веществам антибиотического действия. Появление и накопление этих веществ в биосфере обусловлено их техногенным и биогенным происхождением (метаболиты растений и бактерий). Цель работы – сравнить деградирующую активность в отношении N-ФНА у почвенных бактерий *Rhizobium leguminosarum* bv. viceae, *Bradyrhizobium japonicum*, *Pseudomonas syringae* pv. pisi, *Clavibacter michiganensis* sps. sepedonicus, *Azotobacter chroococcum*, различающихся по типу взаимоотношений с растениями гороха (*Pisum sativum* L.), синтезирующего вышеназванное соединение. Продукты деградации исследовали методом газовой хромато-масс-спектрометрии в этилацетатных экстрактах из культуральных жидких сред, куда вместе с бактериями вносили N-ФНА до концентрации 10 мкМ. С применением методов высокоэффективной жидкостной хроматографии в полученных при помощи этилацетата экстрактах из культуральных сред, куда вносили N-ФНА до концентрации 100 мкМ, через двое суток роста бактерий в этих средах прослеживали степень уменьшения его концентрации. Показано, что все исследованные виды бактерий способны деградировать N-ФНА с образованием фталатов. Наиболее высокую деградирующую активность обнаружили у бактерий *Rhizobium*, эндосимбионтов растений гороха, синтезирующего N-ФНА, и у свободноживущих азотфиксирующих бактерий рода *Azotobacter*. N-ФНА снижал жизнеспособность всех видов бактерий, но в разной степени. В наибольшей мере негативное действие N-ФНА сказалось на жизнеспособности бактерий рода *Azotobacter*, показавшего при этом высокую деградирующую активность в отношении этого соединения. Зависимость эффекта негативного влияния на жизнеспособность от концентрации N-ФНА оказалась слабо выраженной у бактерий родов *Rhizobium* и *Pseudomonas*, а у бактерий родов *Bradyrhizobium* и *Clavibacter* она оказалась существенной.

Ключевые слова: N-фенил-2-нафтиламин, фталаты, почвенные бактерии, биodeградация

Для цитирования: Макарова Л.Е., Мориц А.С., Соколова Н.А. Образование фталатов при деградации N-фенил-2-нафтиламина почвенными бактериями. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2021. Т. 11. N 1. С. 107–115. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-107-115>

Formation of phthalates during the degradation of N-phenyl-2-naphthylamine by soil bacteria

Lyudmila E. Makarova, Anna S. Morits, Natalia A. Sokolova

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS
Irkutsk, Russian Federation

Abstract: N-phenyl-2-naphthylamine (N-PNA) and phthalates are classified as antibiotic substances. The appearance and accumulation of these substances in the biosphere is associated with their technogenic and biogenic origin (metabolites of plants and bacteria). In this article, we compare the degrading action of such soil bacteria as *Rhizobium leguminosarum* bv. viceae, *Bradyrhizobium japonicum*, *Pseudomonas syringae* pv. pisi, *Clavibacter michiganensis* sps. *Sepedonicus* and *Azotobacter chroococcum* against N-PNA. These bacteria differ in their interaction with pea plants (*Pisum sativum* L.) synthesising N-PNA. The degradation products were studied using gas chromatography-mass spectrometry in ethyl acetate extracts obtained from culture liquid media, in which N-PNA at a concentration of 10 μ M and the bacteria under study were introduced. The decrease in the N-PNA concentration in the extracts obtained using ethyl acetate from culture media, in which N-PNA had been added to a concentration of 100 μ M, was monitored following two days of bacterial growth using the methods of high-performance liquid chromatography. It was shown that all the studied bacterial species are capable of degrading N-PNA with the formation of phthalates. The *Rhizobium* bacteria, endosymbionts of pea plants synthesising N-PNA, and free-living nitrogen-fixing bacteria of the *Azotobacter* genus showed the highest degrading activity. It was found that N-PNA reduced the viability of all types of bacteria, although to a varying degree. N-PNA had the most negative effect on the viability of the *Azotobacter* genus, although these

bacteria showed a high degrading action against N-PNA. The dependence between the negative effect of N-PNA on bacterial viability and the N-PNA concentration was mildly pronounced for *Rhizobium* and *Pseudomonas*, although being significant for *Bradyrhizobium* and *Clavibacter*.

Keywords: N-phenyl-2-naphthylamine, phthalates, soil bacteria, biodegradation

For citation: Makarova LE, Morits AS, Sokolova NA. Formation of phthalates during the degradation of N-phenyl-2-naphthylamine by soil bacteria. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(1):107–115. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-107-115>

ВВЕДЕНИЕ

Поиски способов обезвреживания веществ токсического действия на живые системы, которые накапливаются в биосфере и имеют одновременно техногенное и биотическое происхождение, важны и актуальны для поддержания безопасности нашей экологии. N-фенил-2-нафтиламин (N-ФНА) и фталаты относятся к опасным для живых организмов веществам [1–4]. Они производятся предприятиями химической промышленности и находят широкое применение в различных технологиях. N-ФНА известен в научной литературе с 1881 г., это алкалоид необычного строения [5], находит применение в производстве красителей и других органических химических веществ, в качестве антиокислителя резины, полимеров, в смазках, а также в смазочных и трансформаторных маслах, используется в качестве стабилизатора в электроизоляционных эмалях и т.д. Фталаты имеют широкое применение в химической промышленности: в производстве пластмасс в качестве пластификаторов, для получения косметических средств и др. [2–4].

Однако наряду с техногенными существуют и биогенные источники появления N-ФНА и фталатов в биосфере. Биотическое происхождение N-ФНА доказано результатами немногочисленных работ, авторами которых это соединение было обнаружено в тканях нескольких видов наземных и двух представителей водных растений [5–11]. В том числе и мы сообщали о выявлении N-ФНА и фталатов у трех представителей бобовых культур в корнях и в составе компонентов их корневых экссудатов [11]. Сведения о путях биосинтеза N-ФНА в клетках растений и присутствии его у микроорганизмов в литературе в настоящее время отсутствуют.

Фталаты были выявлены в начале 70-х годов прошлого столетия в клетках бактерий и в те же годы у этих организмов установлены пути биострукции фталатов [12]. Позднее были определены предшественники образования данных соединений – полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) [13] и затем установлено, что образование о-фталевой кислоты происходит по одному из двух основных путей биodeградация ПАУ [14, 15]. Деградация фталатов может происходить разными путями [16]. Способность к деградации фталатов чаще выявляли у представителей таких родов бактерий, как *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Sphingo-*

monas, *Micrococcus*, *Burkholderia* [16, 17]. Результаты исследований более поздних лет предполагают возможность и самостоятельного биосинтеза фталатов в клетках некоторых видов бактерий [18]. В клетках некоторых представителей нитчатых грибов основным для биосинтеза бензолного кольца дибутилфталата, по всей вероятности, является путь его образования из углеводов по шикимовокислотному пути [19]. Этот путь биосинтеза фталатов у бактерий пока не исследован, но в бактериальных клетках имеются возможности для синтеза бензолного кольца [20].

В тканях растений, а также в составе их корневых экссудатов фталаты обнаружены сравнительно недавно [11, 21, 22]. В частности, впервые показав наличие диалкиловых о-фталатов в закрытых биологических системах – в культурах клеток и в растениях *in vitro*, авторы работы [22] предоставили достоверное доказательство самостоятельного синтеза этих соединений у растений.

Роль фталатов во взаимодействии между растениями и бактериями, а также в межмикробных взаимоотношениях определяется рядом обстоятельств. Согласно результатам исследований авторов работ [18, 23], эффект воздействия фталатов на бактерии зависит от концентрации, вида алкильных группировок в их молекулах, присоединенных эфирной связью к о-фталевой кислоте, от чувствительности к ним того или иного вида бактерий, и от того, существуют ли бактерии свободно или находятся в состоянии биопленок. Одной из функций фталатов в растениях является защита растений от бактериальных патогенов. При этом характер действия фталатов на фитопатогены видоспецифичен, и функции различных видов фталатных эфиров индивидуальны.

Результаты наших исследований засвидетельствовали негативный эффект N-ФНА на рост использованных нами почвенных бактерий, являющихся представителями родов *Rhizobium*, *Pseudomonas* и *Clavibacter*, и наличие возможности у этих бактерий деградировать данное соединение до фталатов [11, 24]. При деградации N-ФНА в клетках бактерий образовывались нафталиновые группировки, но они не появлялись во внешней среде, где обнаруживались только фталаты. Очевидно, основными конечными продуктами при деструкции N-ФНА были фталаты, которые выявлялись и в клетках, но

преимущественно оказывались в среде роста бактерий. В клетках животных среди мажорных продуктов деградации N-ФНА найдены известный канцероген 2-нафтиламин, и образующиеся при его окислении по атому азота N-гидрокси-2-аминонафталин и 2-нитрозо-нафталин, но не зафиксированы фталаты [25, 26]. Данные факты показывают на существенные отличия путей деградации N-ФНА в клетках животных и бактерий.

В настоящей работе приведены данные, с помощью которых можно оценить возможность деградации N-ФНА у бактерий, вступающих в симбиотические взаимодействия с растением гороха (*Pisum sativum* L.), синтезирующим это соединение, и у бактерий, не инфицирующих данное растение. Проведенное сравнение позволит выявить разницу деградирующей активности в отношении обсуждаемого негативного аллелопатического соединения растения-хозяина у адаптированных, в некоторой мере, к нему бактерий и у бактерий, оказавшихся в контакте с ним случайно. Из пяти видов бактерий два способны проникать в ткани растений гороха (данные приведены ниже). Это бактерии *R. Leguminosarum* bv. *viciae* (мутуалист), нодулирующие корни растений гороха, и бактерии *P. syringae* pv. *pisi* (патоген), инфицирующие его надземные органы. Для исследования были выбраны следующие виды бактерий, не инфицирующие растения гороха: *C. michiganensis* sps. *sepedonicus*, *B. japonicum* и *Az. chroococcum*. Первый из названных видов является патогеном для картофеля. Для бактерий рода *Bradyrhizobium* растением-хозяином является другой вид бобовых культур – растение сои (*Glycine max*), в корнях и корневых экссудатах которой так же, как и у растений гороха, выявлен N-ФНА [11]. *Az. Chroococcum* – свободноживущие азотфиксирующие почвенные бактерии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектами исследования являлись бактерии *R. leguminosarum* bv. *viciae* (штамм RCAM 1022), *B. japonicum* (штамм 626), *P. syringae* pv. *pisi* (штамм 1845), *C. michiganensis* sps. *Sepe-donicus* (Cms. штамм 6889), *Az. chroococcum* (штамм Az d10, № ВКМ В-2272 Д), взятые из коллекции лаборатории физиологии устойчивости растений Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН.

Получение бактериальных культур. Твердые среды для *Rhizobium*, *Pseudomonas* и *Bradyrhizobium* составляли по методике, представленной в работе В.А. Берестецкого¹. Среда для бактерий *Cms*, приготовленная на отваре из клубней картофеля, содержала 10 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л глюкозы, 20 г/л агара (рН = 7,0).

Культивирование бактерий *Azotobacter* проводили на среде Эшби. Бактерии, выращенные на твердых агаросодержащих субстратах, переносили в конические колбы с жидкой минимальной средой, составленной по [27], для адаптации в течение суток, затем в такую же минимальную среду, но содержащую 10 или 100 мкМ N-ФНА. 10 мкМ N-ФНА вносили в среды, где бактерии росли в течение одних суток. В экстрактах из этих сред исследовали продукты деградации вышеуказанного субстрата. При 100 мкМ N-ФНА бактерии росли в течение двух суток, в экстрактах из этих сред определяли оставшееся количество субстрата, чтобы оценить активность деградации указанного соединения бактериями. Титр бактерий в начале роста в обоих вариантах эксперимента составлял $1,5 \cdot 10^3$ кл/мл. Титр определяли исходя из показателей плотности среды с бактериями, измеренной при 675 нм на планшетном спектрофотометре Immunochem-2100 («High Technology Inc.», США).

Изучение жизнеспособности бактерий. Наличие жизнеспособных клеток в культуральных средах контролировали по флуоресценции, позволяющей детектировать наличие мертвых и живых клеток после обработки их последовательно 0,5%-м пропидий йодидом, затем 50 мМ флуоресцеин диацетатом. Для просмотра бактерийсодержащих суспензий использовали инвертированный микроскоп Axio Observer («Carl Zeiss Microscopy», Германия).

Получение экстрактов. Из культуральных сред получали этилацетатные экстракты после отделения сред от бактерий центрифугированием при 8000 g в течение 20 мин при 4 °С и подкисления 2 н HCl до рН = 3,0–4,0. Экстракты упаривали досуха в вакууме в условиях темноты, сухие остатки перерастворяли в небольших объемах этилацетата (для ГХ-МС-анализа) или метанола (для ВЭЖХ-анализа) и помещали в стеклянные бутылочки. Состав продуктов деградации N-ФНА исследовали методом ГХ-МС.

Анализ состава ароматических соединений методом ГХ-МС. Метод ГХ-МС-анализа, использованный для изучения состава соединений, появившихся при деградации N-ФНА, подробно изложен в работе [24]. Для идентификации анализируемых соединений использовали библиотеки масс-спектров NIST08 и WILEY7, а также проводили сравнение с аутентичными образцами бис(2-этилгексил)фталата (диоктилфталат, «Sigma-Aldrich», Германия) и дибутилфталата («Реахим», Россия).

Определение содержания N-ФНА методом ВЭЖХ. Данным методом определяли количество неразрушенного бактериями N-ФНА, по которому сравнивали деградирующую активность у бакте-

¹Берестецкий В.А. Методические рекомендации по получению новых штаммов *Rhizobium leguminosarum* и оценки их эффективности. Л.: ВНИИСХМ, 1976. 31 с.

рий. ВЭЖХ-анализ осуществляли на хроматографе Shimadzu LC-10ATvp с УФ-детектором («Shimadzu», Япония). Условия разделения, детектирования и способы количественных расчетов содержащегося в экстрактах N-ФНА подробно описаны в работе [24].

Статистическая обработка данных. Полученные результаты обрабатывали статистически с вычислением средних значений и стандартных отклонений для них. Эксперименты проводили в трех биологических повторностях.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее на примере бактерий, проникающих в ткани растений гороха – *R. leguminosarum* bv. *viceae* (мутуалист) и *P. syringae* pv. *pisi* (патоген), было показано, что оба вида бактерий способны не только деградировать N-ФНА до фталатов, но и преобразовывать одни виды фталатов в другие, хотя и с разной степенью активности [24]. Результаты, полученные для этих бактерий, частично приведены в таблицах и на рисунке. Вместе с тем было замечено, что у бактерий *C. michiganensis* sps. *sepedonicus*, для которых растения гороха не являются хозяевами, настолько иная реакция на N-ФНА: в начальный период действия на эти бактерии N-ФНА деградирующая активность у них в отношении данного соединения была низкая, но постепенно усиливалась. Следовательно, у бактерий, вступающих в исторически сложившиеся мутуалистические или антагонистические взаимоотношения с растением гороха, метаболические системы более приспособлены к деградации вышеуказанного соединения, а также к воздействию на них продуктов его деградации – фталатов [24].

Для сравнения в табл. 1 приведены новые данные о деградирующей активности в отношении N-ФНА бактерий, которые не способны проникать в ткани гороха. Это бактерии *B. Jarrowii*, нодулирующие корни растений сои, также синтезирующие N-ФНА [11]. Исползованный штамм свободноживущих азотфиксирующих бактерий *Az. chroococcum* устойчив к воздействию дельтометрина – соединения ароматической структуры [28].

Данные, приведенные в табл. 1, показывают, что азотобактер и брадиризобии также способны деградировать N-ФНА с образованием фталатов. Примечательным является то, что в среде с азотобактером 10 мкМ N-ФНА за сутки экспозиции был полностью деградирован до фталатов. В среде с брадиризобиями преобладал N-ФНА, но при этом достаточно высокий процент составляли дибутил- и диоктилфталаты.

Отметим, что при 100 мкМ N-ФНА азотобактер деградировал так же активно, как ризобии. Далее по активности деградации в ряду убывания оказались брадиризобии, псевдомонады и занимающий последнее место в этом ряду кла-

вибактер. На диаграмме представлено процентное содержание N-ФНА в среде с бактериями относительно содержания в культуральной жидкости без бактерий (контроль). Обозначения бактерий такие же, как в табл. 1, данные для бактерий родов *Rhizobium* (Rhiz), *Pseudomonas* (Psp) и *Clavibacter* (Cms) взяты из работы [24].

N-ФНА понижал жизнеспособность всех исследуемых бактерий (табл. 2). Степень этого понижения возрастала с повышением концентрации N-ФНА. Характер реакции на N-ФНА и на повышение его концентрации в ростовых средах у сравниваемых бактерий существенно отличался. Менее всего чувствительными к изменению концентрации от 10 до 100 мкМ N-ФНА оказались ризобии и псевдомонады. В сравнении с контролем у брадиризобий при 10 мкМ N-ФНА снижение жизнеспособности происходило в меньшей степени, чем у представителей четырех других видов бактерий. Однако при изменении концентрации N-ФНА от 10 до 100 мкМ жизнеспособность у брадиризобий снизилась в 7,5 раз. При том же изменении концентрации N-ФНА у клавиактера падение показателя жизнеспособности произошло в меньшей степени – в 2,8 раза. У азотобактера в контроле наблюдался наибольший по сравнению с другими бактериями показатель жизнеспособности, под влиянием N-ФНА он оказался минимальным уже при концентрации N-ФНА 10 мкМ и еще немного снизился при концентрации 100 мкМ.

Сопоставление данных о деградирующей активности в отношении N-ФНА и влиянии последнего на жизнеспособность штаммов сравниваемых видов бактерий позволяет увидеть несоответствия между их показателями. Возможным объяснением будут результаты исследования у представителей этих видов бактерий степени (полноты) деградации изучаемого ароматического соединения. Известно, что многие виды бактерий способны полностью расщеплять ароматические структуры до ациклических кислот, используемых далее в общих метаболических процессах [12–16]. При этом у одних представителей бактериальной микрофлоры ферментные системы, необходимые для деградации ароматических соединений, индуцируются с их появлением в среде, а у других указанные ферменты синтезируются конститутивно [19]. Деградация полициклических соединений осуществляется в основном по двум путям: по пути образования катехола и по фталатному пути [5, 14]. Фталатный путь при этом может завершаться расщеплением протокатеховой кислоты до β -карбоксис-сис-сис-мукона при участии фермента протокатехоат оксигеназы (ЕС 1.13.11.3) [16]. Наличие возможности у бактерий для более полного расщепления ПАУ позволяет использовать данные соединения в качестве трофического материала. С другой стороны, отдельные этапы процессов

расщепления ПАУ требуют затрат энергии [13, 14]. Не исключено, что в случае, когда ПАУ является единственным углеводородным источ-

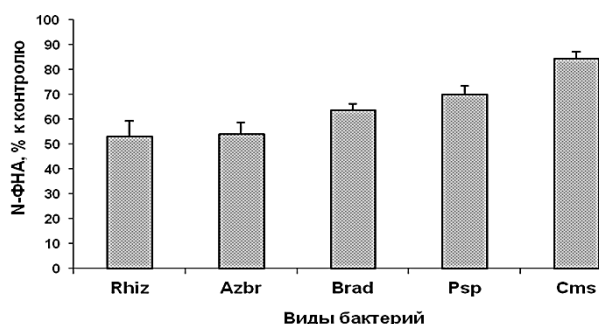
ником питания для бактерий, то прохождение полного цикла их расщепления может приводить к снижению их жизнеспособности.

Таблица 1. Состав продуктов деструкции 10 мкМ N-фенил-2-нафтиламина в этилацетатных экстрактах из ростовой среды бактерий после экспозиции в течение суток

Table 1. Composition of 10 µM N-phenyl-2-naphthylamine destruction products in ethyl acetate extracts from bacteria growth medium after 1 day of exposure

Соединение	$t_{уд.}$, мин	Ver., %	S, %				
			Rhiz*	Psp*	Cms*	Azbr	Brad
Фталевый ангидрид	8,0	50,5	0,3	0,2	0,7	–	0,4
Диэтилфталат	14,1	35,0	–	–	–	8,4	–
Бутилтетрадецилфталат	19,7	13,3	–	–	2,3	–	1,6
Бутилоктилфталат	19,9	11,8	–	–	–	3,3	–
Дибутилфталат	21,6	29,3	3,2	74,0	19,3	100	41,4
N-фенил-2-нафтиламин	26,6	47,5	30,2	100	100	–	100
Диоктилфталат	31,7	71,5	100	60,1	–	57,7	31,2
Бс(7-метилоктил)фталат	35,0	65,9	1,2	–	–	–	–

Примечание. $t_{уд.}$ – время удерживания; Ver. – вероятность, %; S – относительная площадь пика, %, для бактерий: Rhiz – *R. leguminosarum* bv. *viceae*; Psp – *P. syringae* pv. *pisi*; Cms – *C. michiganensis* sps. *sepedonicus*; Azbr – *Az. chroococcum*; Brad – *B. japonicum*. Для S приведены средние показатели, стандартные отклонения для которых не превышали 10%. * – данные взяты из работы [24].



Содержание N-ФНА в среде роста бактерий через двое суток экспозиции

N-PNA content in the bacteria growth medium after 2 days of exposure

Для суждения о возможности полной деградации N-ФНА у представителей исследуемых видов бактерий пока недостаточно данных. Сведения, приведенные в сообщении на Всероссийской научной конференции (2019 г.) [29], свидетельствуют о конститутивном синтезе протокатехоат оксигеназы в клетках *B. japonicum* и *C. Michiganensis* sps. *sepedonicus*, а у *R. Leguminosarum* bv. *viceae* и *P. syringae* pv. *pisi* синтез данного фермента может индуцироваться нарингенином. У бактерий *Az. chroococcum* активность протокатехоат оксигеназы выявлена нами как при их росте без N-ФНА, так и в его присутствии (данные не опубликованы). Протокатехоат оксигеназа из *Az. vinelandii* была очищена и изучена после выращивания этих бактерий на среде с п-гидроксibenзоатом [30].

Таблица 2. Процент жизнеспособных клеток в составе аутоагрегатов бактерий, росших в течение суток в планктонных культурах без внесения (контроль) и с внесением в среду 10 и 100 мкМ N-ФНА

Table 2. Percentage of viable cells in the bacterial self-aggregates after 1 day grew in planktonic cultures in the absence (control) and in the presence of 10 and 100 µM N-PNA in the medium

Вариант	Вид бактерий				
	Rhiz*	Psp*	Cms*	Brad	Azbr
Контроль	8,2±1,7	15,0±4,7	17,5±3,5	11,2±3,1	18,8±6,3
10 мкМ N-ФНА	3,2±1,2	4,8±2,2	11,0±3,2	9,8±5,1	1,1±0,5
100 мкМ N-ФНА	3,0±0,7	3,5±1,2	4,0±1,6	1,3±0,5	0,8±0,3

Обозначения бактерий те же, что и в табл. 1. * – данные взяты из работы [24].

ВЫВОДЫ

1. Исследованные штаммы почвенных бактерий *R. leguminosarum* bv. *viceae*, *B. Japonicum*, *P. syringae* pv. *pisi*, *C. michiganensis* sps. *Sepe-donicus*, *Az. chroococcum* способны деградировать с образованием фталатов негативное аллелопатическое соединение N-фенил-2-нафтиламин (N-ФНА), появление которого в почве возможно вследствие его техногенного (продукты химической промышленности) и биогенного про-

исхождения (источники – растения, его синтезирующие).

2. Наиболее высокую деградирующую активность в отношении N-ФНА показали бактерии *Rhizobium*, вступающие в эндосимбиотические отношения с синтезирующими вышеназванное соединение растениями гороха, и свободноживущие азотфиксирующие бактерии рода *Azotobacter*.

3. N-ФНА снижал жизнеспособность всех

штаммов бактерий, но в разной степени. В наибольшей мере негативное действие N-ФНА сказалось на жизнеспособности бактерий рода *Azotobacter*, показавшего при этом высокую деградирующую активность в отношении указанного соединения. Зависимость эффекта негативно-

го влияния на жизнеспособность от концентрации N-ФНА оказалась слабо выраженной у бактерий родов *Rhizobium* и *Pseudomonas*, а у бактерий родов *Bradyrhizobium* и *Clavibacter* она оказалась существенной.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Altenburger R., Brack W., Greco W.R., Grott M., Jung K., Ovari A., et al. On the mode of action of N-phenyl-2-naphthylamine in plants // *Environmental Science & Technology*. 2006. Vol. 40. Issue 19. P. 6163–6169. <https://doi.org/10.1021/es060338e>
2. Hauser R., Calafat A.M. Phthalates and human health // *Occupational and Environmental Medicine*. 2005. Vol. 62. Issue 11. P. 806–818. <https://doi.org/10.1136/oem.2004.017590>
3. Mankidy R., Wiseman S., Ma H., Giesy J.P. Biological impact of phthalates // *Toxicology Letters*. 2013. Vol. 217. Issue 1. P. 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.11.025>
4. Dobrzynska M.M. Phthalates – widespread occurrence and the effect on male gametes. Part 1. General characteristics, sources and human exposure // *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*. 2016. Vol. 67. Issue 2. P. 97–103.
5. Yu R., Li B.-G., Ye Q., Zhang G.-I. A novel alkaloid *Mitrephora maingayi* // *Natural Product Research*. 2005. Vol. 19. Issue 4. P. 359–362. <https://doi.org/10.1080/14786410412331280104>
6. Султанходжаев М.Н., Таджибаев М.М. Фенил-β-нафтиламин из трех видов растений // *Химия природных соединений*. 1976. Т. 12. Вып. 3. С. 406.
7. Евстратова Р.И., Запесочная Г.Г. N-фенил-2-нафтиламин из *Centaurea salonitana* // *Химия природных соединений*. 1977. Т. 13. Вып. 4. С. 582.
8. Жанаева Т.А., Кривошекова О.Е., Семенов А.А., Минаева В.Г. N-фенил-2-нафтиламин из цветков *Vupleurum aureum* // *Химия природных соединений*. 1989. Т. 25. Вып. 3. С. 377.
9. Shi D.Y., Han L.J., Sun J., Wang Y., Yang Y.C., Shi J.G., et al. Chemical constituents from marine alga *Chaetomorpha basiretorsa* // *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2005. Vol. 30. Issue 5. P. 347–350.
10. Wu Z.B., Zhang S.H., Wu X.H., Cheng S.P., He F. Allelopathic interactions between *Potamogeton maackia* and *Microcystis aeruginosa* // *Allelopathy Journal*. 2007. Vol. 20. Issue 2. P. 327–338.
11. Makarova L.E., Smirnov V.I., Klyba L.V., Petrova I.G., Dudareva L.V. Role of allelopathic compounds in the regulation and development of legume-rhizobial symbiosis // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2012. Vol. 48. Issue 4. P. 355–362. <https://doi.org/10.1134/S0003683812030064>
12. Keyser P., Pujar B.G., Eaton R.W., Ribbons D.W. Biodegradation of phthalates and their esters by bacteria // *Environmental Health Perspectives*. 1976. Vol. 18. P. 159–166. <https://doi.org/10.1289/ehp.7618159>
13. Kiyohra H., Nagao K. The catabolism of phenantrene and naphthalene by bacteria // *The Journal of General Microbiology*. 1978. Vol. 105. Issue 1. P. 69–75. <https://doi.org/10.1099/00221287-105-1-69>
14. Puntus I.F., Filonov A.E., Akhmetov L.I., Karpov A.V., Boronin A.M. Phenanthrene degradation by bacteria of the genera *Pseudomonas* and *Burkholderia* in model soil systems // *Microbiology*. 2008. Vol. 77. Issue 1. P. 7–15. <https://doi.org/10.1007/s11021-008-1002-9>
15. Seo J.-S., Keum Y.-S., Li Q.X. Bacterial degradation of aromatic compounds // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2009. Vol. 6. Issue 1. P. 279–309. <https://doi.org/10.3390/ijerph6010278>
16. Liang D.-W., Zhang T., Fang H.H.P., He J. Phthalates biodegradation in the environment // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008. Vol. 80. Issue 2. P. 183–198. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1548-5>
17. Eaton R.W., Ribbons D.W. Metabolism of dibutylphthalate and phthalate by *Micrococcus* sp. strain 12B // *Journal of Bacteriology*. 1982. Vol. 151. Issue 1. P. 48–57. <https://doi.org/10.1128/JB.151.1.48-57.1982>
18. Al-Bari M.A.A., Sayeed M.A., Rahman M.S., Mossadik M.A. Characterization and antimicrobial activities of a phthalic acid derivative produced by *Streptomyces bangladeshensis* a novel species collected in Bangladesh // *Research Journal of Medicine and Medical Sciences*. 2006. Vol. 1. Issue 2. P. 77–81.
19. Babu B., Wu J.-T. Production of phthalate esters by nuisance freshwater algae and cyanobacteria // *Science of the Total Environment*. 2010. Vol. 408. Issue 21. P. 4969–4975. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.07.032>
20. Parke D., Ornston L.N. Enzymes of the β-ketoadipate pathway are inducible in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. and constitutive in *Bradyrhizobium* spp. // *Journal of Bacteriology*. 1986. Vol. 165. Issue 1. P. 288–292. <https://doi.org/10.1128/jb.165.1.288-292.1986>
21. Husein A.I., Ali-Shtayeh M.S., Jamous R.M., Jondi W.J., Zatar N.A.-A. Phthalate derivatives are naturally occurring in *Arum palaestinum* // *International Journal of Current Research and Academic Review*. 2014. Vol. 2. Issue 9. P. 195–203.
22. Enikeev A.G., Semenov A.A., Permyakov

A.V., Sokolova N.A., Gamborg K.Z., Dudareva L.V. Biosynthesis of ortho-phthalic acid esters in plant and cell cultures // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2019. Vol. 55. Issue 3. P. 294–297. <https://doi.org/10.1134/S0003683819020066>

23. Shafikova T.N., Omelichkina Y.V., Enikeev A.G., Boyarkina S.V., Gvildis D.E., Semenov A.A. Ortho-phthalic acid esters suppress the phytopathogen capability for biofilm formation // *Doklady Biological Sciences*. 2018. Vol. 480. Issue 3. P. 107–109. (In Russian) <https://doi.org/10.1134/S0012496618030092>

24. Makarova L.E., Morits A.S., Sokolova N.A., Petrova I.G., Semenov A.A., Dudareva L.V., et al. Degradation of N-phenyl-2-naphthylamine by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, and *Clavibacter michiganensis* sp. *sepedonicus* bacteria // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2020. Vol. 56. Issue 2. P. 202–210. <https://doi.org/10.1134/S0003683820010123>

25. Weiss T., Bolt H.M., Schlüter G., Koslitz S., Taeger D., Welge P., et al. Metabolic dephenylation of the rubber antioxidant N-phenyl-2-naphthylamine to carcinogenic 2-naphthylamine in rats // *Archives of Toxicology*. 2013. Vol. 87. Issue 7. P. 1265–1272. <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-013-1025-5>

26. Marek E.M., Koslitz S., Weiss T., Fartasch M., Schlüter G., Kafferlein H.U., et al. Quantification of N-phenyl-2-naphthylamine by gas chromatography and isotope-dilution mass spectrometry and its percutaneous absorption ex vivo under workplace condi-

tions // *Archives of Toxicology*. 2017. Vol. 91. Issue 11. P. 3587–3596. <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-017-2046-2>

27. Hartwig U.A., Joseph C.M., Phillips D.A. Flavonoid released naturally from alfalfa seeds enhance growth rate of *Rhizobium meliloti* // *Plant Physiology*. 1991. Vol. 95. Issue 3. P. 797–803. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.95.3.797>

28. Пат. № 2231546, Российская Федерация. Штамм бактерий AZ D10 ВКМ В-2272, обладающий ростстимулирующими свойствами и устойчивый к дельтаметрину / О.Б. Вайшля, А.А. Бондаренко; патентообладатель Томский государственный университет; заявл. 28.08.2002; опубл. 27.06.2004.

29. Макарова Л.Е., Мориц А.С. Изучение участия протокатехоат оксигеназы в деградации N-фенил-2-нафтиламина и нарингенина у *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, *Bradyrhizobium japonicum* и *Clavibacter michiganensis* ssp. *Sepedonicus* // Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания: тез. докл. Всерос. науч. конф. с междунар. участием (Иркутск, 04–07 июня 2019 г.). Иркутск: Изд-во ИГУ, 2019 г. С. 72–74.

30. Durham D.R., Stirling L.A., Ornston L.N., Perry J.J. Intergeneric evolutionary homology revealed by the study of protocatechuate 3,4-dioxygenase from *Azotobacter vinelandii* // *Biochemistry*. 1980. Vol. 19. Issue 1. P. 149–155. <https://doi.org/10.1021/bi00542a023>

REFERENCES

1. Altenburger R, Brack W, Greco WR, Grott M, Jung K, Ovari A, et al. On the mode of action of N-phenyl-2-naphthylamine in plants. *Environmental Science & Technology*. 2006;40(19):6163–6169. <https://doi.org/10.1021/es060338e>

2. Hauser R, Calafat AM. Phthalates and human health. *Occupational and Environmental Medicine*. 2005;62(11):806–818. <https://doi.org/10.1136/oem.2004.017590>

3. Mankidy R, Wiseman S, Ma H, Giesy JP. Biological impact of phthalates. *Toxicology Letters*. 2013;217(1):50–58. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.11.025>

4. Dobrzynska MM. Phthalates – widespread occurrence and the effect on male gametes. Part 1. General characteristics, sources and human exposure. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*. 2016;67(2):97–103.

5. Yu R, Li B-G, Ye Q, Zhang G-l. A novel alkaloid *Mitrephora maingayi*. *Natural Product Research*. 2005;19(4):359–362. <https://doi.org/10.1080/14786410412331280104>

6. Sultankhodzhaev MN., Tadzhibaev MM. N-phenyl-β-naphthylamine from three species of plants. *Khimiya prirodnikh soedinenii*. 1976;12(3):406. (In Russian)

7. Evstratova R.I., Zapesochaya G.G. N-phenyl-

β-naphthylamine from *Centaurea salonitana*. *Khimiya prirodnikh soedinenii*. 1977;13(4):582. (In Russian)

8. Zhanaeva TA, Krivoshchekova OE, Semenov AA, Minaeva VG. N-phenyl-2-naphthylamine from *Bupleurum aureum* flowers. *Khimiya prirodnikh soedinenii*. 1989;25(3):377. (In Russian)

9. Shi DY, Han LJ, Sun J, Wang Y, Yang YC, Shi JG, et al. Chemical constituents from marine alga *Chaetomorpha basiretorta*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* = China Journal of Chinese Materia Medica. 2005;30(5):347–350. (In Chinese)

10. Wu ZB, Zhang SH, Wu XH, Cheng SP, He F. Allelopathic interactions between *Potamogeton maackia* and *Microcystis aeruginosa*. *Allelopathy Journal*. 2007;20(2):327–338.

11. Makarova LE, Smirnov VI, Klyba LV, Petrova IG, Dudareva LV. Role of allelopathic compounds in the regulation and development of legume-rhizobial symbiosis. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2012;48(4):355–362. <https://doi.org/10.1134/S0003683812030064>

12. Keyser P., Pujar B.G., Eaton R.W., Ribbons D.W. Biodegradation of phthalates and their esters by bacteria // *Environmental Health Perspectives*. 1976. Vol. 18. P. 159–166. <https://doi.org/10.1289/ehp.7618159>

13. Kiyohra H, Nagao K. The catabolism of phen-

antrene and naphthalene by bacteria. *The Journal of General Microbiology*. 1978;105(1):69–75. <https://doi.org/10.1099/00221287-105-1-69>

14. Puntus IF, Filonov AE, Akhmetov LI, Karpov AV, Boronin AM. Phenanthrene degradation by bacteria of the genera *Pseudomonas* and *Burkholderia* in model soil systems. *Microbiology*. 2008;77(1):7–15. <https://doi.org/10.1007/s11021-008-1002-9>

15. Seo J-S, Keum Y-S, Li QX. Bacterial degradation of aromatic compounds. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2009;6(1):279–309. <https://doi.org/10.3390/ijerph6010278>

16. Liang D-W, Zhang T, Fang HHP, He J. Phthalates biodegradation in the environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008;80(2):183–198. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1548-5>

17. Eaton RW, Ribbons DW. Metabolism of dibutylphthalate and phthalate by *Micrococcus* sp. strain 12B. *Journal of Bacteriology*. 1982;151(1):48–57. <https://doi.org/10.1128/JB.151.1.48-57.1982>

18. Al-Bari MAA, Sayeed MA, Rahman MS, Mosadik MA. Characterization and antimicrobial activities of a phthalic acid derivative produced by *Streptomyces bangladeshiensis* a novel species collected in Bangladesh // *Research Journal of Medicine and Medical Sciences*. 2006;1(2):77–81.

19. Babu B, Wu J-T. Production of phthalate esters by nuisance freshwater algae and cyanobacteria. *Science of the Total Environment*. 2010;408(21):4969–4975. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.07.032>

20. Parke D, Ornston LN. Enzymes of the β -ketoadipate pathway are inducible in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. and constitutive in *Bradyrhizobium* spp. *Journal of Bacteriology*. 1986;165(1):288–292. <https://doi.org/10.1128/jb.165.1.288-292.1986>

21. Husein AI, Ali-Shtayeh MS, Jamous RM, Jondi WJ, Zatar NA-A. Phthalate derivatives are naturally occurring in *Arum palaestinum*. *International Journal of Current Research and Academic Review*. 2014;2(9):195–203.

22. Enikeev AG, Semenov AA, Permyakov AV, Sokolova NA, Gamburg KZ, Dudareva LV. Biosynthesis of ortho-phthalic acid esters in plant and cell cultures. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2019;55(3):294–297. <https://doi.org/10.1134/S0003683819020066>

23. Shafikova TN, Omelichkina YV, Enikeev AG, Boyarkina SV, Gvildis DE, Semenov AA. Ortho-phthalic acid esters suppress the phytopathogen capability for biofilm formation. *Doklady Biological Sci-*

ences. 2018;480(3):107–109. <https://doi.org/10.1134/S0012496618030092>

24. Makarova LE, Morits AS, Sokolova NA, Petrova IG, Semenov AA, Dudareva LV, et al. Degradation of N-phenyl-2-naphthylamine by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, and *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* bacteria. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2020;56(2):202–210. <https://doi.org/10.1134/S0003683820010123>

25. Weiss T, Bolt HM, Schlüter G, Koslitz S, Taeger D, Welge P, et al. Metabolic dephenylation of the rubber antioxidant N-phenyl-2-naphthylamine to carcinogenic 2-naphthylamine in rats // *Archives of Toxicology*. 2013;87(7):1265–1272. <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-013-1025-5>

26. Marek EM, Koslitz S, Weiss T, Fartasch M, Schlüter G, Käßler HU, et al. Quantification of N-phenyl-2-naphthylamine by gas chromatography and isotope-dilution mass spectrometry and its percutaneous absorption ex vivo under workplace conditions. *Archives of Toxicology*. 2017;91(11):3587–3596. <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-017-2046-2>

27. Hartwig UA, Joseph CM, Phillips DA. Flavonoid released naturally from alfalfa seeds enhance growth rate of *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiology*. 1991;95(3):797–803. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.95.3.797>

28. Vajshlja OB, Bondarenko AA. Strain of bacterium AZ D10 VKM B-2272 eliciting growth-stimulating properties and resistant to deltamethrin. Patent RF no. 2231546; 2002 (In Russian)

29. Makarova LE, Morits AS. Study of protocatechoate oxygenase participation in N-phenyl-2-naphthylamine and naringenin degradation in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, *Bradyrhizobium japonicum* and *Clavibacter michiganensis* ssp. *Sepedonicus*. In: Mekhanizmy adaptatsii mikroorganizmov k razlichnym usloviyam sredy obitaniya: tezis dokladov Vserossiiskoi nauchnoi konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem = Adaptation mechanisms of microorganisms to various environmental conditions: Proceedings of the All-Russian Scientific Conference with International Participation. 04–07 June 2019, Irkutsk. Irkutsk: Irkutsk State University; 2019, p. 72–74 (In Russian)

30. Durham DR, Stirling LA, Ornston LN, Perry JJ. Intergeneric evolutionary homology revealed by the study of protocatechuate 3,4-dioxygenase from *Azotobacter vinelandii*. *Biochemistry*. 1980;19(1):149–155. <https://doi.org/10.1021/bi00542a023>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Макарова Людмила Евгеньевна,
д.б.н., главный научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Lyudmila E. Makarova,
Dr. Sci. (of Biology), Chief Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,

Российская Федерация,
✉ e-mail: makarova@sifibr.irk.ru

Russian Federation,
✉ e-mail: makarova@sifibr.irk.ru

Мориц Анна Сергеевна,
ведущий инженер,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация

Anna S. Morits,
Lead Engineer,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation

Соколова Наталья Александровна,
ведущий технолог,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация

Natalia A. Sokolova,
Lead Technologist,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation

Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests re-
garding the publication of this article.

*Все авторы прочитали и одобрили оконча-
тельный вариант рукописи.*

*The final manuscript has been read and approved
by all the co-authors.*

*Поступила в редакцию 09.03.2020.
Одобрена после рецензирования 26.04.2020;
Принята к публикации 28.02.2021.*

*The article was submitted 09.03.2020.
Approved after reviewing 26.04.2020.
Accepted for publication 28.02.2021.*

Оригинальная статья / Original article

УДК 577.2

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-116-125>



Молекулярно-генетическая идентификация штаммов микроорганизмов, выделенных из активного ила, на основе анализа нуклеотидных последовательностей 16s rRNA гена

© Е.А. Иванчиков, А.Т. Бубеев, В.Ж. Цыренов,
А.В. Арбатская

Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления,
г. Улан-Удэ, Российская Федерация

Резюме: Проведена молекулярно-генетическая идентификация четырех штаммов бактерий, выделенных из активного ила городских очистных сооружений г. Улан-Удэ и промышленного предприятия ОАО «Селенгинский ЦКК» (пгт. Селенгинск). Идентификация штаммов бактерий проводилась на капиллярном секвенаторе марки ABI 3130XL Genetic Analyser (Applied Biosystems) с использованием 16S праймеров 27F и 1492R в центре коллективного пользования «Геномика» Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск. Результаты получены с помощью метода определения прямой нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16S рРНК с последующим сравнением нуклеотидной идентичности с последовательностями, депонированными в международной базе данных GenBank. Определены штаммы бактерий, выделенных из активного ила: штамм В 1.1 по базе данных GenBank соответствует штамму *Paenibacillus dendritiformis* strain P411 (идентичность – 99,93%), штаммы В 1.2 и В 1.3 соответствуют штамму *Bacillus licheniformis* strain PB399 (идентичность – 86 и 100% соответственно), штамм Р 1.1 соответствует штамму *Paenibacillus polymyxa* strain ISSDS-85 (идентичность – 99,86%). Определены биохимические свойства идентифицированных штаммов: амиполитическая, протеолитическая и липолитическая активность; способность к ферментации углеводов на средах Гисса; способность к образованию аммиака, мочевины и восстановлению нитратов. Данные штаммы микроорганизмов, выделенных из активного ила, могут оказаться перспективными для деструкции загрязнителей сточной воды. На их основе предполагается создание консорциума микроорганизмов для деструкции белковых и жировых загрязнителей сточной воды.

Ключевые слова: активный ил, микроорганизмы, молекулярно-генетическая идентификация, сточная вода, очистные сооружения

Благодарности: Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-48-030019).

Для цитирования: Иванчиков Е.А., Бубеев А.Т., Цыренов В.Ж., Арбатская А.В. Молекулярно-генетическая идентификация штаммов микроорганизмов, выделенных из активного ила, на основе анализа нуклеотидных последовательностей 16s rRNA гена. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2021. Т. 11. N 1. С. 116–125. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-116-125>

Molecular-genetic identification of microorganism strains isolated from activated sludge based on an analysis of nucleotide sequences of the 16s rRNA gene

Egor A. Ivanchikov, Alexey T. Bubeev, Vladimir Zh. Tsyrenov,
Aleksandra V. Arbatsksaya

East Siberia State University of Technology and Management,
Ulan-Ude, Russian Federation

Abstract: A molecular-genetic identification of four bacterial strains isolated from activated sludge of urban wastewater treatment plants (Ulan-Ude) and the industrial enterprise OJSC “Selenginsky Pulp and Paper Mill” (Selenginsk) was carried out. Bacterial strains were identified by a capillary sequencer ABI 3130XL Ge-

netic Analyzer (Applied Biosystems) using 16S primers 27F and 1492R at the Genomics Collective Use Center of the Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk. The results were obtained using the method of determination of the direct nucleotide sequence of a 16S rRNA fragment followed by comparison of the nucleotide identity with the sequences deposited in the international database GenBank. Bacterial strains isolated from activated sludge were identified according to the GenBank database: strain B 1.1 corresponds to *Paenibacillus dendritiformis* strain P411 (similarity 99.93%), strains B 1.2 and B 1.3 correspond to *Bacillus licheniformis* strain PB399 (similarity 86 and 100%, respectively), strain P 1.1 corresponds to the *Paenibacillus polymyxa* strain ISSDS-85 (similarity 99.86%). The biochemical properties of the identified strains were determined: amylolytic, proteolytic and lipolytic activity; the ability to ferment carbohydrates in Hiss' nutrient medium; the ability to form ammonia, urea and nitrate reduction. The bacterial strains isolated from activated sludge may be promising for the destruction of wastewater pollutants. On their basis, it is planned to create a consortium of microorganisms for the destruction of protein and fatty pollutants in wastewater.

Keywords: activated sludge, microorganisms, molecular genetic identification, waste water, treatment facilities

Acknowledgments: The study was carried out with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research within the framework of the research project No. 18-48-030019.

For citation: Ivanchikov EA, Bubeev AT, Tsyrenov VZh, Arbatskaya AV. Molecular-genetic identification of microorganism strains isolated from activated sludge based on an analysis of nucleotide sequences of the 16s rRNA gene. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(1):116–125. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-116-125>

ВВЕДЕНИЕ

Одним из приоритетных направлений борьбы с загрязнением окружающей среды является применение биотехнологических методов. Известно, что для очистки сточных вод широко используется природный активный ил, представляющий собой сложно структурированную систему, состоящую преимущественно из микроорганизмов, связанных между собой симбиотическими отношениями и разнообразными метаболическими процессами [1–8]. Показано, что одни микроорганизмы способны потреблять продукты реакций других микроорганизмов. В результате поэтапного действия микроорганизмов создается замкнутый цикл с образованием простых соединений. Рассмотрев основные группы загрязнителей сточных вод, условия роста и пути метаболизма выбранных культур микроорганизмов и возможность их совместного культивирования, можно создать искусственные биологические консорциумы в целях более эффективной утилизации загрязнителей [9].

Для определения процессов, происходящих внутри активного ила, необходимо изучать его видовой состав. В настоящее время при изучении видового состава микроорганизмов активного ила используются стандартные методы идентификации, которые не всегда позволяют установить родовую принадлежность микроорганизмов ввиду их близкого родства и общности свойств. В то же время эти методы являются достаточно трудоемкими и длительными по времени¹ [10–14]. Для того чтобы избежать ошибки в

определении видовой и родовой принадлежности исследуемых культур активного ила стандартными методами, необходимо проводить молекулярно-генетическую идентификацию, на основании результатов которой возможно выделение культур микроорганизмов, обладающих активностью по отношению к определенным группам загрязнителей, что поможет в разработке конкретных технологий очистки сточных вод [15–18].

Целью работы являлась молекулярно-генетическая идентификация микроорганизмов, выделенных из активного ила городских очистных сооружений г. Улан-Удэ и промышленного предприятия ОАО «Селенгинский ЦКК» (пгт. Селенгинск), способных биотрансформировать компоненты модельной сточной воды с использованием анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объекты исследования – чистые штаммы бактерий рода *Bacillus*, выделенные из активного ила городских очистных сооружений г. Улан-Удэ и промышленного предприятия ОАО «Селенгинский ЦКК» (пгт. Селенгинск). Культуры выращивали на мясо-пептонном агаре (Государственный научный центр прикладной биологии и биотехнологии, пгт. Оболенск, Московская обл.) в течение двух суток при температуре 37 °С.

Стандартными микробиологическими способами проводили исследование следующих биохимических свойств выделенных штаммов: фер-

¹Лабинская А.С., Блинкова Л.П., Ещина А.С., Булава Г.В., Вертиев Ю.В., Винокуров А.Е. [и др.]. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований: учеб. пособие; 4-е изд., стер. СПб.: Лань, 2020. 588 с.

ментативная активность (амилолитическая, протеолитическая, липолитическая), способность к ферментации углеводов на средах Гисса, способность к образованию аммиака, мочевины и восстановлению нитратов¹.

Идентификация штаммов бактерий проводилась с помощью BLAST-анализа гена 16S рПНК. Секвенирование по Сэнгеру проводилось в центре коллективного пользования «Геномика» Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (г. Новосибирск) на капиллярном секвенаторе ABI 3130XL Genetic Analyser (Applied Biosystems) с использованием 16S праймеров 27F [19] и 1492R [20].

Секвенограммы всех исследуемых образцов ДНК проанализированы на предмет гомологии/идентичности с помощью программы BLAST базы данных GenBank и классификатора базы 16S рибосомальных последовательностей – RDB.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Основными компонентами бытовых и промышленных сточных вод г. Улан-Удэ и ОАО «Селенгинский ЦКК» являются белковые и жировые соединения. Задача исследования – подтвердить или опровергнуть предположение, что штаммы, выделенные из активного ила, могут быть использованы в качестве деструкторов данных веществ.

Биохимические свойства четырех выделенных штаммов определяли по продуктам реакции гидролиза и ферментативной активности. Полученные результаты позволили три штамма отнести к роду *Bacillus*, им присвоили обозначения В 1.1, В 1.2 и В 1.3. Родовую принадлежность четвертой культуры идентифицировать не удалось, ей было присвоено обозначение Р 1.1. Результаты представлены в табл. 1.

По результатам исследования амилолитической, протеолитической и липолитической активности штаммы В 1.1, В 1.2 и В 1.3 показали положительную реакцию, штамм Р 1.1 – отрицательную. Можно предположить, что штаммы В 1.1, В 1.2 и В 1.3 способны к деструкции белковых и жировых соединений, штамм Р 1.1 – нет.

Результаты исследований способности к ферментации углеводов на средах Гисса показали, что штаммы В 1.1, В 1.2 и В 1.3 не способны сбраживать лактозу и сорбит в отличие от штамма Р 1.1, который сбраживает лактозу и частично сорбит. В целом использование данных штаммов для деструкции загрязнителей в сточных водах позволит охватить широкий спектр углеводов.

Результаты эксперимента по исследованию способности к образованию аммиака, мочевины и восстановлению нитратов показали, что штамм В 1.1 образует аммиак и способен восстанавливать нитраты, штаммы В 1.2 и В 1.3 образуют аммиак и мочевину, штамм Р 1.1 образует мочевину и восстанавливает нитраты.

Таким образом, по полученным результатам можно предположить, что выделенные штаммы обладают способностью к деструкции белковых и жировых соединений, а также углеводов и азотистых соединений (см. табл. 1). Для дальнейшего изучения выделенных штаммов необходимо было провести их молекулярно-генетическую идентификацию.

Генетическая идентификация полученных штаммов осуществлялась методом определения прямой нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16S рПНК с последующим сравнением нуклеотидной идентичности с последовательностями, депонированными в международной базе данных GenBank, с помощью программы BLAST и классификатором базы 16S рибосомальных последовательностей – RDB.

Таблица 1. Результаты исследования биохимических свойств выделенных штаммов
Table 1. Biochemical properties of isolated strains

Биохимические свойства	Штамм			
	В 1.1	В 1.2	В 1.3	Р 1.1
Амилолитическая активность	+	+	+	-
Протеолитическая активность	+	+	+	-
Липолитическая активность	+	±	±	-
Сбраживание:				
лактозы	-	-	-	+
маннита	+	±	±	-
глюкозы	+	+	+	+
сахарозы	+	+	+	±
сорбита	-	-	-	±
мальтозы	+	+	+	+
Образование:				
аммиака	+	+	+	-
мочевины	-	+	+	+
Восстановление нитратов	+	-	-	+

Примечание. «-» – 95 и более процентов отрицательная реакция; «+» – 95 и более процентов положительная реакция, «±» – 50% положительная реакция.

Методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) амплифицированы фрагменты гена 16S рРНК, размером около 1500 п.н. Продукты ПЦР амплификации использованы для определения нуклеотидной последовательности.

Фрагмент гена 16S рРНК для каждого образца секвенирован с двух сторон по методу Сэнгера и проанализирован на автоматическом геномном анализаторе ABI3130XL. Полученные после геномного анализатора сшитые из секвеннограмм последовательности образцов представлены на рис. 1, 3, 4 и 7.

На рис. 1 представлена секвеннограмма штамма В 1.1.

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей с помощью программы BLAST

показал, что структура штамма В 1.1 совпадает со структурой *Paenibacillus dendritiformis* strain P411 16S ribosomal RNA gene и *Paenibacillus dendritiformis* partial 16S rRNA gene, strain Marseille-P568.

Классификатор RDP показал следующую «оригинальную» структуру фрагмента 16S рРНК (рис. 2).

Как видно из рис. 2, штамм В 1.1 по классификатору RDP и GenBank определен как штамм *Paenibacillus dendritiformis* partial P411, который характеризуется более высоким уровнем вариабельности генов 16S рРНК.

На рис. 3 и 4 представлены секвеннограммы штаммов В 1.2 и В 1.3 соответственно.

```
CCTTCGCGCGTGGCTCCTTGCCTGCTTACCCACCGACTTCGGGTGTTGTAACCTCTCGTGTGTGACGGCGGTGTGTACAAGACCGGGAA  
CGTATTCACCGCGCGATCTGATCCGCGATTACTAGCAATTCGACTTCATGCAGGCGAGTTGACGCTGCAATCCGAAGTGAAGTGGCTTT  
TTAGGATTCGCTCCGCTCGCGCTTCCGTTGTACAGCCATTGTAGTACGTGTGTAGCCAGGTCAAGGGGCGATGATGATTTGA  
CGTCATCCCACTCTCTCCGTTTGTACCGGCGAGTCTAGAGTGCCTCACTCAAGTAAAGTTAAGGGTTCGCTCGTTG  
CGGGACTTAACCAACATCTACGACGAGCTGACGACCACTGACCACTGTGCACTCTGCCCCGAAGGGAAGCCCTATCTAGGAC  
GGTCAGAGGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCTTGTGCAATTAACACCATCTCACTGCTTGTGCGGGTCCCGCTCAATTCCT  
TTGAGTTTACGCTTTCGCGACGCTACTCCCGAGGGAATGCTTAATGTGTTAACTTCGGCACCAAGGGTATCGAAACCCCTAACCTAGCAT  
TCATCGTTTACGCGGTGACTACCAAGGTATCTAATCTGTTTGTCTCCACGCTTCGCGCTCAGCGTCACTTACAGCCAGAAAGTCGCC  
TTGCCACTGTGTCTCCACATCTCTACGCTTTCACCGCTACACGCTGGAATTCACCTTCTCTCTGCTCACTCAAGTCACAGATTTCCGAT  
CGGACCCGAGTGTGAGCCCGGGTTTAAACACCACTTACATGACCGCTCGCGCGCTTACGCCAATAATTCGGGACAAAGCTTGCCT  
CCTACGTATTACCGCGGTGCTGGCAGTATGAGCGGGGCTTTCTCTCAGGTACCGTCACTATGGAACAGTTACTCTCCATAGCGTTCTT  
CCCTGGCAACAGAGCTTACGATCCGAAACCTTCATCACTACGCGCGGTGCTCCGTCAGACTTGCCTCCATTGCGGAAGATTCCTACTG  
CTGCTCCCGTAGAGTGTGGCGGTGTCTCAGTCCAGTGTGGCGGATCACCTCTCAGGTGCGGTACGCTCATGCTCGCTTGTGTAGCGGT  
ACCTCACCACTAGCTAATGCGCGTAGGTCCATCCATAAGCGCAGATTGCTCCGCTTTCGCGATTCCTCATGCGAGGAATCGCTATC  
CGGTATTAGCCACGTTTCCGTGAGTTATCCCGGTCTTAAGGGCAGGTTACCTAGTATTACTACCCGCTCCCGCTCAAGCATCAGGAGTG  
AAGCACTCATCACTCCGCTCGACTTGCA
```

Рис. 1. Секвеннограмма штамма В 1.1

Fig. 1. Sequenogram of strain В 1.1

Classifier :: Hierarchy View

Classifier: RDP Naive Bayesian rRNA Classifier Version 2.11, September 2015
Taxonomical Hierarchy: RDP 16S rRNA training set 16
Query File: classifier_seq_upload7263391969301308076.FASTA
Query Submit Date: Thu Feb 28 03:14:00 EST 2019

Display depth:	Auto	Confidence threshold:	80%	CopyNumber Adjusted:	No	Refresh
domain	%	Library				
Bacteria	100.0					

Hierarchy View (click a node to make it the root -- only show sequences assigned to that node with confidence above the threshold):

rootrank Root (1 sequences) [show assignment detail for Root only] [download entire hierarchy as text file]
» domain Bacteria (1)
» » phylum Firmicutes (1)
» » » class Bacilli (1)
» » » » order Bacillales (1)
» » » » » family Paenibacillaceae 1 (1)
» » » » » » genus Paenibacillus (1)

Рис. 2. Идентификация по 16S рРНК штамма *Paenibacillus dendritiformis* strain P411

Fig. 2. 16S rRNA strain identification of *Paenibacillus dendritiformis* strain P411

```
CTTCGCGCGTGGCTCCTTGCCTGCTTACCCACCGACTTCGGGTGTTGTAACCTCTCGTGTGTGACGGCGGTGTGTACAAGACCGGGAAACGATTC  
ACCGCGCGATGCTGATCCGCGATTACTAGCAATTCGACTTCATGCAGGCGAGTTGACGCTGCAATCCGAAGTGAAGTGGCTTT  
TAGCCTCGCGGCTTCGCTCCGTTTGTCTGCCATTGTAGCAGCTGTGTAGCCAGGTCAAGGGGCGATGATGATTTGAGTCACTCCCACTCTCTC  
CGGTTTGTACCCGCGAGTCACTTAGAGTGCCCACTGAATGCTGGCACTAAGATCAAGGGTTCGCTCGTTGCGGGACTTAACCAACATCTCACG  
ACAGAGCTGACGACCAACATGACCACTGTGCTACTCTGCCCCGAAGGGAAGCCCTATCTCAGGGTGTGACAGGATGTCAAGACCTGTTAAGT  
TCTTCGCGTGTGTTGCAATTAACCACTGCTCCACGCTTGTGCGGGCCCCGCTCAATTCCTTTGAGTTTCACTTTCGACCGCTACTCCCGAGCGGA  
GTGCTTAATGCGTGTGCTGACGACTAAAGGGCGGAAACCTCTAACACTAGCACTCATGTTTACGCGGTGACTACCAAGGTATCTAATCTGTTT  
GCTCCCACTGCTTCGCGCTCAGGCTGATGACAGCAAGAGTGCCTTCGCACTGTGTTCCTCCACATCTCTACGCTATTCACCGTACACGCTG  
GAATTTCACTCTCTCTCTGCACTCAAGTTCCCAAGTTTCAATGACCTCCCGGTTGAGCGGGGGGCTTTCATCAGCACTTAAGAAACCGCTCGC  
CGCGCTTACGCCCCAATATTCGGGACACGCTTGCACCTACGTATTACCGCGGTGCTGGCAGTGTAGCCGTGCTTCTGTTAGGTACCGCT  
AAGGTCCCGCTTATCGAACGCTACTTGTCTTCCCTAACCAAGAGTTTACGATCCGAAACCTTCATCACTACGCGGCGTCTCCGCTCAGCACT  
TCGTCATTGCGGAAGATTCCTACTGCTGCTCCGCTAGGAGTGTGGCGGTGCTCAGTCCAGTGTGGCGGATCACCTCTCAGGTGGGTACGCA  
TCGTCGCTTGTGTAGCGGTTACTACCACTAGCTAATGCGCGCGGGTCCATCTGTAAGTGGTGAAGTAAAGCCACCTTTATGATTGAACCATGC  
GGTTCAATCAAGCATCGGTATGACCGCGGTTTCCCGGAGTTATCCAGTCTTACAGGAGGTTACCACTGCTTACTACCGCTCCCGCGCTGACCTA  
AGGGAGCAAGCTCCGCTGCTCGCTCGACTTGCA
```

Рис. 3. Секвеннограмма штамма В 1.2

Fig. 3. Sequenogram of strain В 1.2

CCTTCGGCGGCTGGCTCCAAAGGTTACCTCACCAGCTCGGGTGTACAACTCTCGTGTGTACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGATT
CACCAGCGCTGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGAGTCGAGTTGCAGACTCGGATCCGAACGAGAAAGATTGTGGATTGGC
TTAGCCTCGCGCTCGCTGCCCTTTGTTCTGCCATTGTAGCAGCTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGATGATGATTGACGTCATCCCACTCTCT
CCGGTTTGTACCGGCGAGTCACCTTAGAGTGCCCACTGAATGCTGGCACTAAGATCAAGGTTGCGCTGTGCGGGACTTAACCAACATCTCAG
ACACGAGCTGACGACCAACATGACCACTGTCTACTGCCCCGAAGGGAAGCCCTATCTCTAGGGTTGTCAAGGATGTCAAGACCTGTGAAGT
TCTTCGCGTGTCTCGAATTAACACATGCTCCACCGCTGTGCGGGCCCCGTCATTCCTTTGAGTTTCACTGCTTGCACCGCTACTCCCAAGCGG
GTGCTTAATGCGTTTGTGCGAGCACTAAAGGGCGGAAACCTCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGAAGTACCAGGGTATCTAATCTGTT
GCTCCCACTGCTTTCGCGCTCAGCTGATACAGACAGAGAGTGCCTTCGCCACTGCTGTGTTCTCCACATCTCTACGCTTTCACCGCTACAGCTG
GAATTCCTACTCTCTCTGCTGCACTCAAGTTCCCACTGATGACCTCCCGGTTGAGCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCTGCG
CGCGCTTACGCCAATAATTCGGGACACGCTTGCACCTACGTATTACCGCGGTGCTGGCAGTAGTTAGCGGTGGCTTCTGTTAGGTACCGTC
AAGGTACCGCTTATTCGAACGGTACTTGTCTTCCCTAACACAGAGTTTACGATCCGAAACCTTCATCCTCACGCGCGTGTGCTCGTCAAGCTT
TCGTCCATTGCGGAAAGATTCCCTACTGCTGCTCCCGTAGGAGTCTGGGCGTGTCTCAGTCCAGTGTGGCGGATCACCTCTCAGGTGCGGTACGCA
TCGTGCGCTGTGAGCGGTACTCTACCACTAGTAAATGCGCGGGTCCATCTGTAAGTGTAAGTAAAGCCACCTTTATGATTGAACCATGC
GGTTCAATCAAGCATCGGTATTAGCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCAGTCTTACAGGCGGTTACCCAGTGTACTACCGCTCGCGCTGACCTA
AGGGAGCAAGCTCCGCTCGGCTCGCTGACTTGA

Рис. 4. Секвенограмма штамма В 1.3

Fig. 4. Sequenogram of strain В 1.3

Секвенограммы штаммов В 1.2 и В 1.3 при сравнении структур нуклеотидных последовательностей с помощью программы BLAST совпадают между собой и имеют сходство со структурами *Bacillus licheniformis* strain PB3 chromosome, complete genome и *Bacillus licheniformis* strain UN1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

В соответствии с классификатором RDP получены результаты по «оригинальной» структуре фрагмента 16S рРНК, показанного на рис. 5 и 6.

На рис. 5 и 6 представлены результаты идентификации штаммов В 1.2 и В 1.3 по клас-

сификатору RDP и GenBank. Штаммы определили как *Bacillus licheniformis* strain PB3, который характеризуется более высоким уровнем варибельности генов 16S рРНК в обоих случаях.

На рис. 7 показана структура нуклеотидной последовательности штамма Р 1.1, полученная с помощью программы BLAST, которая при сравнении совпадает со структурой штаммов *Paenibacillus polymyxa* strain ISSDS-851 16S ribosomal RNA gene, partial sequence и *Paenibacillus* sp. strain R363 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

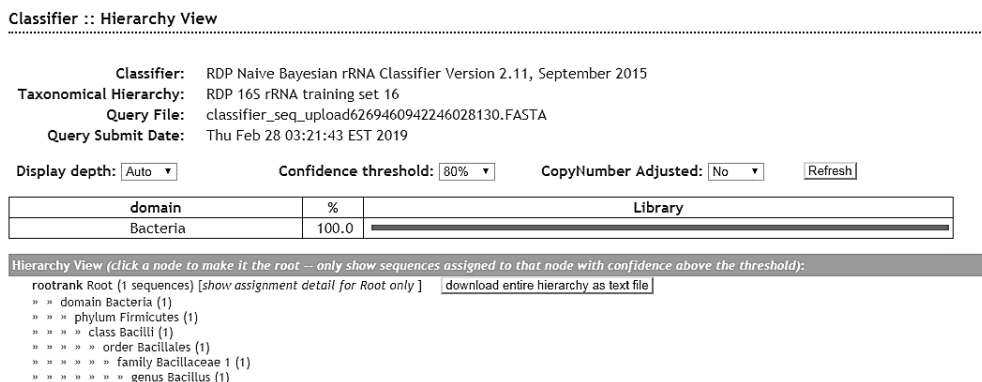


Рис. 5. Идентификация по 16S рРНК штамма *Bacillus licheniformis* strain PB3

Fig. 5. 16S rRNA strain identification of *Bacillus licheniformis* strain PB3

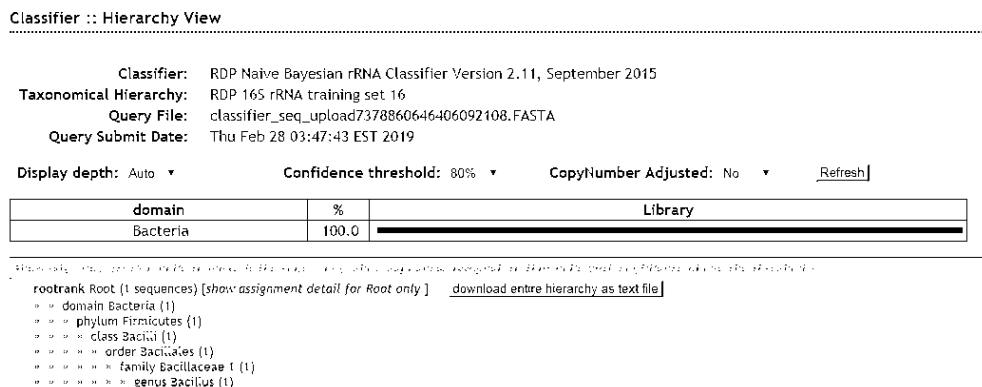


Рис. 6. Идентификация по 16S рРНК штамма *Bacillus licheniformis* strain PB3

Fig. 6. 16S rRNA strain identification of *Bacillus licheniformis* strain PB3

TGCAAGTCGAGCGGGTTGTTTGAAGCTTGCTTCTATATAACCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCCAAGACAG
GGATAACTACCGGAACCGGTAGCTAATACCGGATACATCTTTCTCTGATGGGAGAAGGAGGAAAGACGGAGCAATCTGTCACTGTGGAT
GGGCTGCGCGCATTAAGTCTAGTTGGTGGGTAAGGCTACCAAGGCGAGATGCGTAGCGGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACTGGG
ACTGAGACACGCGCCAGACTCTACGGGAGGCGAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGGCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGA
TGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTGCGAGGGAAGAACGTTGTAGTAGTAAGTCTACAAGAGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCC
CGGCTAACTACGTGCCAGCGCGGTAATACGTAGGGGCAAGCGTTGTCGGAATTATGGGCGTAAAGCGCGCGAGGCGCTCTTTA
AGTCTGGTGTATATCCCGAGGCTCACTTCGGGTCGCACTGAAACTGGGAGCTTGTAGTGCAGAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAG
CGGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCACTGGCGAAGGCGACTCTGGGCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGAG
CAACAGGATTAGATACCTGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATGCTAGGTGTTAGGGGTTTCGATACCTTGGTCCGGAAGTTAACACAT
TAAGCATTCCGCTGGGAGTAGCGTGCAGACTGAACTCAAGGAATTGACGGGACCGCCACAGCAGTGGAGTATGTGGTTTAAATTC
GAAGCAACGCGAAGAACCTTACAGGTCTGACATCCCTCTGACCGGTCTAGAGTAGNCCCTTCTTCGGGACAGAGGAGACAGGTGGTGC
ATGGTTGCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTATGCTTAGTTCAGCAGGTCAAGCTGGGCA
CTTAAGCAGACTGCGGAGTACAAACCGGAGGAGGTGGGATGACGTCAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTACTACA
TGGCCGGTACAAACGCGGAAGCGAAATCGCGAGGTGGAGCAATCCTAGAAAGCGGTCTCAGTTCGATTGTAGGCTGCAACTCGCTACAT
GAAGTCGGAATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCGGGTCTGTACACACCGCCGTCACACACGAGAGTTTA
CAACACCCGAAGTCGGTGGGTAACCCGCAAGGAGGACCGCGCGAAGG

Рис. 7. Секвенограмма штамма P 1.1

Fig. 7. Sequenogram of strain P 1.1

Классификатор RDP показал следующий результат по «оригинальной» структуре фрагмента 16S рРНК (рис. 8).

Как видно из рис. 8, идентифицированная нуклеотидная последовательность штамма P 1.1 по GenBank и классификатору RDP соответствует *Paenibacillus polymyxa* strain ISSDS-851 16S ribosomal RNA gene, который характеризуется более высоким уровнем варибельности генов 16S рРНК.

Для исключения методической погрешности анализа гена 16S рРНК образцы проанализи-

рованы с помощью программы BLAST, предназначенной для сравнения изучаемой нуклеотидной последовательности с базой данных секвенированного генома (табл. 2).

Процент идентичности фрагментов нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК составляет, %: между штаммом В 1.2. и *Bacillus licheniformis* strain PB3 – 99,86; между штаммом В 1.3. и *Bacillus licheniformis* strain PB3 – 100%. Как видно из табл. 2, полученные штаммы можно отнести к одному референтному штамму.

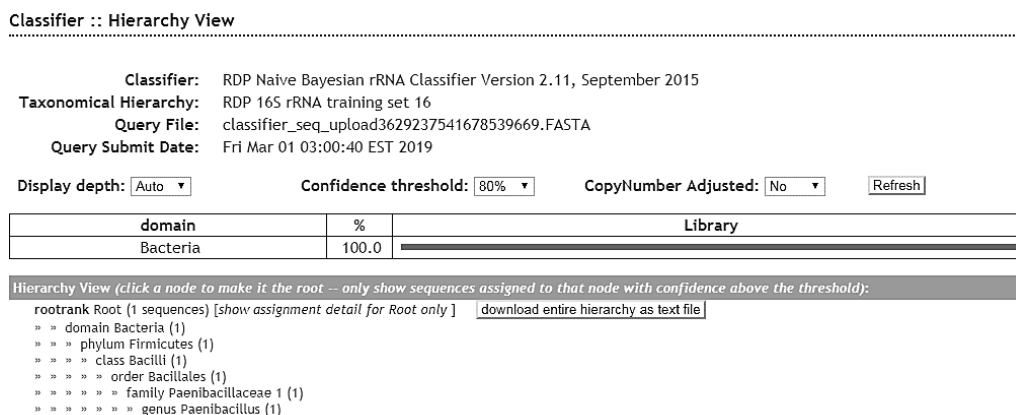


Рис. 8. Идентификация по 16S рРНК штамма *Paenibacillus polymyxa* strain ISSDS-851

Fig. 8. 16S rRNA strain identification of *Paenibacillus polymyxa* strain ISSDS-8513

Таблица 2. Результаты идентификации нуклеотидной последовательности в международной базе данных GenBank

Table 2. Results of the nucleotide sequence identification in the international GenBank database

Обозначение штамма	Наименование штамма по GenBank	% совпадения
В 1.1	<i>Paenibacillus dendritiformis</i> strain P411 16S ribosomal RNA gene	99,93
	<i>Paenibacillus dendritiformis</i> partial 16S rRNA gene, strain Marseille-P568	99,79
В 1.2 В 1.3	<i>Bacillus licheniformis</i> strain PB3 chromosome, complete genome	99,86
	<i>Bacillus licheniformis</i> strain PB3 chromosome, complete genome	100,00
Р 1.1	<i>Paenibacillus polymyxa</i> strain ISSDS-851 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99,86
	<i>Paenibacillus</i> sp. strain R363 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99,79

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенные исследования биохимических свойств штаммов В 1.1, В 1.2, В 1.3 и Р 1.1 показали, что использование данных штаммов в создании биологического консорциума позволит применять его для деструкции белковых и жировых соединений, а также углеводных и азотистых соединений сточных вод.

В результате молекулярно-генетической идентификации четырех исследуемых штаммов, впервые выделенных из активного ила городских

очистных сооружений г. Улан-Удэ и промышленного предприятия ОАО «Селенгинский ЦКК», на основе анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рПНК определены штаммы бактерий: для штамм В 1.1 идентичность с *Paenibacillus dendritiformis strain P411* составила 99,93%; штаммы В 1.2 и В 1.3 идентифицированы как *Bacillus licheniformis strain PB3* – 99,86% и 100% соответственно; штамм Р 1.1 соотнесен с *Paenibacillus polymyxa strain ISSDS-851* (процент идентификации – 99,86).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дегтярева И.А., Хидиятуллина А.Я. Рекультивация нефтезагрязненной почвы при использовании микроорганизмов-деструкторов и бентонита // Вестник Казанского технологического университета. 2012. Т. 15. N 5. С. 134–136.
2. Akpor O.B., Momba M.N.B.. Relationship of protozoan biomass to phosphate and nitrate removal from activated sludge mixed liquor // *Biotechnology Journal*. 2010. Vol. 5. Issue 3. P. 304–313. <https://doi.org/10.1002/biot.200900135>
3. Albertsen M., Hansen L.B.S., Saunders A.M., Nielsen P.H., Nielsen K.L. A metagenome of a full-scale microbial community carrying out enhanced biological phosphorus removal // *ISME Journal*. 2012. Vol. 6. Issue 6. P. 1094–1106. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.176>
4. Park H.-D., Noguera D.R. Evaluating the effect of dissolved oxygen on ammonia-oxidizing bacterial communities in activated sludge // *Water Research*. 2004. Vol. 38. Issue 14-15. P. 3275–3286. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.04.047>
5. Залевская Ю.М., Белик Е.С. Адаптация естественного биоценоза микроорганизмов активного ила целлюлозно-бумажной промышленности к трудноокисляемым органическим соединениям // Вестник Казанского технологического университета. 2017. Т. 20. N 5. С. 135–139.
6. Кобызева Н.В., Гатауллин А.Г., Силищев Н.Н., Логинов О.Н. Разработка технологии очистки сточной воды с использованием иммобилизованной микрофлоры // Вестник Оренбургского государственного университета. 2009. Т. 1 (95). С. 104–107.
7. Abusam A. Calibration of ASM1 for Carbon & Nitrogen Removals of Riqqa Activated Sludge System, Kuwait // *International Journal of Modeling and Optimization*. 2014. Vol. 4. Issue 6. P. 461–464.
8. Wagner M., Loy A., Nogueira R., Purkhold U., Lee N., Daims H. Microbial community composition and function in wastewater treatment plants // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2002. Vol. 81. Issue 1-4. P. 665–680. <https://doi.org/10.1023/A:1020586312170>
9. Бубеев А.Т., Балдаев Н.С., Цыренов В.Ж., Иванчиков Е.А. Метаболические основы создания искусственных консорциумов микроорганизмов для утилизации загрязнителей различной природности сооружений г. Улан-Удэ и промышленного предприятия ОАО «Селенгинский ЦКК», на основе анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рПНК определены штаммы бактерий: для штамм В 1.1 идентичность с *Paenibacillus dendritiformis strain P411* составила 99,93%; штаммы В 1.2 и В 1.3 идентифицированы как *Bacillus licheniformis strain PB3* – 99,86% и 100% соответственно; штамм Р 1.1 соотнесен с *Paenibacillus polymyxa strain ISSDS-851* (процент идентификации – 99,86).
10. Шалимов Ю.Н., Руссу А.В., Епифанов А.В., Епифанов В.Д., Лутовац М., Бабкин В.Ф. [и др.]. Микробиология сточных вод очистных сооружений // Современные технологии обеспечения гражданской обороны и ликвидации последствий чрезвычайных ситуаций. 2016. N 1-1 (7). С. 366–374.
11. Джобулаева А.К., Саданов А.К., Айткельдиева С.А., Байкара Б.Т., Джакибаева Г.Т., Кебекбаева К.М. Молекулярно-генетическая идентификация двух штаммов молочнокислых бактерий на основе анализа нуклеотидных последовательностей 16S rRNA гена // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2014. N 8–1. С. 63–67.
12. Гогонин А.В., Щемелинина Т.Н., Володин В.В. Сравнительная оценка эффективности очистки сточных вод при внесении монокультур и консорциумов микроводорослей // Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем: материалы XVI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием (Киров, 03–05 декабря 2018 г.). Киров: Изд-во Вятского государственного университета, 2018. С. 200–203.
13. Тимакова Д.Н., Ксенофонтов Б.С. Использование активного ила в качестве биофлокулянта // *Universum: химия и биология*. 2016. N 10 (28). С. 14–18.
14. McIlroy S.J., Starnawska A., Starnawski P.M., Saunders A.M., Nierychlo M., Nielsen P.H., et al. Identification of active denitrifiers in full-scale nutrient removal wastewater treatment systems // *Environmental Microbiology*. 2016. Vol. 18. Issue 1. P. 50–64. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12614>
15. Lee H.-W., Lee S.-Y., Lee J.-W., Park J.-B., Choi E.-S., Park Y.K. Molecular characterization of microbial community in nitrate-removing activated sludge // *FEMS Microbiology Ecology*. 2002. Vol. 41. Issue 2. P. 85–94. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb00969.x>
16. Ekama G.A., Wetzel M.C. Modelling inorganic material in activated sludge systems // *Water SA*. 2004. Vol. 30. Issue 2. P. 153–174. <https://doi.org/10.4314/wsa.v30i2.5060>
17. Stricker A.E., Racault Y. Application of

activated sludge model no. 1 to biological treatment of pure winery effluents: case studies // *Water Science & Technology*. 2005. Vol. 51. Issue 1. P. 121–127. <https://doi.org/10.2166/WST.2005.0015>

18. Song Y.J., Xie Y.B. Extended ASM1 for simulating biodegradation process using bacterial technology // *Water Science and Engineering*. 2012. Vol. 5. Issue 3. P. 278–290.

19. Lane D.J. 16S/23S rRNA Sequencing. In:

Sta-ckebrandt E, Goodfellow M. (Edited by). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. New York: John Wiley & Sons; 1991. Chapter 4. P. 115–175.

20. Turner S., Pryer K.M., Miao V.P., Palmer J.D. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis // *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 1999. Vol. 46. Issue 4. P. 327–338. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1999.tb04612.x>

REFERENCES

1. Degtyareva IA, Khidiyatullina AY. Reclamation of oil-contaminated soil using microorganisms-destructors and bentonite. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta = Bulletin of Kazan Technological University*. 2012;15(5):134–136. (In Russian)

2. Akpor OB, Momba MNB. Relationship of protozoan biomass to phosphate and nitrate removal from activated sludge mixed liquor. *Biotechnology Journal*. 2010;5(3):304–313. <https://doi.org/10.1002/biot.200900135>

3. Albertsen M, Hansen LBS, Saunders AM, Nielsen PH, Nielsen KL. A metagenome of a full-scale microbial community carrying out enhanced biological phosphorus removal. *ISME Journal*. 2012;6(6):1094–1106. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.176>

4. Park H-D, Noguera DR. Evaluating the effect of dissolved oxygen on ammonia-oxidizing bacterial communities in activated sludge. *Water Research*. 2004;38(14-15):3275–3286. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.04.047>

5. Zalevskaya JM, Belik ES. Adaptation of the natural biocenosis of activated sludge microorganisms of the pulp and paper industry to difficult-to-oxidize organic compounds. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta = Bulletin of Kazan Technological University*. 2017;20(5):135–139. (In Russian)

6. Kobzyeva NV, Gataullin AG, Silishchev HH, Loginov ON. Development of waste water treatment technology using immobilized microflora. *Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta = Vestnik of the Orenburg State University*. 2009;1: 104–107. (In Russian)

7. Abusam A. Calibration of ASM1 for Carbon & Nitrogen Removals of Riqqa Activated Sludge System, Kuwait. *International Journal of Modeling and Optimization*. 2014;4(6):461–464.

8. Wagner M, Loy A, Nogueira R, Purkhold U, Lee N, Daims H. Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2002;81(1-4):665–680. <https://doi.org/10.1023/A:1020586312170>

9. Bubeev AT, Baldaev NS, Tsyrenov VZh, Ivanchikov EA. The metabolic basis for the creation of artificial consortia of microorganisms for the disposal of pollutants of different nature. *Vestnik Vostochno-Sibirskogo universiteta tekhnologii i*

upravleniya = ESSUTM Bulletin. 2018;4:97–106. (In Russian)

10. Shalimov YuN, Russu AV, Epifanov AV, Epifanov VD, Lutovac M, Babkin VF, et al. Microbiology of wastewater treatment plants. *Sovremennye tekhnologii obespecheniya grazhdanskoi oborony i likvidatsii posledstviy chrezvychaynykh situatsii*. 2016; 1-1:366–374. (In Russian)

11. Dzhobulaeva AK, Sadanov AK, Aytgeldieva SA, Baykara BT, Dzhakibaeva GT, Kebekbaeva KM. Molecular genetic identification of two strains of lactic acid bacteria based on nucleotide sequence analysis of 16s rRNA gene. *Mezhdunarodnyi zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy*. 2014;8-1:63–67. (In Russian)

12. Gogonin AV, Shchemelinin TN, Vladimir VV. Comparative assessment of the efficiency of wastewater treatment in the introduction of monocultures and airo-algae consortium. In: *Biodiagnostika sostoyaniya prirodnnykh i prirodno-tekhnogennykh sistem: Materialy XVI Vserossiiskoi nauchno-prakticheskoi konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem = Biodiagnosis of the state of natural and natural-anthropogenic systems: Proceedings of the XVI All-Russian Scientific and Practical Conference with International Participation*. 03–05 December 2018, Kirov. Kirov: Izdatel'stvo Vyatskogo gosudarstvennogo universiteta, 2018, p. 200–203. (In Russian)

13. Timakova DN, Ksenofontov BS. The using of activated sludge as a bioflocculant. *Universum: khimiya i biologiya*. 2016;10:14–18. (In Russian)

14. McIlroy SJ, Starnawska A, Starnawski PM, Saunders AM, Nierychlo M, Nielsen PH, et al. Identification of active denitrifiers in full-scale nutrient removal wastewater treatment systems. *Environmental Microbiology*. 2016;18(1):50–64. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12614>

15. Lee H-W, Lee S-Y, Lee J-W, Park J-B, Choi E-S, Park YK. Molecular characterization of microbial community in nitrate-removing activated sludge. *FEMS Microbiology Ecology*. 2002;41(2):85–94. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb00969.x>

16. Ekama GA, Wetzel MC. Modelling inorganic material in activated sludge systems. *Water SA*. 2004;30(2):153–174. <https://doi.org/10.4314/wsa.v30i2.5060>

17. Stricker AE, Racault Y. Application of activated sludge model no. 1 to biological treatment

of pure winery effluents: case studies. *Water Science & Technology*. 2005;51(1):121–127. <https://doi.org/10.2166/WST.2005.0015>

18. Song YJ, Xie YB. Extended ASM1 for simulating biodegradation process using bacterial technology. *Water Science and Engineering*. 2012;5(3):278–290.

19. Lane DJ. 16S/23S rRNA Sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M. (eds.) *Nucleic acid*

techniques in bacterial systematics. New York: John Wiley & Sons; 1991. Chapter 4. p.115–175.

20. Turner S, Pryer KM, Miao VP, Palmer JD. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 1999;46(4):327–338. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1999.tb04612.x>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Иванчиков Егор Андреевич,

аспирант,
Восточно-Сибирский государственный
университет технологий и управления,
670013, г. Улан-Удэ, ул. Ключевская, 40в/1,
Российская Федерация,
✉ e-mail: ivanchikov92@mail.ru

Бубеев Алексей Трофимович,

к.б.н., доцент,
директор Института пищевой инженерии
и биотехнологии,
Восточно-Сибирский государственный
университет технологий и управления,
670013, г. Улан-Удэ, ул. Ключевская, 40в/1,
Российская Федерация,
e-mail: bubeev.aleksey@mail.ru

Цыренов Владимир Жигжитович,

д.б.н., профессор кафедры биотехнологии,
Восточно-Сибирский государственный
университет технологий и управления,
670013, г. Улан-Удэ, ул. Ключевская, 40в/1,
Российская Федерация,
e-mail: vtsyrenov@gmail.com

Арбатская Александра Валерьевна,

студентка,
Восточно-Сибирский государственный
университет технологий и управления,
670013, г. Улан-Удэ, ул. Ключевская, 40в/1,
Российская Федерация,
e-mail: aleksandra-arbatskaya@mail.ru

Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

*Все авторы прочитали и одобрили оконча-
тельный вариант рукописи.*

*Поступила в редакцию 03.11.2020.
Одобрена после рецензирования 15.01.2021.
Принята к публикации 28.02.2021.*

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Egor A. Ivanchikov,

Postgraduate Student,
East Siberia State University
of Technology and Management,
40v/1, Klyuchevskaya St., Ulan-Ude, 670013,
Russian Federation,
✉ e-mail: ivanchikov92@mail.ru

Alexey T. Bubeev,

Cand. Sci. (Biology), Associate Professor,
Director of the Institute of Food Engineering
and Biotechnology,
East Siberia State University of Technology
and Management,
40v/1, Klyuchevskaya St., Ulan-Ude, 670013,
Russian Federation,
e-mail: bubeev.aleksey@mail.ru

Vladimir Zh. Tsyrenov,

Dr. Sci. (Biol.), Professor,
Department of Biotechnology,
East Siberia State University
of Technology and Management,
40v/1, Klyuchevskaya St., Ulan-Ude, 670013,
Russian Federation,
e-mail: vtsyrenov@gmail.com

Aleksandra V. Arbatsksaya,

Student,
East Siberia State University
of Technology and Management,
40v/1, Klyuchevskaya St., Ulan-Ude, 670013,
Russian Federation,
e-mail: aleksandra-arbatskaya@mail.ru

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests re-
garding the publication of this article.

*The final manuscript has been read and approved
by all the co-authors.*

*The article was submitted 03.11.2020.
Approved after reviewing 15.01.2021.
Accepted for publication 28.02.2021.*

Оригинальная статья / Original article

УДК 579.66:579.017.8:579.264

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-125-135>



Влияние наноселена как компонента питательной среды на основные параметры культивирования и антагонистическую активность бактерий рода *Lactobacillus*

© А.В. Омельченко*, В.С. Ржевская*, А.В. Крыжко**,
Д.А. Панов*, И.А. Бугара*

* Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского,
г. Симферополь, Российская Федерация,

** Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма,
г. Симферополь, Российская Федерация

Резюме: Целью исследования являлось установление влияния наноселена на динамику роста и антагонистическую активность штаммов *Lactobacillus casei* IMB B-7343 и *Lactobacillus plantarum* IMB B-7344 относительно фитопатогенной бактерии *Xanthomonas campestris* B-4102. Наночастицы селена получали путем восстановления раствора селенита натрия L-цистеином в присутствии альгината натрия. Культивирование лактобактерий проводили на питательной среде MRS с добавлением коллоидного раствора наноселена в концентрациях: 0,05; 0,1; 0,15; 0,2 и 0,25 мг/л (по селену). Бактерии культивировали в 96-луночной планшете в фотометре Multiskan FC при 36 °C в режиме постоянного встряхивания. Антагонистическую активность лактобактерий изучали методом агаровых блоков. Установлено, что добавление в питательную среду наноселена в концентрациях от 0,2 до 0,25 мг/л способствовало сокращению длительности экспоненциальной фазы роста в среднем на 3 ч и уменьшению накопления биомассы штамма *L. casei* IMB B-7343 на 15,0%. Показано увеличение оптической плотности культуры этого штамма на 15,9% в стационарной фазе роста в варианте с добавлением к питательной среде раствора наноселена в концентрации 0,15 мг/л. Отмечено, что при культивировании штамма *L. plantarum* IMB B-7344 в питательной среде MRS с добавлением коллоидного раствора наноселена в концентрациях 0,05–0,25 мг/л в фазу экспоненциального развития наблюдалось ускорение роста культуры в среднем на 5 ч относительно контроля. Отмечено, что при добавлении в питательную среду наноселена наблюдалось увеличение антагонистической активности штаммов лактобактерий по отношению к фитопатогенной бактерии *X. campestris* B-4102, особенно у штамма *L. plantarum* IMB B-7344 (зона подавления роста фитопатогена составила 14,5–15 мм).

Ключевые слова: наноселен, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Xanthomonas campestris*, штамм, антагонистическая активность

Для цитирования: Омельченко А.В., Ржевская В.С., Крыжко А.В., Панов Д.А., Бугара И.А. Влияние наноселена как компонента питательной среды на основные параметры культивирования и антагонистическую активность бактерий рода *Lactobacillus*. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т. 11. N 1. С. 125–135. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-125-135>

Effects of nanoselenium as a nutrient medium component on the main cultivation parameters and antagonistic activity of *Lactobacillus* strains

Aleksandr V. Omelchenko*, Victoria S. Rzhetskaya*, Anastasiia V. Kryzhko**,
Denis A. Panov*, Igor A. Bugara*

* V.I. Vernadsky Crimean Federal University,
Simferopol, Russian Federation

** Institute of Agriculture of Crimea,
Simferopol, Russian Federation

Abstract: The study aims to establish the effect of nanoselenium on the growth and antagonistic activity of the *Lactobacillus casei* IMB B-7343 and *Lactobacillus plantarum* IMB B-7344 strains against the phytopathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* B-4102. Selenium nanoparticles were obtained by reducing a solution of sodium selenite with L-cysteine in the presence of sodium alginate. The cultivation of *Lactobacilli*

was carried out in a MRS nutrient medium with the addition of a colloidal solution of nanoselenium at the following concentrations: 0.05; 0.1; 0.15; 0.2 and 0.25 mg/l (for selenium). Bacteria were cultured in a 96-well plate in a Multiskan FC photometer at 36 °C under constant shaking. The antagonistic activity of the strains was studied by the method of agar blocks. It was found that the addition of nanoselenium to the nutrient medium at a concentration of 0.2 to 0.25 mg/l contributed to a decrease in the duration of the exponential growth phase by an average of 3 hours, as well as to a decrease in the biomass accumulation of the *L. casei* IMB B-7343 strain by 15.0%. The optical density of this strain culture was observed to increase by 15.9% in the stationary growth phase under the addition of a nanoselenium solution to the nutrient medium at a concentration of 0.15 mg/l. During the cultivation of the *L. plantarum* IMB B-7344 strain in an MRS nutrient medium with the addition of a colloidal solution of nanoselenium at a concentration of 0.05–0.25 mg/l in the exponential development phase, an acceleration of the culture growth on average by 5 hours relative to the control was observed. It was noted that, upon the addition of nanoselenium to the nutrient medium, an increase in the antagonistic activity of *Lactobacillus* strains against the phytopathogenic bacterium *X. campestris* B-4102 was observed, particularly in the *L. plantarum* IMB B-7344 strain (the zone of inhibition of the phytopathogen growth was 14.5–15 mm).

Keywords: nanoselenium, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Xanthomonas campestris*, strain, antagonistic activity

For citation: Omelchenko AV, Rzhetskaya VS, Kryzhko AV, Panov DA, Bugara IA. Effects of nanoselenium as a nutrient medium component on the main cultivation parameters and antagonistic activity of *Lactobacillus* strains. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(1):125–135. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-125-135>

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время на мировом рынке преобладают химические регуляторы роста и средства защиты растений. Однако широкое применение таких препаратов наносит непоправимый экологический ущерб [1]. Биологические средства защиты занимают лишь несколько процентов от общего объема таких препаратов. Их недостатком является узкая специфичность и большие потери [2]. Перспективным решением данной проблемы является разработка комплексных биопрепаратов на основе микроорганизмов и наночастиц биогенных элементов, обладающих как защитным, так и стимулирующим действием [3–8].

Среди наноконструктивных материалов, используемых для защиты растений от патогенных бактерий, важное место занимает селен [4, 9]. В отличие от ионных форм селена в форме наночастиц является менее токсичным и биологически доступным. Биологическая активность наночастиц селена, как и других биогенных элементов, зависит не только от размера, формы и устойчивости наночастиц, но и от свойств стабилизирующей матрицы [9, 10]. Известно, что селен в диспергированном до наноразмерных частиц виде обладает антибактериальным действием по отношению к фитопатогенным бактериям [3, 4, 8]. Данный биологический эффект заключается в нарушении мембранного потенциала бактериальной клетки, вызывающего ее гибель [4, 5, 11].

По литературным данным присутствие в среде селена оказывает положительное влияние на накопление биомассы лактобацилл [12–14]. Бактерии рода *Lactobacillus* способны продуцировать вещества с антибиотической активностью,

что позволяет им проявлять выраженный антагонизм в отношении различных микроорганизмов, в том числе фитопатогенных. Антагонистическая активность лактобактерий обусловлена такими метаболитами, как органические кислоты (преимущественно молочная), а также антимикробными и антибиотикоподобными соединениями – лизоцимом, перекисью водорода, бактериоцинами (лактацинами), диацетилом, гистамином и другими аминами [15, 16].

Различные заболевания растений, вызываемые патогенными бактериями, отрицательно влияют на урожайность сельскохозяйственных культур [3, 4, 11]. Наиболее распространенными и значимыми среди фитопатогенных бактерий являются облигатные аэробные бесспорные бактерии рода *Xanthomonas*, представляющие собой одиночные грамотрицательные подвижные палочки с закругленными концами. *Xanthomonas campestris* является возбудителем сосудистого бактериоза и листовой пятнистости культурных растений. В эпифитотийные годы сосудистым бактериозом может поражаться до 80% посевов растений семейства *Brassicaceae* [17]. Предотвратить распространение сосудистого бактериоза трудно, сдержать его возможно путем использования обеззараженного посевного материала и устранения потенциальных источников заражения в поле. Бороться с патогеном, проникшим в восприимчивое растение, практически невозможно [18]. Потери урожая растений в результате развития этой болезни в разных регионах России составили от 23 до 57%, в Индии достигали 50%, а в Черногории – до 80% [17, 18].

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния коллоидного раствора нано-

селена на динамику роста и антагонистическую активность лактобактерий *Lactobacillus casei* IMB B-7343 и *Lactobacillus plantarum* IMB B-7344 относительно фитопатогенной бактерии *Xanthomonas campestris* B-4102.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалом исследования служили штаммы молочнокислых стрептобацилл: *Lactobacillus casei* IMB B-7343, выделенный из самоквасных домашних кисломолочных продуктов, и *Lactobacillus plantarum* IMB B-7344, выделенный из силосованного зерна. Штамм *L. casei* IMB B-7343 является факультативной анаэробной мезофильной гомоферментативной палочкообразной бактерией, штамм *L. plantarum* IMB B-7344 – мезофильной гомоферментативной анаэробной бактерией. Антагонистическую активность лактобацилл оценивали на культуре фитопатогенной бактерии *Xanthomonas campestris* B-4102, полученной из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов.

Водорастворимую композицию наночастиц селена получали по оригинальной методике, разработанной в Крымском федеральном университете им. В.И. Вернадского [19]. Для этого селенистокислый натрий (х.ч.) восстанавливали L-цистеином (Synex Pharma, Китай) в присутствии природного полисахарида альгината натрия (BioPolymer, Норвегия). Реакцию восстановления ионного селена проводили при pH = 6,5–7,0, при температуре 293 К. Концентрация селена в водном растворе составляла 0,050 г/л, альгината натрия – 1,00 г/л, массовое соотношение концентраций нуль-валентного селена: альгината натрия было равно 0,050. В результате окислительно-восстановительной реакции образовывался красновато-оранжевый коллоидный раствор наноселена с максимумом оптического поглощения при длине волны $\lambda = 253$ нм, что свидетельствовало об образовании наночастиц селена. Электронные спектры поглощения регистрировали с помощью псевдодвухлучевого сканирующего спектрофотометра Shimadzu UV-1280 (Япония) в рабочем диапазоне длин волн 200–500 нм. Определение размера образующихся селеносодержащих наноструктур и изучение поверхности тонких пленок, полученных из водных растворов альгината и наноселена, проводили на сканирующем мультимикроскопе (СММ-2000, Россия). При изучении структур поверхности тонких пленок наблюдали наличие изолированных наноструктур, имеющих сферическую форму со средним диаметром частиц – 34 нм.

Культивирование лактобактерий проводили на питательной среде MRS [20]. В стерильную остывшую до 40 °С среду вносили наноселен в концентрации: 0,05; 0,1; 0,15; 0,2 и 0,25 мг/л (по селену). В качестве контроля использовали сре-

ду MRS, куда вместо растворов селена добавляли эквивалентное количество дистиллированной воды.

Для инокуляции питательной среды использовали 24-часовую культуру лактобактерий с титром $1,2 \cdot 10^8$. Микроорганизмы культивировали в 96-луночной планшете в фотометре Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, США) при температуре 36 °С в режиме постоянного встряхивания. Определение оптической плотности среды проводили при длине волны $\lambda = 620$ нм с периодичностью 1 ч в течение 70 ч.

Антагонистическую активность штаммов *L. casei* IMB B-7343 и *L. plantarum* IMB B-7344 по отношению к *X. campestris* B-4102 изучали методом агаровых блоков [21]. Для этого суточные культуры лактобактерий, выращенные в жидкой среде MRS с добавлением коллоидного раствора наноселена различной концентрации, высевали глубинно в чашки Петри и инкубировали при температуре 36 °С в течение 24 ч. Стерильным пробочным сверлом вырезали агаровый блок с выросшей культурой штамма лактобактерий и вставляли его в лунку в агаровом диске другой чашки Петри с только что глубинно засеянной культурой *X. campestris* B-4102. Чашки Петри выдерживали в течение 8 ч в холодильнике при температуре +5 °С для диффузии метаболитов лактобактерий из блока в толщу агара с тест-культурой, затем инкубировали в термостате при температуре 28 °С.

Эксперименты проводили в 3-кратной биологической повторности. Статистическую обработку данных осуществляли общепринятым методом с использованием коэффициента Стьюдента [22], в таблицах и рисунках представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В последние десятилетия в пищевой и медицинской промышленности в питательные среды для получения жидких культур лактобацилл вносят соединения селена с целью использования полученных культур в качестве закваски или функционального ингредиента для приготовления продуктов питания, обогащенных селеном [12, 13, 23]. Известно, что некоторые лактобактерии могут накапливать и биотрансформировать соли селена в селенаминокислоты, наноселен и/или летучие соединения селена [24, 25]. Имеются данные о высокой переносимости лактобактериями селенита натрия – до 198 мг/л [25]. Бактерии *L. bulgaricus* способны накапливать в цитоплазме и во внеклеточном пространстве нетоксичный селен. Присутствие в среде селена способствует увеличению скорости роста лактобацилл и их способности подавлять болезнетворную микрофлору [26].

Внесение в питательную среду MRS колло-

идного раствора наноселена в исследованных концентрациях оказало влияние как на накопление биомассы культур штаммов *L. casei* IMB B-7343 и *L. plantarum* IMB B-7344, так и на сроки прохождения бактериями основных фаз развития. Культура штамма *L. casei* IMB B-734 в присутствии раствора наноселена развивалась медленнее. Максимальную задержку развития наблюдали в варианте с добавлением в среду MRS 0,25 мг/л раствора наноселена, где фаза ускорения роста завершилась в среднем на 3 ч позже, чем в контроле и составила 15 ч (рис. 1).

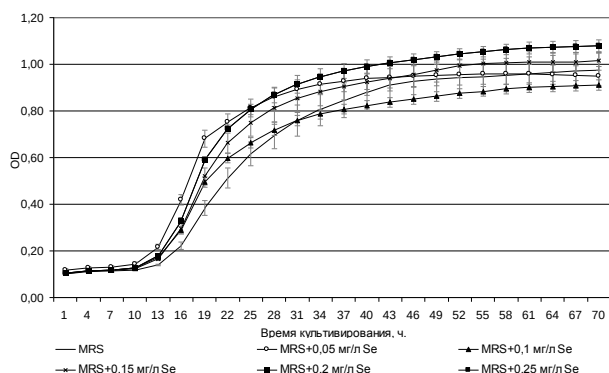


Рис. 1. Накопление биомассы культуры штамма *L. casei* IMB B-7343 на питательной среде MRS с добавлением коллоидного раствора наноселена

Fig. 1. Accumulation of *L. casei* strain IMB B-7343 biomass on MRS nutrient medium with colloidal solution of nanoselenium

Ингибирующее действие раствора наноселена в концентрации от 0,05 до 0,25 мг/л проявилось как в фазу экспоненциального развития, так и в фазу замедления роста. Максимальное угнетение роста отмечали в варианте с концентрацией наноселена 0,25 мг/л. Оптическая плотность культуры составила 0,22, что на 29,4% меньше чем в контроле. В целом же можно отметить, что добавление в питательную среду наноселена в концентрации 0,2–0,25 мг/л способствовало сокращению длительности экспоненциальной фазы в среднем на 3 ч (до 12 ч) и уменьшению накопления биомассы штамма *L. casei* IMB B-7343, оцениваемой по оптической плотности, на 15,0%. Фаза замедления роста во всех исследованных вариантах длилась в среднем 3 ч. Однако присутствие в среде раствора наноселена в концентрации 0,05–0,25 мг/л способствовало снижению оптической плотности культуры в среднем на 15,7% к контролю. В варианте с добавлением к питательной среде для культивирования штамма *L. casei* IMB B-7343 наноселена в концентрации 0,15 мг/л наблюдали короткую фазу экспоненциального развития, длившуюся в среднем 13 ч. Вместе с тем оптическая плотность культуры увеличивалась к 28 ч культивирования, составила 0,86 оптических единиц и, таким образом, достигла значения

контроля. При наблюдении роста штамма *L. casei* IMB B-7343 в стационарной фазе было отмечено, что в варианте с добавлением к питательной среде раствора наноселена в концентрации 0,15 мг/л оптическая плотность культуры увеличилась на 15,9%. В остальных вариантах опыта, т.е. при других концентрациях наноселена в растворах, значимого влияния на оптическую плотность бактериальной биомассы *L. casei* IMB B-7343 отмечено не было.

Анализ культивирования штамма *L. plantarum* IMB B-7344 в питательной среде MRS с добавлением наноселена позволил установить, что культура лактобактерий в фазе ускорения роста во всех вариантах развивалась синхронно в течение 17 ч (рис. 2).

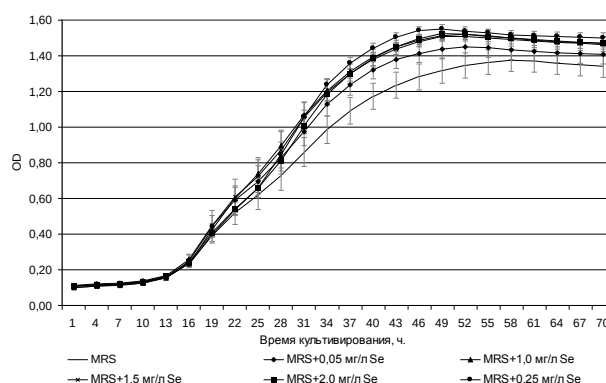


Рис. 2. Накопление биомассы культуры штамма *L. plantarum* IMB B-7344 на питательной среде MRS с добавлением коллоидного раствора наноселена

Fig. 2. Accumulation of *L. plantarum* strain IMB B-7344 biomass on MRS nutrient medium with colloidal solution of nanoselenium

В фазе экспоненциального развития наблюдалось ускорение роста культуры во всех опытных вариантах в среднем на 5 ч относительно контроля. При этом оптическая плотность культуры штамма IMB B-7344, культивируемого в средах с добавлением коллоидного раствора наноселена в концентрациях 0,05–0,25 мг/л, отличалась незначительно и превосходила контроль в 8,1 раз. Фаза замедления роста во всех экспериментальных образцах также наступала быстрее и длилась в среднем от 39 до 45 ч, в то время как в контроле ее наблюдали на 4 часа позже, то есть от 43 до 49 ч. Оптическая плотность культуры, выращенной на питательных средах с добавлением наноселена во всех исследованных концентрациях, достоверно не отличалась, составляла в среднем 1,49 единиц и на 13,8% превосходила контрольную. Достоверного влияния на оптическую плотность бактериальной биомассы штамма *L. plantarum* IMB B-7344 в стационарной фазе в остальных вариантах опыта отмечено не было.

При внесении в питательную среду MRS коллоидного раствора наноселена в концентрации

0,05–0,25 мг/л у всех изученных штаммов лактобактерий не наблюдалось значительных изменений культурально-морфологических свойств и размеров клеток. Так же, как и в контрольных, в опытных вариантах в чашках Петри штамм *L. casei* IMB B-7343 образовывал белые блестящие круглые колонии с ровным краем, гладкой поверхностью и выпуклым профилем, обладавшие однородной структурой и достигавшие в диаметре 1,5–1,7 мм (табл. 1). При прикосновении бактериальной петлей колония была мягкой, снималась с поверхности питательной среды полностью.

Клетки в мазках как контрольным, так и в опытных вариантах представляли собой изогнутые единичные палочки или палочки, образующие цепочки разной длины (1,1–1,2 x 0,6–0,8 мкм) (табл. 2).

Штамм *L. plantarum* IMB B-7344 как в опытных, так и контрольном вариантах формировал прозрачные, бесцветные круглые колонии с волнистым краем. Структура точечных колоний струйчатая, профиль выпуклый, максимальный диаметр составлял до 1 мм (см. табл. 1). Отмечено, что при прикосновении петлей колонии сухие, хрупкие.

Методом микроскопии установлено, что культура штамма *L. plantarum* IMB B-7344, выращенная с добавлением в питательную среду коллоидного раствора наноселена в концентрации 0,05–0,25 мг/л, образовывала цепочки по 5–6 клеток, в то время как в контроле наблюдали преимущественно одиночные и парные клетки. Размер клеток штамма *L. plantarum* IMB B-7344 в

контрольном и опытных вариантах достоверно не различался и составлял 1,8–2,0 x 0,6–0,8 мкм (см. табл. 2).

Известно, что различные соединения селена способны подавлять рост условно-патогенных бактерий. Так, 0,2%-й раствор наночастиц селена подавляет рост *P. aeruginosa* и *S. aureus*, а элементарный селен – *E. coli* и *S. aureus*. Имеются данные о способности бактерий рода *Lactobacillus*, выращенных на питательных средах, содержащих селенометионин и селеноцистеин, эффективно подавлять рост патогенной *E. coli*; штаммов *L. plantarum* и *L. johnsonii*, выращенных на средах, содержащих наноселен и селенит натрия, подавлять рост *Candida albicans*, *L. gasseri*, *S. enterica*, *K. pneumoniae*, *S. flexneri*, *P. vulgaris* и *S. epidermidis*. Биогенный наноселен (наноселен, образованный лактобактериями при добавлении в среду селенита натрия) обладает антимикробными свойствами [27–31]. Также в литературе имеются данные, свидетельствующие о способности лактобактерий подавлять рост фитопатогенных бактерий рода *Xanthomonas* [32].

В результате проведенных исследований отмечено, что при добавлении в питательную среду MRS раствора наноселена в концентрации от 0,05 до 0,25 мг/л наблюдалось увеличение антагонистической активности штаммов лактобактерий *L. casei* IMB B-7343 и *L. plantarum* IMB B-7344 по отношению к фитопатогенной бактерии *X. campestris* B-4102 по сравнению с контрольным вариантом (табл. 3).

Таблица 1. Влияние коллоидного раствора наноселена на размер колоний бактерий штаммов *L. casei* IMB B-7343 и *L. plantarum* IMB B-7344

Table 1. Influence of nanoselenium colloidal solution on the size of *L. casei* IMB B-7343 and *L. plantarum* IMB B-7344 strains colonies

Вариант опыта	Размер колонии, мм	
	<i>L. casei</i> IMB B-7343	<i>L. plantarum</i> IMB B-7344
MRS (контроль)	1,7±0,4	1,0±0,1
MRS + 0,05 мг/л Se ⁰	1,6±0,3	1,0±0,1
MRS + 0,1 мг/л Se ⁰	1,5±0,5	1,1±0,1
MRS + 0,15 мг/л Se ⁰	1,6±0,4	1,0±0,1
MRS + 0,2 мг/л Se ⁰	1,7±0,3	1,0±0,1
MRS + 0,25 мг/л Se ⁰	1,7±0,4	1,0±0,1

Таблица 2. Влияние коллоидного раствора наноселена на размер клеток бактерий штаммов *L. casei* IMB B-7343 и *L. plantarum* IMB B-7344

Table 2. Influence of nanoselenium colloidal solution on the cell size of *L. casei* IMB B-7343 and *L. plantarum* IMB B-7344 strains

Вариант опыта	Размер клеток, мкм	
	<i>L. casei</i> IMB B-7343	<i>L. plantarum</i> IMB B-7344
MRS (контроль)	1,1±0,5 x 0,6±0,2	1,9±0,3 x 0,7±0,1
MRS + 0,05 мг/л Se ⁰	1,2±0,4 x 0,8±0,3	1,8±0,2 x 0,6±0,1
MRS + 0,1 мг/л Se ⁰	1,1±0,5 x 0,7±0,3	1,9±0,4 x 0,7±0,1
MRS + 0,15 мг/л Se ⁰	1,0±0,5 x 0,6±0,4	1,9±0,3 x 0,7±0,1
MRS + 0,2 мг/л Se ⁰	1,1±0,4 x 0,7±0,3	2,0±0,2 x 0,8±0,1
MRS + 0,25 мг/л Se ⁰	1,1±0,4 x 0,6±0,2	1,9±0,2 x 0,6±0,1

Таблица 3. Антагонистическая активность штаммов

L. casei IMB B-7343 и *L. plantarum* IMB B-7344 относительно *X. campestris* B-4102

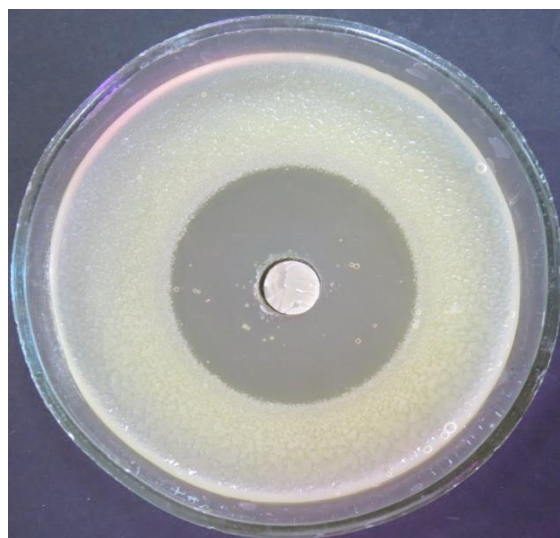
Table 3. Antagonistic activity

of *L. casei* IMB B-7343 and *L. plantarum* IMB B-7344 strains to *X. campestris* B-4102

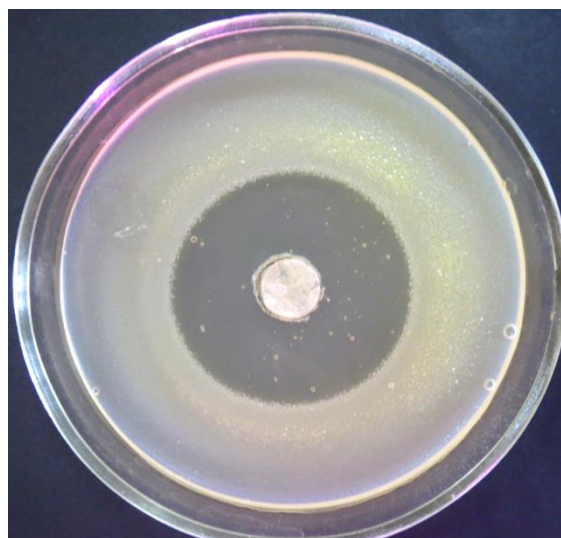
Варианты опыта	Зоны подавления роста <i>X. campestris</i> B-4102, мм	
	<i>L. casei</i> IMB B-7343	<i>L. plantarum</i> IMB B-7344
MRS (контроль)	45,0±0,5	40,0±1,3
MRS + 0,05 мг/л Se ⁰	51,0±1,0	54,5±0,5
MRS + 0,1 мг/л Se ⁰	51,0±1,1	55,0±0,8
MRS + 0,15 мг/л Se ⁰	52,0±0,8	55,0±0,7
MRS + 0,2 мг/л Se ⁰	52,0±1,0	55,0±1,0
MRS + 0,25 мг/л Se ⁰	52,0±1,2	55,0±1,1

Зона подавления роста бактерий штамма *X. campestris* B-4102 при добавлении коллоидного раствора наноселена в питательную среду MRS для штамма *L. casei* IMB B-7343 в опытных вариантах увеличилась на 6–7 мм, а *L. plantarum* IMB B-7344 – на 14,5–15 мм, что составляет 13,3–15,5 и 36–37,5% соответственно по сравнению с контролем. Достоверной разницы

между концентрациями наноселена (0,05–0,25 мг/л) в питательной среде MRS и проявлением антагонистической активности штамма *L. casei* IMB B-7343 не отмечено. Наиболее высокая антагонистическая активность по отношению к *X. campestris* B-4102 выявлена у штамма *L. plantarum* IMB B-7344 (рис. 3).



а



б

Рис. 3. Антагонистическая активность *L. casei* IMB B-7343 (а) и *L. plantarum* IMB B-7344 (б) относительно *X. campestris* B-4102

Fig. 3. Antagonistic activity of *L. casei* IMB B-7343 (а) and *L. plantarum* IMB B-7344 (б) to *X. campestris* B-4102

ВЫВОДЫ

Установлено, что максимальная задержка развития культуры штамма *L. casei* IMB B-7343 происходила в варианте опыта с добавлением в среду MRS 0,25 мг/л коллоидного раствора наноселена, где фаза ускорения роста завершилась в среднем на 3 ч позже чем в контроле и составила 15 ч. Добавление в питательную среду наноселена в концентрации 0,2–0,25 мг/л способствовало сокращению длительности экспоненциальной фазы в среднем на 3 ч (до 12 ч) и уменьшению накопления биомассы штамма *L. casei* IMB B-7343, оцениваемой по оптической плотности, на 15,0%. Показано, что увеличение оптической плотности культуры штамма *L. casei*

IMB B-7343 на 15,9% в стационарной фазе роста происходило в варианте с добавлением к питательной среде раствора наноселена в концентрации 0,15 мг/л.

Отмечено, что при культивировании штамма *L. plantarum* IMB B-7344 в питательной среде MRS с добавлением коллоидного раствора наноселена в концентрации 0,05–0,25 мг/л культура лактобактерий во всех вариантах в фазе ускорения роста развивалась синхронно в течение 17 ч. В фазу экспоненциального развития наблюдалось ускорение роста культуры во всех опытных вариантах с добавлением наноселена в среднем на 5 ч относительно контроля.

Установлено, что при внесении в питательную

среду MRS коллоидного раствора наноселена в концентрации 0,05–0,25 мг/л у штаммов лактобактерий *L. casei* IMB B-7343 и *L. plantarum* IMB B-7344 значительных изменений культурально-морфологических свойств и размеров клеток не наблюдалось. Исключение составила культура штамма *L. plantarum* IMB B-7344, выращенная с добавлением в питательную среду коллоидного раствора наноселена в концентрации 0,05–0,25 мг/л, которая образовывала цепочки по 5–6 клеток, в то время как в контроле наблюдали преимущественно одиночные и парные клетки.

Отмечено, что при добавлении в питательную среду MRS раствора наноселена в концентрации 0,05–0,25 мг/л наблюдалось увеличение антагонистической активности штаммов лактобактерий *L. casei* IMB B-7343 и *L. plantarum* IMB B-7344 по отношению к фитопатогенной бак-

терии *X. campestris* B-4102, по сравнению с контрольным вариантом. Наиболее высокая антагонистическая активность по отношению к *X. campestris* B-4102, выявлена у штамма *L. plantarum* IMB B-7344: зона подавления роста фитопатогена составила 14,5–15 мм.

Таким образом, полученные в результате исследований параметры культивирования лактобактерий на среде MRS с добавлением коллоидного раствора наноселена в изученных концентрациях (0,05–0,25 мг/л) свидетельствуют, что штаммы *L. casei* IMB B-7343 и *L. plantarum* IMB B-7344 являются технологичными и с учетом антагонистической активности относительно *X. campestris* B-4102, могут быть рекомендованы для разработки на их основе комплексного биопрепарата для защиты растений от фитопатогенов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Санин С.С., Мотовилин А.А., Корнева Л.Г., Жохова Т.П., Полякова Т.М., Акимова Е.А. Химическая защита пшеницы от болезней при интенсивном зернопроизводстве // Защита и карантин растений. 2011. N 8. С. 3–10.
2. Егоров Н.П., Шафронов О.Д., Егоров Д.Н., Сулейманов Е.В. Разработка и проведение экспериментальной оценки эффективности применения в растениеводстве новых видов удобрений, полученных с использованием нанотехнологий // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. 2008. N 6. С. 94–99.
3. Papkina A.V., Perfilova A.I., Zhivetev M.A., Borovskiy G.B., Graskova I.A., Lesnichaya M.V., et al. Effect of selenium and arabinogalactan nanocomposite on viability of the phytopathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus* // Doklady Biological Sciences. 2015. Vol. 461. Issue 1. P. 89–91. <https://doi.org/10.1134/S001249661501010X>
4. Perfilova A.I., Nozhkina O.A., Graskova I.A., Sidorov A.V., Lesnichaya M.V., Aleksandrova G.P., et al. Synthesis of selenium and silver nanobiocomposites and their influence on phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus* // Russian Chemical Bulletin. 2018. Vol. 67. Issue 1. P. 157–163. <https://doi.org/10.1007/s1172-018-2052-4>
5. Perfilova A.I., Nozhkina O.A., Graskova I.A., Dyakova A.V., Pavlova A.G., Klimenkov I.V., et al. Selenium nanocomposites having polysaccharid matrices stimulate growth of potato plants *in vitro* infected with ring rot pathogen // Doklady Biological Sciences. 2019. Vol. 489. Issue 1. P. 184–188. <https://doi.org/10.1134/S0012496619060073>
6. Zhao L., Lu L., Wang A., Huiling Zhang, Min Huang, Honghong Wu, Baoshan Xing, Zhenyu Wang, Rong Ji. Nano-Biotechnology in Agriculture: Use of Nanomaterials to Promote Plant Growth and Stress Tolerance // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2020. Vol. 68. Issue 7. P. 1935–1947. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b06615>
7. Нурминский В.Н., Перфильева А.И., Капустина И.С., Граскова И.А., Сухов Б.Г., Трофимов Б.А. Ростостимулирующая активность нанокмполитов селена в природных полимерных матрицах при прорастании семян культурных растений // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. 2020. Т. 495. N 1. С. 607–611. <https://doi.org/10.31857/S2686738920060207>
8. Cremonini E., Zonaro E., Donini M., Lampis S., Boaretti M., Dusi S., et al. Biogenic selenium nanoparticles: characterization, antimicrobial activity and effects on human dendritic cells and fibroblasts // Microbial Biotechnology. 2016. Vol. 9. Issue 6. P. 758–771. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12374>
9. Nozhkina O.A., Perfilova A.I., Graskova I.A., Nurminsky V.N., Klimenkov I.V., Dyakova A.V., et al. The biological activity of a selenium nanocomposite encapsulated in carrageenan macromolecules with respect to ring rot pathogenesis of potato plants // Nanotechnologies in Russia. 2019. Vol. 14. Issue 5-6. P. 255–262. <https://doi.org/10.1134/S1995078019030091>
10. Nikonov I.N., Folmanis J.G., Kovalenko L.V., Laptev G.Y., Folmanis G.E., Egorov I.A., et al. Biological activity of nanoscale colloidal selenium // Doklady Biochemistry and Biophysics. 2012. Vol. 447. Issue 1. P. 297–299. <https://doi.org/10.1134/S1607672912060075>
11. Perfilova A.I., Tsivileva O.M., Koftin O.V., Anis'kov A.A., Ibragimova D.N. Selenium-containing nanobiocomposites of fungal origin reduce the viability and biofilm formation of the bacterial phytopathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus* // Nanotechnologies in Russia. 2018. Vol. 13. Issue 5-6. P. 268–276. <https://doi.org/10.1134/S1995078018030126>
12. Mangiapane E., Lamberti C., Pessione A., Galano E., Amoresano A., Pessione E. Selenium effects on the metabolism of a Se-metabolizing *Lac-*

tobacillus reuteri: analysis of envelope-enriched and extracellular proteomes // Molecular Bio-Systems. 2014. Vol. 10. Issue 6. P. 1272–1280. <https://doi.org/10.1039/C3MB70557A>

13. Pescuma M., Gomez-Gomez B., Perez-Corona T., Font G., Madrid Y., Mozzi F. Food prospects of selenium enriched *Lactobacillus acidophilus* CRL 636 and *Lactobacillus reuteri* CRL 1101 // Journal of Functional Foods. 2017. Vol. 35. P. 466–473. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.06.009>

14. Martinez F.G., Moreno-Martin G., Pescuma M., Madrid-Albarran Y., Mozzi F. Biotransformation of selenium by lactic acid bacteria: formation of seleno-nanoparticles and seleno-amino acids // Frontiers Bioengineering and Biotechnology. 2020. Vol. 8. P. 506. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00506>

15. Черкасов С.В., Семенов А.В. Микробная регуляция антагонистической активности лактобактерий // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). 2012. Т. 109. N 2. С. 78–82.

16. Чичерин И.Ю., Погорельский И.П., Лундовских И.А., Малов А.А., Шабалина М.Р., Дармов И.В. Динамика содержания лактобацилл, микробных метаболитов и антибактериальной активности растущей культуры *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 // Журнал инфектологии. 2013. Т. 5. N 3. С. 50–55.

17. Taylor J.D., Conway J., Roberts S.J., Astley D., Vicente J.G. Sources and origin of resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in *Brassica* genomes // Phytopathology. 2002. Vol. 92. Issue 1. P. 105–111. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.1.105>

18. Артемьева А.М., Игнатов А.Н., Волкова А.И., Кочерина И.В., Коноплева М.Н., Чесноков Ю.В. Физиолого-генетические компоненты устойчивости к сосудистому бактериозу у линий удвоенных гаплоидов *Brassica rapa* L. // Сельскохозяйственная биология. 2018. Т. 53. N 1. С. 157–169. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2018.1.157rus>

19. Пат. № 159620, Российская Федерация. Способ получения водорастворимой композиции наночастиц, содержащей наночастицы селена / И.Н. Юркова, Э.П. Панова, Д.А. Панов, А.В. Омельченко; патентообладатель Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского; заявл. 26.04.2013; опубл. 10.02.2016. Бюл. № 4.

20. Квасников Е.И., Нестеренко О.А. Молочно-кислые бактерии и пути их использования. М.: Наука, 1975. 390 с.

21. Сэги Й. Методы почвенной микробиологии / пер. с венг. И.Ф. Куренного. М.: Колос, 1983. 296 с.

22. Трухачёва Н.В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica: монография. М.: ИГ «ГЭОТАР-Медиа», 2013. 384 с.

23. Pophaly S.D., Poonam, Singh P., Kumar H., Tomar S.K., Singh R. Selenium enrichment of lactic acid bacteria and bifidobacteria: a functional food

perspective // Trends in Food Science Technology. 2014. Vol. 39. Issue 2. P. 135–145. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.07.006>

24. Moreno-Martin G., Pescuma M., Pérez-Corona T., Mozzi F., Madrid Y. Determination of size and mass-and number-based concentration of biogenic SeNPs synthesized by lactic acid bacteria by using a multimethod approach // Analytica Chimica Acta. 2017. Vol. 992. P. 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.09.033>

25. Zambonino M.C., Quizhpe E.M., Jaramillo F.E., Rahman A., Vispo N.S., Jeffryes C., et al. Green synthesis of selenium and tellurium nanoparticles: current trends, biological properties and biomedical applications // International Journal Molecular Sciences. 2021. Vol. 22. Issue 3. P. 989. <https://doi.org/10.3390/ijms22030989>

26. Xia S.K., Chen L., Liang J.Q. Enriched selenium and its effects on growth and biochemical composition in *Lactobacillus bulgaricus* // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2007. Vol. 55. Issue 6. P. 2413–2417. <https://doi.org/10.1021/jf062946j>

27. Gonzalez-Olivares L.G., Contreras-Lopez E., Flores-Aguilar J.F., Rodriguez-Serrano G.M., Castaneda-Ovando A., Jaimez-Ordaz J., et al. Inorganic selenium uptake by *Lactobacillus* ssp. // Revista Mexicana de Ingeniería Química. 2016. Vol. 15. Issue 1. P. 33–38.

28. Tran P.L., Hammond A.A., Mosley T., Cortez J., Gray T., Colmer-Hamood J.A., et al. Organoselenium coating on cellulose inhibits the formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* // Applied and Environmental Microbiology. 2009. Vol. 75. Issue. 11. P. 3586–3592. <https://doi.org/10.1128/AEM.02683-08>

29. Khalid A.Q., AlJohny B.O., Wainwright M. Antibacterial effects of pure metals on clinically important bacteria growing in planktonic cultures and biofilms // African Journal of Microbiology Research. 2014. Vol. 8. Issue 10. P. 1080–1088. <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.5893>

30. Yang J., Huang K., Qin S., Wu X., Zhao Z., Chen F. Antibacterial action of selenium-enriched probiotics against pathogenic *Escherichia coli* // Digestive Diseases and Sciences. 2008. Vol. 54. Issue 2. P. 246–254. <https://doi.org/10.1007/s10620-008-0361-4>

31. Kheradmand E., Rafii F., Yazdi M.H., Sepahi A.A., Shahverdi A.R., Oveisi M.R. The antimicrobial effects of selenium nanoparticle-enriched probiotics and their fermented broth against *Candida albicans* // DARU Journal of Pharmaceutical Science. 2014. Vol. 22. Article number 48. <https://doi.org/10.1186/2008-2231-22-48>

32. Visser R., Holzapfel W.H., Bezuidenhout J.J., Kotze J.M. Antagonism of lactic acid bacteria against phytopathogenic bacteria // Applied and Environmental Microbiology. 1986. Vol. 52. Issue 3. P. 552–555. <https://doi.org/10.1128/AEM.52.3.552-555.1986>

REFERENCES

1. Sanin SS, Motovilin AA, Korneva LG, Zhokhova TP, Polyakova TM, Akimova EA. Chemical protection of wheat from the diseases under the conditions of intensive grain production. *Zashchita i karantin rastenii*. 2011;8;3–10. (In Russian)
2. Egorov N.P., Shafronov O.D., Egorov D.N., Suleimanov E.V. Development and experimental estimation of application efficiency of new nanotechnology fertilizers in crop production. *Vestnik Nizhegorodskogo universiteta im. N.I. Lobachevskogo = Vestnik of Lobachevsky University of Nizhni Novgorod*. 2008;6;94–99. (In Russian)
3. Papkina AV, Perfilova AI, Zhivetev MA, Borovskiy GB, Graskova IA, Lesnichaya MV, et al. Effect of selenium and arabinogalactan nano-composite on viability of the phytopathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus*. *Doklady Biological Sciences*. 2015;461(1):89–91. <https://doi.org/10.1134/S001249661501010X>
4. Perfilova AI, Nozhkina OA, Graskova IA, Sidorov AV, Lesnichaya MV, Aleksandrova GP, et al. Synthesis of selenium and silver nanobiocomposites and their influence on phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus*. *Russian Chemical Bulletin*. 2018;67(1):157–163. <https://doi.org/10.1007/s11172-018-2052-4>
5. Perfilova AI, Nozhkina OA, Graskova IA, Dyakova AV, Pavlova AG, Klimenkov IV, et al. Selenium nanocomposites having polysaccharid matrices stimulate growth of potato plants *in vitro* infected with ring rot pathogen. *Doklady Biological Sciences*. 2019;489(1):184–188. <https://doi.org/10.1134/S0012496619060073>
6. Zhao L, Lu L, Wang A, Zhang H, Huang M, Wu H, et al. Nano-Biotechnology in Agriculture: Use of Nanomaterials to Promote Plant Growth and Stress Tolerance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2020;68(7):1935–1947. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b06615>
7. Nurminskiy VN, Perfil'eva AI, Kapustina IS, Graskova IA, Sukhov BG, Trofimov BA. Growth-stimulating activity of natural polymer-based nanocomposites of selenium during the germination of cultivated plant seeds. *Doklady Rossiiskoi akademii nauk. Nauki o zhizni*. 2020;495(1):607–611. (In Russian) <https://doi.org/10.31857/S2686738920060207>
8. Cremonini E, Zonaro E, Donini M, Lampis S, Boaretti M, Dusi S, et al. Biogenic selenium nanoparticles: characterization, antimicrobial activity and effects on human dendritic cells and fibroblasts. *Microbial Biotechnology*. 2016;9(6):758–771. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12374>
9. Nozhkina OA, Perfilova AI, Graskova IA, Nurminskiy VN, Klimenkov IV, Dyakova AV, et al. The biological activity of a selenium nanocomposite encapsulated in carrageenan macromolecules with respect to ring rot pathogenesis of potato plants. *Nanotechnologies in Russia*. 2019;14(5-6):255–262. <https://doi.org/10.1134/S1995078019030091>
10. Nikonov IN, Folmanis JG, Kovalenko LV, Laptev GY, Folmanis GE, Egorov IA, et al. Biological activity of nanoscale colloidal selenium. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2012;447(1):297–299. <https://doi.org/10.1134/S1607672912060075>
11. Perfilova AI, Tsivileva OM, Koftin OV, Anis'kov AA, Ibragimova DN. Selenium-containing nanobiocomposites of fungal origin reduce the viability and biofilm formation of the bacterial phytopathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus*. *Nanotechnologies in Russia*. 2018;13(5-6):268–276. <https://doi.org/10.1134/S1995078018030126>
12. Mangiapane E, Lamberti C, Pessione A, Galano E, Amoresano A, Pessione E. Selenium effects on the metabolism of a Se-metabolizing *Lactobacillus reuteri*: analysis of envelope-enriched and extracellular proteomes. *Molecular BioSystems*. 2014;10(6):272–1280. <https://doi.org/10.1039/C3MB70557A>
13. Pescuma M, Gomez-Gomez B, Perez-Corona T, Font G, Madrid Y, Mozzi F. Food prospects of selenium enriched *Lactobacillus acidophilus* CRL 636 and *Lactobacillus reuteri* CRL 1101. *Journal of Functional Foods*. 2017;35;466–473. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.06.009>
14. Martinez FG, Moreno-Martin G, Pescuma M, Madrid-Albarran Y, Mozzi F. Biotransformation of selenium by lactic acid bacteria: formation of seleno-nanoparticles and seleno-amino acids. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020;8:506. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00506>
15. Cherkasov SV, Semenov AV. Microbial regulation of antagonistic activity of lactobacilli. *Sibirskii meditsinskii zhurnal (Irkutsk) = Siberian Medical Journal (Irkutsk)*. 2012;109(2):78–82. (In Russian)
16. Chicherin IYu, Pogorelskiy IP, Lundovskikh IA, Malov AA, Shabalina MR, Darmov IV. Dynamics of the content of lactobacilli, microbial metabolites and antimicrobial activity of growing culture of *Lactobacillus plantarum* 8P-A3. *Zhurnal infektologii = Journal Infectology*. 2013;5(3):50–55. (In Russian)
17. Taylor JD, Conway J, Roberts SJ, Astley D, Vicente JG. Sources and origin of resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in *Brassica* genomes. *Phytopathology*. 2002;92(1):105–111. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.1.105>
18. Artemyeva AM, Ignatov AN, Volkova AI, Kocherina NV, Konopleva MN, Chesnokov YuV. Physiological and genetic components of black rot resistance in double haploid lines of *Brassica rapa* L. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya = Agricultural Biology* 2018;53(1):157–169. (In Russian) <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2018.1.157rus>
19. Yurkova IN, Panova EP, Panov DA, Omel'chenko AV. A method for obtaining a water-soluble composition of nanoparticles containing selenium nanoparticles. Patent RF, no. 159620; 2015. (In Russian)
20. Kvasnikov EI, Nesterenko OA. *Lactic acid*

bacteria and ways of their use. Moscow: Nauka; 1975. 390 p. (In Russian)

21. Szegi J. *Talajmikrobiologiai vizsgalati modszerek*. Budapest, 1979. (Russ. ed.: *Metody pochennoy mikrobiologii*. Moscow: Kolos; 1983. 296 p.)

22. Trukhacheva NV. *Mathematical statistics in biomedical research using the Statistica package*. Moscow: GEOTAR-Media; 2013. 384 p. (In Russian)

23. Pophaly SD, Poonam, Singh P, Kumar H, Tomar SK, Singh R. Selenium enrichment of lactic acid bacteria and bifidobacteria: a functional food perspective. *Trends in Food Science & Technology*. 2014;39(2):135–145. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.07.006>

24. Moreno-Martin G, Pescuma M, Pérez-Corona T, Mozzi F, Madrid Y. Determination of size and mass-and number-based concentration of biogenic SeNPs synthesized by lactic acid bacteria by using a multimethod approach. *Analytica Chimica Acta*. 2017; 992:34–41. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.09.033>

25. Zambonino MC, Quizhpe EM, Jaramillo FE, Rahman A, Vispo NS, Jeffryes C, et al. Green synthesis of selenium and tellurium nanoparticles: current trends, biological properties and biomedical applications. *International Journal Molecular Sciences*. 2021;22(3):989. <https://doi.org/10.3390/ijms22030989>

26. Xia SK, Chen L, Liang JQ. Enriched selenium and its effects on growth and biochemical composition in *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007;55(6):2413–2417. <https://doi.org/10.1021/jf062946j>

27. Gonzalez-Olivares LG, Contreras-Lopez E, Flores-Aguilar JF, Rodriguez-Serrano GM, Cas-

taneda-Ovando A, Jaimez-Ordaz J, et al. Inorganic selenium uptake by *Lactobacillus* ssp. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 2016;15(1):33–38.

28. Tran PL, Hammond AA, Mosley T, Cortez J, Gray T, Colmer-Hamood JA, et al. Organoselenium coating on cellulose inhibits the formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009;75(11):3586–3592. <https://doi.org/10.1128/AEM.02683-08>

29. Khalid AQ, AlJohny BO, Wainwright M. Antibacterial effects of pure metals on clinically important bacteria growing in planktonic cultures and biofilms. *African Journal of Microbiology Research*. 2014;8(10):1080–1088. <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.5893>

30. Yang J, Huang K, Qin S, Wu X, Zhao Z, Chen F. Antibacterial action of selenium-enriched probiotics against pathogenic *Escherichia coli*. *Digestive Diseases and Sciences*. 2008;54(2):246–254. <https://doi.org/10.1007/s10620-008-0361-4>

31. Kheradmand E, Rafii F, Yazdi MH, Sepahi AA, Shahverdi AR, Oveisi MR. The antimicrobial effects of selenium nanoparticle-enriched probiotics and their fermented broth against *Candida albicans*. *DARU Journal of Pharmaceutical Science*. 2014;22. Article number 48. <https://doi.org/10.1186/2008-2231-22-48>

32. Visser R, Holzapfel WH, Bezuidenhout JJ, Kotze JM. Antagonism of lactic acid bacteria against phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 1986;52(3):552–555. <https://doi.org/10.1128/AEM.52.3.552-555.1986>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Омельченко Александр Владимирович,
к.б.н., доцент кафедры ботаники
и физиологии растений и биотехнологий,
Крымский федеральный университет
им. В.И. Вернадского,
295007, г. Симферополь,
пр-т Академика Вернадского, 4,
Российская Федерация,
✉ e-mail: omelchenko_tnu@mail.ru

Ржевская Виктория Степановна,
соискатель кафедры фармации,
Крымский федеральный университет
им. В.И. Вернадского,
295051, г. Симферополь, б-р Ленина, 5/7,
Российская Федерация,
e-mail: viktoriyar45@mail.ru

Крыжко Анастасия Владимировна,
к.с.-х.н., ведущий научный сотрудник
лаборатории молекулярной генетики,
протеомики и биоинформатики
в сельском хозяйстве,
Научно-исследовательский институт сельского
хозяйства Крыма,

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Aleksandr V. Omelchenko,
Cand. Sci. (Biology), Associate Professor,
Department of Botany and Physiology
of Plants and Biotechnology,
V.I. Vernadsky Crimean Federal University,
4, Academician Vernadsky Ave.,
Simferopol, 295007,
Russian Federation,
✉ e-mail: omelchenko_tnu@mail.ru

Victoria S. Rzhetskaya,
candidate of the Department of Pharmacy,
V.I. Vernadsky Crimean Federal University,
5/7, Lenin B/v,
Simferopol, 295051,
Russian Federation,
e-mail: viktoriyar45@mail.ru

Anastasiia V. Kryzhko,
Cand. Sci. (Agriculture), Leading Researcher,
Laboratory of Molecular Genetics, Proteomics
and Bioinformatics in Agriculture Research
Institute of Agriculture of Crimea,
150, Kievskaya St., Simferopol, 295453,
Russian Federation,

295453, г. Симферополь, ул. Киевская, 150,
Российская Федерация,
e-mail: solanum@ukr.net

e-mail: solanum@ukr.net

Панов Денис Александрович,

к.х.н., доцент кафедры общей
и физической химии,
Крымский федеральный университет
им. В.И. Вернадского,
295007, г. Симферополь,
пр-т Академика Вернадского, 4,
Российская Федерация,
e-mail: panovda@cfuv.ru

Denis A. Panov,

Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Department of General and Physical Chemistry,
V.I. Vernadsky Crimean Federal University,
4, Academician Vernadsky Ave.,
Simferopol, 295007,
Russian Federation,
e-mail: panovda@cfuv.ru

Бугара Игорь Александрович,

к.б.н., доцент кафедры ботаники
и физиологии растений и биотехнологий,
Крымский федеральный университет
им. В.И. Вернадского,
295007, г. Симферополь,
пр-т Академика Вернадского, 4,
Российская Федерация,
e-mail: bia.05@mail.ru

Igor A. Bugara,

Cand. Sci. (Biology), Associate Professor,
Department of Botany and Physiology
of Plants and Biotechnology,
V.I. Vernadsky Crimean Federal University,
4, Academician Vernadsky Ave.,
Simferopol, 295007,
Russian Federation,
e-mail: bia.05@mail.ru

Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

Conflict interests

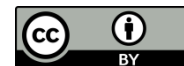
The authors declare no conflict of interests re-
garding the publication of this article.

*Авторы прочитали и одобрили окончатель-
ный вариант рукописи.*

*The final manuscript has been read and approved
by all the co-authors.*

*Поступила в редакцию 18.01.2020.
Одобрена после рецензирования 23.02.2020.
Принята к публикации 28.02.2021.*

*The article was submitted 18.01.2020.
Approved after reviewing 23.02.2020.
Accepted for publication 28.02.2021.*



Успехи и достижения научной школы академика АН Республики Башкортостан Д.Л. Рахманкулова в области прикладной и нефтепромысловой химии

© Н.Н. Михайлова, А.В. Мамлиева, Г.А. Тептерева,
С.Ю. Шавшукова, С.С. Злотский

Уфимский государственный нефтяной технический университет,
г. Уфа, Российская Федерация

Резюме: В обзоре представлены достижения научной школы академика Академии наук Республики Башкортостан, профессора Уфимского нефтяного института (ныне УГНТУ) Д.Л. Рахманкулова в области прикладной и нефтепромысловой химии. Создав фундаментальную базу результатов теоретических и экспериментальных исследований строения, свойств и механизмов превращений замещенных циклических ацеталей и гетероаналогов, научная школа предложила использовать полученные результаты в различных отраслях народного хозяйства, в частности, в нефтепромысловой химии. Анализ авторских свидетельств, полученных представителями научной школы с 1970-х по 1990-е годы, связанных с разработкой реагентов класса циклических ацеталей, предназначенных для применения в нефтепромысловой химии, показал, что полученные реагенты могут эффективно применяться в качестве компонентов буровых растворов, ингибиторов сероводородной коррозии нефтепромыслового оборудования, реагентов-бактерицидов, подавляющих рост сульфатовосстанавливающих бактерий. При этом эффективность их применения заметно превышала аналогичные показатели известных промышленных реагентов. Отмечено, что водные композиции, содержащие 1,3-диоксациклоалканы, хорошо растворяют и удерживают в объеме частицы смол и асфальтенов в виде микроэмульсий, что позволяет повысить нефтеотдачу пластов и использовать циклические ацетали в качестве реагентов-растворителей асфальтосмолопарафиновых отложений. Найдено, что применение циклических ацеталей, например 4,4-диметил-1,3-диоксана, в составе буровых промывочных жидкостей позволяет значительно улучшить их смазочные, противоизносные и антикоррозионные свойства. В качестве сырьевого источника для получения соединений класса циклических ацеталей часто использовали побочные продукты нефтехимических производств, что одновременно решало проблему их утилизации. Так, было найдено, что кубовый остаток промышленного производства 4,4-диметил-1,3-диоксана, содержащий оксиметил-1,3-диоксаны, может успешно применяться для растворения гипсово-углеводородных отложений в нефтяных скважинах. Для расширения ассортимента реагентов, подавляющих рост сульфатовосстанавливающих бактерий, Д.Л. Рахманкуловым с сотрудниками было предложено использовать в качестве бактерицидов водные растворы 1,3-диоксациклоалканов.

Ключевые слова: циклические ацетали, сульфатовосстанавливающие бактерии, асфальтосмолопарафиновые вещества, нефтепромысловая химия, методы увеличения нефтеотдачи

Для цитирования: Михайлова Н.Н., Мамлиева А.В., Тептерева Г.А., Шавшукова С.Ю., Злотский С.С. Успехи и достижения научной школы академика АН Республики Башкортостан Д.Л. Рахманкулова в области прикладной и нефтепромысловой химии. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т. 11. N 1. С. 136–146. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-136-146>

Advances and achievements of Academician D.L. Rakhmankulov's scientific school in the field of applied and oilfield chemistry

Natalia N. Mikhailova, Albina V. Mamlieva, Galina A. Teptereva,
Svetlana Yu. Shavshukova, Semyon S. Zlotskii

Ufa State Petroleum Technological University,
Ufa, Russian Federation

Abstract: This paper reviews the achievements of the scientific school of Academician of the Academy of Sciences of the Republic of Bashkortostan, Professor of the Ufa State Petroleum Technological University

(USPTU) D.L. Rakhmankulov in the field of applied and oilfield chemistry. Having achieved fundamental results during theoretical and experimental research into the structure, properties and mechanisms of transformations of substituted cyclic acetals and heteroanalogues, D.L. Rakhmankulov and his colleagues proposed to apply this knowledge in various sectors of the national economy, in particular, in the oilfield chemistry. An analysis of copyright certificates obtained by the researchers from the 1970s to the 1990s, which were related to the development of reagents of the class of cyclic acetals intended for use in the oilfield chemistry, showed that the obtained reagents can be effectively used as components of drilling fluids, inhibitors of hydrogen sulphide corrosion of oilfield equipment, bactericidal reagents that inhibit the growth of sulphate-reducing bacteria. The efficiency of such reagents significantly exceeded that of well-known industrial reagents. It was noted that aqueous compositions containing 1,3-dioxacycloalkanes dissolve and keep in volume particles of resins and asphaltenes in the form of microemulsions, which makes it possible to increase oil recovery and use cyclic acetals as reagents-solvents of asphalt-resin-paraffin deposits. It was found that the use of cyclic acetals, e.g. 4,4-dimethyl-1,3-dioxane, in the composition of drilling fluids can significantly improve their lubricating, antiwear and anticorrosive properties. By-products of petrochemical industries were often used as a raw material for the production of compounds of the class of cyclic acetals, which at the same time solved the problem of their recycling. It was found that the bottom residue of industrial production of 4,4-dimethyl-1,3-dioxane, containing oxymethyl-1,3-dioxanes, can be successfully used for dissolving gypsum hydrocarbon fuels deposited in oil wells. In order to expand the range of reagents that inhibit the growth of sulphate-reducing bacteria, D.L. Rakhmankulov and his colleagues proposed to use aqueous solutions of 1,3-dioxacycloalkanes as bactericides.

Keywords: cyclic acetals, sulphate-reducing bacteria, asphalt-resin-paraffin substances, oilfield chemistry, enhanced oil recovery methods

For citation: Mikhailova NN, Mamlieva AV, Teptereva GA, Shavshukova SYu, Zlotskii SS. Advances and achievements of Academician D.L. Rakhmankulov's scientific school in the field of applied and oilfield chemistry. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya* = *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(1):136–146. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-136-146>

ВВЕДЕНИЕ

В Уфимском нефтяном институте – УНИ (с 1993 г. Уфимский государственный нефтяной технический университет – УГНТУ) в 70-х гг. XX в. на кафедре общей химии профессором Д.Л. Рахманкуловым была создана научная школа в области органического синтеза, нефтехимии, прикладной и нефтепромысловой химии. Основные работы Д.Л. Рахманкулова с сотрудниками были посвящены методам получения, строению, свойствам и областям эффективного применения замещенных 1,3-диоксациклоалканов, их аналогов и производных [1, 2].

Результаты фундаментальных исследований в области синтеза, строения и превращений насыщенных гетероциклов рассмотрены в ряде обзоров, монографий и других работ^{1,2} [3–10].

Продолжая обобщение и систематизацию деятельности научной школы Д.Л. Рахманкулова, мы приводим в настоящей статье основные результаты по применению циклических ацеталей в прикладной и нефтепромысловой химии.

В 70-х гг. XX в. в отечественном топливно-энергетическом комплексе остро встала про-

блема увеличения нефтеотдачи месторождений, эксплуатирующихся более 30-40 лет [11–13]. В первую очередь это касалось нефтяных районов Волго-Уральского региона (Республики Татарстан и Башкортостан, Самарская, Оренбургская, Пермская области и др.) [14–16].

Известные и широко используемые методы увеличения нефтеотдачи (МУН) включали применение многокомпонентных водных составов для обработки (промывки) призабойных зон с целью разрушения гипсо-углеводородных отложений и, как следствие, увеличения проницаемости пластов. В качестве основных компонентов промывочных жидкостей использовались минеральные и органические кислоты, ингибиторы коррозии, поверхностно-активные вещества (ПАВ) и др.³ [17].

В научной школе проф. Д.Л. Рахманкулова в Уфимском государственном нефтяном техническом университете начиная с 1970-х гг. были детально исследованы методы получения, строение и свойства широкого круга замещенных 1,3-диоксациклоалканов (алкил-, арил-, алкенил-, хлорметил-, оксиметилпроизводные и др.) [18–22]. Исходя из

¹Рахманкулов Д.Л., Зорин В.В., Мусавилов Р.С., Латыпова Ф.Н., Сираева И.Н. Методы синтеза 1,3-дигетероаналогов циклоалканов: учеб. пособие. Уфа: Реактив, 1998. 254 с.

²Кульневич В.Г., Калашников В.Г., Косулина Т.П., Ненько Н.И., Смоляков В.П., Рахманкулов Д.Л. [и др.]. Новые направления в химии циклических ацеталей: учеб. пособие. Серия: Панорама современной химии России. Уфа: Реактив, 2002. 177 с.

³Банникова О.Ю. Совершенствование технологии приготовления и применения буровых растворов на основе сухих полимерных смесей: дис. ... канд. техн. наук: 25.00.15. Бугульма, 2015. 210 с.

этих результатов, проф. Д.Л. Рахманкулов совместно с сотрудниками УГНТУ, специалистами в области добычи нефти В.И. Мархасиным, Б.И. Мастобаевым, С.Г. Конесевым и другими изучили и обосновали применение в качестве добавок-присадок к водным составам некоторых циклических ацеталей и их производных.

Д.Л. Рахманкулов с сотрудниками нашли, что растворитель для очистки призабойной зоны терригенных пластов в газовых скважинах, который представлял собой 1–5%-й водный раствор 4,4-диметил-1,3-диоксана (ДМД), способен эффективно удалять фильтрат глинистого раствора [23]. Было установлено, что положительный эффект достигался за счет отсутствия у ДМД пенообразующей способности и склонности к образованию стойкой эмульсии. Этим ДМД выгодно отличался от широко применяемых в то время ПАВ – смеси оксиэтилированных алкилфенолов. Лучшие результаты были получены при использовании 3%-го водного раствора ДМД, который в 2–2,5 раза эффективнее удалял фильтрат глинистого раствора по сравнению с аналогичным раствором ОП-10.

Для повышения эффективности вытеснения нефти из пласта необходимо разрушать асфальтосмолопарафиновые вещества (АСПО) которые осаждаются на поверхности металла и забивают межтрубное пространство [24].

Д.Л. Рахманкулов с сотрудниками показали, что водные композиции, содержащие ДМД (концентрация 25–40% об.) хорошо растворяют и удерживают в объеме в виде микроэмульсий частицы смол и асфальтенов. Это позволило повысить коэффициент извлечения нефти в 1,5–2 раза для терригенных и карбонатных коллекторов [25].

Известно, что АСПО накапливаются в призабойных зонах водонагнетательных скважин, что затрудняет процессы обводнения и приводит к снижению нефтеотдачи [26, 27]. Было установлено, что удаление АСПО водным раствором ДМД (концентрация 1–5%) в ряде случаев улучшало приемистость водонагнетательных скважин. Максимальный эффект достигался при последовательной обработке ствола скважины чистым ДМД с последующим закачиванием 5%-го водного раствора ДМД [28]. В лабораторных экспериментах было доказано, что ДМД в этих условиях проникал в нефть и снижал ее вязкость. Под действием ДМД высокомолекулярные парафины и асфальтены растворялись за 2–3 ч, тогда как при использовании керосина для достижения аналогичного эффекта требовалось более 200 ч⁴.

Был предложен состав для удаления АСПО, ос-

новными компонентами которого являлись диацетат этиленгликоля, диэтилформаль и 1,3-диоксолан. При его применении достигалась степень растворения АСПО более 85%, тогда как в этих условиях смесь керосина и CCl_4 обеспечивала степень растворения АСПО на 50% [29]. Предложенный состав не содержал четыреххлористый углерод, выделяющий свободный хлор и хлористый водород, благодаря чему не происходило интенсивной коррозии технологического оборудования и загрязнения окружающей среды.

Эффективной оказалась замена CCl_4 в известной композиции (керосин, 80% : CCl_4 , 20%) на различные производные 1,3-диоксана [30]. Использование этих реагентов обеспечивало степень растворения АСПО более 70%, тогда как у прототипа она не превышала 50%.

На базе дешевого пиперилена Д.Л. Рахманкулов с сотрудниками была получена смесь алкенил-1,3-диоксанов, которая на 94% разрушала АСПО. Промышленный реагент – смесь керосина и ацетона (65:35), в этих условиях в 3 раза менее активен. Дополнительными преимуществами алкенил-1,3-диоксанов являются низкие летучесть и взрывоопасность [31].

С целью расширения ассортимента реагентов, способных эффективно растворять АСПО, были рассмотрены и другие классы органических веществ. Так, побочный продукт производства изопрена из ДМД – 4-метил-5,6-дигидро[2Н]пиран, также оказался хорошим растворителем АСПО. Было показано, что его применение приводит к разрушению АСПО и он имеет ряд преимуществ перед композицией керосин–ацетон [32].

Промышленные бис-амины также оказались способны на 75–85% растворять АСПО. Лучшие результаты были получены при использовании тетраметил- и тетраэтил-бис-аминов [33].

В работах Д.Л. Рахманкулова и его коллег, посвященных квалифицированному использованию побочных продуктов нефтехимии, отмечалось, что растворители, содержащие полихлоралканы и 1,3-диоксаны способны растворять АСПО на 85–90% за 1 ч. Однако образование HCl и увеличение скорости коррозии не позволяют рассматривать их в качестве промышленных реагентов [34, 35].

В процессах бурения для промывки и продувки скважин применяются многокомпонентные растворы и газообразные смеси⁵. Было предложено в качестве добавок в буровые растворы использовать некоторые циклические ацетали. Для промывки скважин в условиях сероводородной коррозии была доказана эффективность использования 4-фенил-1,3-диоксана (ФД) в диа-

⁴Пешкин О.В. Экспериментальное обоснование применения ацеталей для увеличения приемистости водонагнетательных скважин разрезающих рядов: дис. ... канд. техн. наук. Уфа, 1983.

⁵Рыбальченко Ю.М. Разработка промывочной жидкости для бурения разведочных скважин в осложненных условиях: дис. ... канд. техн. наук: 25.00.14. Москва, 2009. 149 с.

пазоне концентраций 0,05–0,10% масс. Было установлено, что при использовании ФД по сравнению с известными присадками скорость разрушения стали в условиях сероводородной коррозии снижалась в 2–2,5 раза [36].

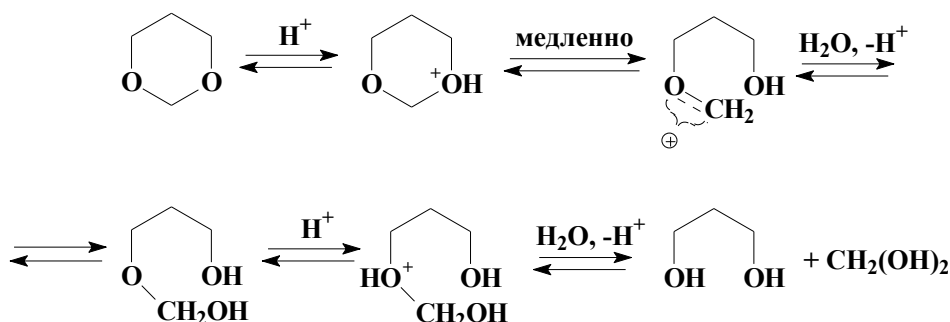
Применение 4-метил-4-фенил-1,3-диоксана (МФД), усиливало смазочные и противоизносные свойства бурового раствора [37]. При этом антикоррозионные свойства промывочных жидкостей, содержащих МФД в концентрации от 0,1 до 0,4%, на 80–90% выше, чем с добавкой ФД.

Было показано, что при использовании в качестве добавки ДМД в концентрации 0,8–1,2% об. улучшались смазочные и противоизносные свойства промывочных жидкостей при одновременном повышении антикоррозионных свойств [38]. Доказано повышение степени защиты металлов и оборудования от сероводородной коррозии на 90% по сравнению с традиционным ПАВ – ОП-10.

Д.Л. Рахманкулов с сотрудниками нашли, что кубовый остаток промышленного производства ДМД, содержащий оксиметил-1,3-диоксаны, может успешно применяться в качестве стимулято-

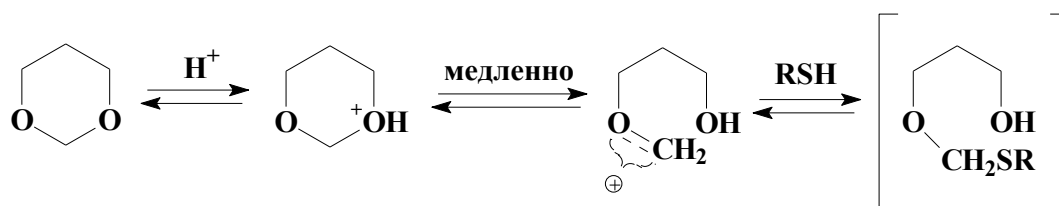
ра растворения гипсово-углеводородных отложений [39]. Использование реагента, представляющего собой 8%-й водный HCl с добавкой 0,25–0,3% кубового остатка, повышало скорость растворения гипсово-углеводородных отложений в 3 раза (с 3,2 г/мин до 9,0 г/мин) и обеспечивало защиту от коррозии на 90–95%.

Из приведенных данных следует, что положительный эффект в нефтепромысловой химии достигается при использовании водных и водно-органических растворов, содержащих циклические ацетали. В этой связи Д.Л. Рахманкуловым было проведено комплексное изучение кислотного гидролиза циклических ацеталей. Наиболее важные результаты в этой области были получены ведущим сотрудником научной школы профессором Е.А. Кантором. Им было установлено, что лимитирующей стадией кислотного гидролиза 1,3-диоксациклов является гетеролитический разрыв C(2)-O углерод-кислородной связи. Равновесие между циклическими ацеталами и гликолями зависит от температуры, кислотности среды и заместителей в цикле [7, 19, 22, 40, 41].



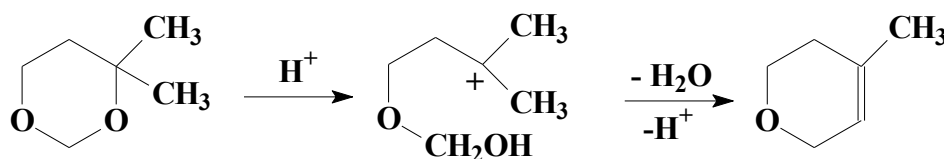
Растворенный сероводород и меркаптаны разлагают 1,3-диоксациклоалканы до гликолей и линейных тиацеталей. При этом расщепление

цикла также является стадией, определяющей скорость процесса.



Одним из наиболее активных реагентов является 4,4-диметил-1,3-диоксан, поскольку распад его протонированной формы может сопро-

вождаться образованием третичного карбокатиона, способного участвовать в процессе образования дигидропиранов.



Приведенные реакции являются ответственными за присутствие в кислых водных растворах циклических ацеталей спиртов и непредельных соединений. Последние способны на поверхности металлов образовывать защитные пленки. Органические гидроксилсодержащие соединения обладают поверхностно-активными свойствами и снижают пенообразование. Этим объясняется эффективность применения циклических ацеталей в нефтепромышленной химии.

В процессах бурения скважин и заводнения нефтяных пластов происходит внесение в пласт микроорганизмов различных физиологических групп, в частности сульфатовосстанавливающих бактерий (СВБ), продуцирующих в результате своей деятельности сероводород [42]. Их наличие вызывает большие проблемы при разработке нефтяных месторождений. С целью расширения ассортимента реагентов, подавляющих рост сульфатовосстанавливающих бактерий Д.Л. Рахманкулов с сотрудниками предложили в качестве бактерицида водный раствор пропиламиноэтанола в концентрации 0,05–0,1% масс. При его использовании происходило 100%-е подавление роста СВБ, тогда как известный реагент акролеин в этих же условиях подавлял рост лишь на 63% [43]. Исследования показали, что для подавления жизнедеятельности сульфатовосстанавливающих бактерий было целесообразно использовать ДМД, который при концентрации 0,01% позволял достигать 80%-й степени подавления роста СВБ [44].

Побочный продукт расщепления ДМД в изопрен – 4-метил-5,6-дигидропиран (МДГП), также

оказался хорошим реагентом для подавления роста СВБ [45]. При минимальной концентрации 0,001 г/л он подавлял рост сульфатовосстанавливающих бактерий на 78%.

Среди аналогов циклических ацеталей Д.Л. Рахманкуловым с сотрудниками были найдены вещества класса замещенных 1,3-оксазоциклоалканов, обладающие высокими бактерицидными свойствами [36]. Практически полное подавление роста СВБ достигалось при концентрации замещенных 1,3-оксазоциклоалканов 50–500 мг/л в воде, закачиваемой в пласт. Кроме того, эти реагенты и МДГП предотвращали сероводородную и микробиологическую коррозию, что позволяло в 2–3 раза сократить частоту аварийных ситуаций при эксплуатации нефтепромышленного оборудования.

3-Циклогексил-5-хлорметил-1,3-оксазолидин показал 100%-ю степень подавления СВБ при концентрации 0,1% масс., тогда как при использовании прототипа – 2,4-дихлорфенола, степень подавления не превышала 56% [47].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из приведенных данных следует, что замещенные 1,3-дигетероциклоалканы благодаря способности хорошо совмещаться с водно-органическими средами и растворять смолы и нефтеполимеры представляют большой интерес в качестве реагентов и компонентов в нефтепромышленной химии. Соединения этого ряда способны подавлять рост СВБ, что дополнительно определяет их преимущества по сравнению с известными материалами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вильданов Ф.Ш., Чанышев Р.Р., Латыпова Ф.Н., Злотский С.С. Химия ацеталей и их аналогов в работах научной школы Д.Л. Рахманкулова. Уфа: Гилем, 2015. 272 с.
2. Злотский С.С., Латыпова Ф.Н., Шавшукова С.Ю., Михайлова Н.Н. Результаты и перспективы научно-педагогической деятельности кафедры общей химии УНИ–УГНТУ за 50 лет. Уфа: Башкирская энциклопедия, 2020. 88 с.
3. Латыпова Ф.Н., Вильданов Ф.Ш., Чанышев Р.Р., Злотский С.С. Химия циклических ацеталей и их аналогов в работах научной школы Д.Л. Рахманкулова // Известия высших учебных заведений. Серия: Химия и химическая технология. 2015. Т. 58. № 8. С. 3–21.
4. Рахманкулов Д.Л., Бикбулатов И.Х., Шулаев Н.С., Шавшукова С.Ю. Интенсификация химических процессов в научных исследованиях и промышленности под воздействием микроволнового излучения. М.: Химия, 2003. 222 с.
5. Рахманкулов Д.Л., Злотский С.С., Зорин В.В., Сафиев О.Г., Сираева И.Н., Рольник Л.З. Межфазный катализ в химии 1,3-диоксацикла-
- нов. М.: Химия, 1993. 96 с.
6. Прогресс химии кислородсодержащих гетероциклов: сб. ст. / ред. Я. Ковач; сост. Д.Л. Рахманкулов, Я. Ковач, А. Крутошикова, Д. Иловский, С.С. Злотский, Л.З. Рольник [и др.]. Уфа: Реактив, 1992. 152 с.
7. Рахманкулов Д.Л., Злотский С.С., Кантор Е.А., Сафаров М.Г., Заиков Г.Е., Зорин В.В. [и др.]. Механизмы реакций ацеталей. М.: Химия, 1987. 291 с.
8. Синтез и биологическая активность 1,3-дигетероциклоалканов / сост. Д.Л. Рахманкулов, Ф.Н. Латыпова, С.С. Злотский [и др.]. М.: НИИТЭХим, 1985. 24 с.
9. Rakhmankulov D.L., Zlatskii S.S., Zorin V.V., Imashev U.B., Karakhanov R.A. Radical-chain reactions of acetals in solution // Russian Chemical Reviews. 2981. Vol. 50. Issue 8. P. 762–774.
10. Rakhmankulov D.L., Zorin V.V., Latypova F.N., Zlatskii S.S., Karakhanov R.A. The synthesis, structure, and reactions of 1, 3-oxathiacycloalkanes // Russian Chemical Reviews. 1983. Vol. 52. Issue 4. P. 350–360. <https://doi.org/1>

0.1070/RC1983v052n04ABEN002822

11. Алтунина Л.К., Кувшинов В.А. Увеличение нефтеотдачи месторождений на поздней стадии разработки физико-химическими методами // Нефть. Газ. Новации. 2013. N 8 (175). С. 18–25.

12. Птицин Н.П., Сырятов Р.В., Касимов А.С. Методы увеличения нефтеотдачи на месторождениях с трудноизвлекаемыми запасами углеводородов // Новая наука: Стратегии и векторы развития. 2015. N 6-2. С. 129–131.

13. Коршунов Н.В. Методы увеличения нефтеотдачи на нефтяных месторождениях: преимущества и недостатки, область применения // Современные инновации. 2019. N 6 (34). С. 16–18.

14. Павельева О.Н. Применение современных методов увеличения нефтеотдачи на примере месторождений центра Оренбургской области // Новые технологии – нефтегазовому региону: материалы Всерос. с междунар. участием науч.-практ. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых. Т. 1. Тюмень: ТюмГНГУ, 2015. С. 118–122.

15. Султанов Ш.Х., Андреев В.Е. Структура запасов и перспективы увеличения нефтеотдачи месторождений Дюргюлинской группы с применением микробиологических методов: тез. докл. 3-й Международной конференции по химии нефти (Томск, 02–05 декабря 1997 г.). Томск: Издательство Института химии нефти СО РАН, 1997. С. 15-16.

16. Беляева А.С., Никитина А.А., Кунакова Р.В., Мовсум-заде Э.М. Хронология развития и применения методов увеличения нефтеотдачи пластов на примере месторождений республики Башкортостан // Известия высших учебных заведений. Серия: Химия и химическая технология. 2016. Т. 59. N 4. С. 88–93.

17. Воробьев А.Е., Щесняк К.Е. Повышение нефтеотдачи на основе кислотной обработки продуктивного пласта // Вестник Атырауского университета нефти и газа им. С. Утебаева. 2019. N 2 (50). С. 7–19.

18. Рахманкулов Д.Л., Злотский С.С., Узикова В.Н., Исагулянц В.И. Радиальная изомеризация циклических ацеталей пентаэритрита // Журнал органической химии. 1973. Т. 9. N 6. С. 1309.

19. Рахманкулов Д.Л., Максимова Н.Е., Костюкевич Л.Л., Кантор Е.А., Злотский С.С., Королева Т.И. Взаимодействие пяти-, шести- и семичленных циклических ацеталей с n-амиловым спиртом в присутствии катионита КУ-2 // N 6. С. 1410–1411.

20. Кравец Э.Х., Злотский С.С., Мартемьянов В.С., Рахманкулов Д.Л. Жидкофазная свободнорадикальная изомеризация циклических ацеталей // Химия гетероциклических соединений. 1976. Т. 12. N 9. С. 1171–1176.

21. Брудник Б.М., Злотский С.С., Имашев У.Б., Рахманкулов Д.Л. Влияние строения на реакционную способность циклических ацеталей в реакции с озоном // Доклады Академии наук

СССР. 1978. Т. 241. N 1. С. 129–131.

22. Рахманкулов Д.Л., Мусавилов Р.С., Кантор Е.А., Мартемьянов В.С. Кинетика взаимодействия 2-изопропил-4-метил-1,3-диоксана с 4-метил-1,3-диоксоланом // Reaction Kinetics and Catalysis Letters. 1980. Т. 14. N 2. 175–180. <https://doi.org/10.1007/BF02061283>

23. Авт. св. SU 1027373 A1. Реагент для очистки призабойной зоны терригенных пластов в газовых скважинах / О.В. Пешкин, В.И. Мархасин, В.И. Павлюченко, С.С. Злотский, У.Б. Имашев, Д.Л. Рахманкулов [и др.]; заявитель Уфимский нефтяной институт; заявл. 30.10.1981; опубл. 07.07.1983.

24. Шарафиева Р.Р., Умарова Н.Н. Разработка композиционного состава для удаления асфальтосмолопарафиновых отложений методами математического планирования эксперимента // Вестник Технологического университета. 2018. Т. 21. N 5. С. 182–186.

25. Авт. св. SU 1609980 A1. Микроэмульсия для вытеснения нефти / Д.З. Шаихов, О.В. Пешкин, В.И. Павлюченко, С.С. Злотский, Д.Л. Рахманкулов; заявитель Уфимский нефтяной институт; заявл. 11.08.1988; опубл. 30.11.1990.

26. Ты Т.Н., Велиев М.М., Ле В.З. Удаление асфальтосмолопарафиновых отложений воздействием различных кислотнo-щелочных систем на газожидкостный поток // Проблемы сбора, подготовки и транспорта нефти и нефтепродуктов. 2014. N 2 (96). С. 97–106.

27. Пат. № 2552434, Российская Федерация. Состав для удаления отложений из нефтяных скважин и призабойной зоны пласта / Л.К. Алтунина, В.А. Кувшинов, Н.И. Родионова; патенто-обладатель Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химии нефти СО РАН; заявл. 17.04.2014; опубл. 10.06.2015. Бюл. № 16.

28. Авт. св. SU 1283359 A1, Российская Федерация. Способ обработки призабойной зоны водонагнетательных скважин / О.В. Пешкин, В.И. Мархасин, Д.Л. Рахманкулов, В.В. Девликамов, Р.М. Еникеев, С.С. Злотский [и др.]; заявитель Уфимский нефтяной институт; заявл. 21.06.1985; опубл. 15.01.1987. Бюл. № 2.

29. Авт. св. SU 655715 A1. Состав для удаления смолисто-асфальтеновых отложений / У.М. Байков, Ш.С. Гарифуллин, Р.Х. Хазипов, Н.Н. Силищев, Д.Л. Рахманкулов, Е.А. Кантор [и др.]; заявители Башкирский государственный научно-исследовательский и проектный институт нефтяной промышленности и Уфимский нефтяной институт; заявл. 06.07.1977; опубл. 05.04.1979. Бюл. № 13.

30. Авт. св. SU 707954 A1. Состав для удаления смолисто-асфальтеновых отложений / У.М. Байков, Ш.С. Гарифуллин, Р.Х. Хазипов, Д.Л. Рахманкулов, Н.Н. Силищев, Е.А. Кантор; заявители Башкирский государственный научно-

исследовательский и проектный институт нефтяной промышленности и Уфимский нефтяной институт; заявл. 22.09.1977; опубл. 05.01.1980.

31. Авт. св. SU 662700 A1. Реагент для удаления смолисто-асфальтовых отложений / Р.Х. Хазипов, Н.Н. Силищев, У.Б. Имашев, В.Я. Щекотурова, Д.Л. Рахманкулов; заявители Башкирский государственный научно-исследовательский и проектный институт нефтяной промышленности и Уфимский нефтяной институт; заявл. 25.01.1978; опубл. 15.05.1979

32. Авт. св. SU 715602 A1. Реагент для удаления асфальто-смолистых и парафинистых отложений / Р.Х. Хазипов, Н.Н. Силищев, М.Г. Герасимова, Д.Л. Рахманкулов, Л.А. Сыркин, Е.А. Кантор [и др.]; заявители Башкирский государственный научно-исследовательский и проектный институт нефтяной промышленности и Уфимский нефтяной институт; заявл. 28.07.1978; опубл. 15.02.1980.

33. Авт. св. SU 730784 A1. Реагент для удаления смолисто-асфальтовых и парафинистых отложений / У.Б. Имашев, Р.Х. Хазипов, М.Г. Герасимова, С.А. Агишева, Д.Л. Рахманкулов; заявители Уфимский нефтяной институт и Башкирский государственный научно-исследовательский и проектный институт нефтяной промышленности; заявл. 13.10.1978; опубл. 30.04.1980.

34. Авт. св. SU 791942 A1. Реагент для удаления асфальто-смолистых и парафинистых отложений / У.М. Байков, Ш.С. Гарифуллин, Р.Х. Хазипов, Н.Н. Силищев, Ю.Д. Морозов, Д.Л. Рахманкулов [и др.]; заявители Башкирский государственный научно-исследовательский и проектный институт нефтяной промышленности и Уфимский нефтяной институт; заявл. 19.12.1977; опубл. 30.12.1980.

35. Авт. св. SU 651119 A1. Состав для удаления асфальто-смолистых и парафинистых отложений / У.М. Байков, Ш.С. Гарифуллин, Р.Х. Хазипов, Н.Н. Силищев, Д.Л. Рахманкулов, А.М. Сыркин А.М. [и др.]; заявители Башкирский государственный научно-исследовательский и проектный институт нефтяной промышленности и Уфимский нефтяной институт; заявл. 16.11.1977; опубл. 05.03.1979.

36. Авторское свидетельство SU 1303604 A1. Буровой раствор / Г.В. Конесев, М.Р. Мавлютов, В.Р. Рахматуллин, Д.Л. Рахманкулов, Г.К. Чуктуров, Р.Р. Хабибуллин [и др.]; заявитель Уфимский нефтяной институт; заявл. 25.12.1984; опубл. 15.04.1987. Бюл. № 14.

37. Авторское свидетельство SU 1379303 A1. Промывочная жидкость / В.Р. Рахматуллин, А.И. Спивак, М.Р. Мавлютов, Д.Л. Рахманкулов, Г.В. Конесев, З.М. Шахмаев [и др.]; заявители Уфимский институт нефти и Производственное объединение «Башнефть»; заявл. 26.03.1986; опубл. 07.03.1988. Бюл. № 9.

38. Авт. св. SU 666194 A1. Промывочная

жидкость / М.Р. Мавлютов, Г.В. Конесев, А.А. Гареев, Д.Л. Рахманкулов, Р.Г. Ягафаров, С.С. Злотский [и др.]; заявитель Уфимский нефтяной институт; заявл. 02.06.1972; опубл. 05.06.1979.

39. Авт. св. SU 514011 A1. Стимулятор растворения гипсово-углеводородных отложений / Д.Л. Рахманкулов, В.Т. Пименова, М.А. Молявко, С.Т. Кочинашвили; заявитель Уфимский нефтяной институт; аявл. 12.08.1974; опубл. 15.05.1976. Бюл. № 18.

40. Рахманкулов Д.Л., Караханов Р.А., Злотский С.С., Кантор Е.А., Имашев У.Б., Сыркин А.М. Химия и технология 1,3-диоксациклоалканов. Итоги науки и техники. Сер. Технология органических веществ. Т. 5. М.: ВИНТИ РАН, 1979. 287 с.

41. Рахманкулов Д.Л., Кантор Е.А., Караханов Р.А. Кислотно-катализируемые превращения 1,3-диоксациклоанов в жидкой фазе. Алкоголиз. Тиолиз. Эфирилиз. // Основной органический синтез и нефтехимия. 1979. N 2. С. 3–4.

42. Булдакова Н.С., Новикова Н.В., Фахриева Г.В., Жуков А.Ю., Газизянова А.Р. Формирование подходов к подбору бактерицидов для подавления жизнедеятельности сульфатовосстанавливающих бактерий // Нефтепромысловое дело. 2020. N 6 (618). С. 68–72. [https://doi.org/10.30713/0207-2351-2020-6\(618\)-68-72](https://doi.org/10.30713/0207-2351-2020-6(618)-68-72)

43. Авт. св. SU 812742 A1. Реагент для предотвращения роста сульфатовосстанавливающих бактерий / Р.Х. Хазипов, Д.Л. Рахманкулов, С.С. Злотский, О.И. Матыцина, Т.П. Котова, В.В. Зорин [и др.]; заявители Башкирский государственный научно-исследовательский и проектный институт нефтяной промышленности и Уфимский нефтяной институт; заявл. 13.06.1979; опубл. 15.03.1981. Бюл. № 10.

44. Авт. св. SU 988776 A1. Реагент для подавления жизнедеятельности сульфатовосстанавливающих бактерий / В.И. Вавер, А.М. Беклемишева, Г.К. Каратаева, В.В. Зорин, В.Н. Узикова, С.С. Злотский [и др.]; заявители Уфимский нефтяной институт и Центральная научно-исследовательская лаборатория Производственного объединения «Нижневартовскнефтегаз»; заявл. 14.04.1981; опубл. 15.01.1983. Бюл. № 2.

45. Авт. св. SU 739218 A1. Реагент для предотвращения роста сульфатовосстанавливающих бактерий / Р.Х. Хазипов, Р.Н. Хлесткин, Д.Л. Рахманкулов, А.М. Сыркин, Е.А. Кантор, Н.В. Плошкина [и др.]; заявители Башкирский государственный научно-исследовательский и проектный институт нефтяной промышленности и Уфимский нефтяной институт; заявл. 20.06.1978; опубл. 05.06.1980. Бюл. № 21.

46. Авт. св. SU 986865 A1. Реагент для подавления сульфатовосстанавливающих бактерий / А.А. Лапшова, В.В. Зорин, В.Н. Узикова, С.С. Злотский, Д.Л. Рахманкулов, Р.А. Караха-

нов; заявитель Уфимский нефтяной институт; заявл. 02.06.1981; опубл. 07.01.1983. Бюл. № 1.

47. Авт. св. SU 1211258 A1. 3-Циклогексил-5-хлорметил-1,3-оксазолидин в качестве бактерицида для подавления роста сульфатовосстанавливающих бактерий и способ его получения / Е.С. Курмаева, О.Б. Чалова, Р.Х. Хазипов,

Т.К. Киладзе, Е.А. Кантор, Д.Л. Рахманкулов; заявители Башкирский государственный научно-исследовательский и проектный институт нефтяной промышленности и Уфимский нефтяной институт; заявл. 31.08.1983; опубл. 15.02.1986. Бюл. № 6.

REFERENCES

1. Vil'danov FSh, Chanyshv RR, Latypova FN, Zlotskii SS. *Chemistry of acetals and their analogs in the works of D.L. Rakhmankulov scientific school*. Ufa: Gilem; 2015. 272 p. (In Russian)
2. Zlotskii SS, Latypova FN, Shavshukova SYu, Mikhailova NN. *Results and prospects of scientific and pedagogical activities of the Department of General Chemistry UNI – USPTU for 50 years*. Ufa: Bashkirskaia entsiklopediya; 2020. 88 p. (In Russian)
3. Latypova FN, Vil'danov FSh, Chanyshv RR, Zlotskii SS. Chemistry of cyclic acetals and their analogs in the works of D.L. Rakhmankulov scientific school. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedenii, seriya khimiya i khimicheskaya tekhnologiya = Russian Journal of Chemistry and Chemical Technology*. 2015;58(8):3–21. (In Russian)
4. Rakhmankulov DL, Bikbulatov IKh, Shulaev NS, Shavshukova SYu. *Intensification of chemical processes in scientific research and industry under the influence of microwave radiation*. Moscow: Khimiya; 2003. 222 p. (In Russian)
5. Rakhmankulov DL, Zlotskii SS, Zorin VV, Safiev OG, Siraeva IN, Rol'nik LZ. *Phase transfer catalysis in 1,3-dioxacyclanes chemistry*. Moscow: Khimiya; 1993. 96 p. (In Russian)
6. Rakhmankulov DL, Kovach Ya, Krutoshnikov A, Ilovskii D, Zlotskii SS, Rol'nik LZ, et al. *Progress in chemistry of oxygen-containing heterocycles*. Ufa: Reaktiv; 1992. 152 p. (In Russian)
7. Rakhmankulov DL, Zlotskii SS, Kantor EA, Safarov MG, Zaikov GE., Zorin VV, et al. *Acetal reaction mechanisms*. Moscow: Khimiya; 1987. 291 p. (In Russian)
8. Rakhmankulov DL, Latypova FN, Zlotskii SS, et al. *Synthesis and biological activity of 1,3-diheterocycloalkanes*. Moscow: NIITEKhim; 1985. 24 p. (In Russian)
9. Rakhmankulov DL, Zlotskii SS, Zorin VV, Imashev UB, Karakhanov RA. Radical-chain reactions of acetals in solution. *Russian Chemical Reviews*. 2018;87(8):762–774.
10. Rakhmankulov DL, Zorin VV, Latypova FN, Zlotskii SS, Karakhanov RA. The synthesis, structure, and reactions of 1, 3-oxathiacycloalkanes. *Russian Chemical Reviews*. 1983;52(4):350–360. <https://doi.org/10.1070/RC1983v052n04ABEH002822>
11. Altunina LK, Kuvshinov VA. Enhanced oil recovery for the fields at a late stage of their development by physical and chemical methods. *Neft'*. T.K. Kilaдзе, Е.А. Кантор, Д.Л. Рахманкулов; заявители Башкирский государственный научно-исследовательский и проектный институт нефтяной промышленности и Уфимский нефтяной институт; заявл. 31.08.1983; опубл. 15.02.1986. Бюл. № 6.
12. Ptitsin NP, Syryatov RV, Kasimov AS. Enhanced oil recovery methods in fields with hard-to-recover hydrocarbon reserves. *Novaya nauka: Strategii i vektory razvitiya*. 2015;6-2:129–131. (In Russian)
13. Korshunov NV. Enhanced oil recovery methods in oil fields: advantages and disadvantages, application. *Sovremennye innovatsii = Contemporary Innovations*. 2019;6:16–18. (In Russian)
14. Pavel'eva ON. Application of modern methods of enhanced oil recovery on the example of fields in the center of the Orenburg region In: *Novye tekhnologii – Neftegazovomu regionu: materialy Vserossiiskoi s mezhdunarodnym uchastiem nauchno-prakticheskoi konferentsii studentov, aspirantov i molodykh uchenykh* = New Technologies for the Oil and Gas Region: Proceedings of the All-Russian scientific and practical conference of students, postgraduates and young scientists with international participation. Tyumen: Izdatel'stvo Tyumenskogo neftegazovogo universiteta; 2015, vol.1, p. 118–122. (In Russian)
15. Sultanov ShKh, Andreev VE. Reserves structure and prospects for increasing oil recovery of the Dyurtyuli group fields using microbiological methods: *Tezisy dokladov tret'ei Mezhdunarodnoi konferentsii po khimii nefti* = Proceedings of the 3-rd International Conference on Petroleum Chemistry. 02–05 December 1997, Tomsk. Tomsk: Izdatel'stvo Instituta khimii nefti SO RAN, 1997, p. 15–16. (In Russian)
16. Belyaeva AS, Nikitina AA, Kunakova RV, Movsum-zade EM. Chronology of development and application of enhanced oil recovery methods on example of deposits of Republic of Bashkortostan. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedenij. Seriya: Khimiya i khimicheskaya tekhnologiya = ChemChemTech*. 2016;59(4):88–93. (In Russian)
17. Vorobiev AE, Sheshniak KE. Enhanced oil recovery based on acid treatment of the reservoir. *Vestnik Atyrauskogo universiteta nefti i gaza im. S. Utebaeva. = Proceedings of Atyrau Oil and Gas University*. 2019;2:7–19. (In Russian)
18. Rakhmankulov DL, Zlotskii SS, Uzikova VN, Isagulians VI. Radical isomerization of cyclic acetals of pentaerythritol. *Zhurnal organicheskoi khimii*. 1973;9(6):1309. (In Russian)
19. Rakhmankulov DL, Maksimova NE, Kosti-

ukevich LL, Kantor EA, Zlotskii SS, Koroleva TI. Interaction of five-, six- and seven-membered cyclic acetals with n-amyl alcohol in the presence of KU-2 cation exchanger. *Zhurnal prikladnoi khimii = Russian Journal of Applied Chemistry*. 1975;48(6):1410–1411. (In Russian)

20. Kravets EKh, Zlotskii SS, Martem'yanov VS, Rakhmankulov DL. Liquid-phase free-radical isomerization of cyclic acetals. *Khimiya geterotsiklicheskikh soedinenii*. 1976;12(9):1171–1176. (In Russian)

21. Brudnik BM, Zlotskii SS, Imashev UB, Rakhmankulov DL. Effect of structure on the reactivity of cyclic acetals in reaction with ozone. *Doklady Akademii nauk SSSR*. 1978;241(1):129–131. (In Russian)

22. Rakhmankulov DL, Musavirov RS, Kantor EA, Martem'yanov VS. Kinetics of 2-isopropyl-4-methyl-1,3-dioxane interaction with 4-methyl-1,3-dioxolane. *Reaction Kinetics and Catalysis Letters*. 1980;14(2):175–180. (In Russian) <https://doi.org/10.1007/BF02061283>

23. Peshkin OV, Markhasin VI, Pavlyuchenko VI, Zlotskii SS, Imashev UB, Rakhmankulov DL, et al. Agent for cleaning the bottomhole area of terrigenous formations in gas wells. Inventor's certificate USSR, no. SU 1027373 A1; 1983. (In Russian)

24. Sharafieva RR, Umarova NN. Developing a composition for removing asphaltic resinous paraffin deposits using mathematical experiment design methods. *Vestnik Tekhnologicheskogo universiteta = Bulletin of the Technological University*. 2018;21(5):182–186. (In Russian)

25. Shaikhov DZ, Peshkin OV, Pavlyuchenko VI, Zlotskii SS, Rakhmankulov DL. Microemulsion for displacing oil. Inventor's certificate USSR, no. SU 1609980 A1; 1990. (In Russian)

26. Ty TN, Veliev MM, Le VD. Asphalt-tar-wax deposit removal by gas-liquid flow treatment with various acid-alkali systems. *Problemy sbora, podgotovki i transporta nefti i nefteproduktov*. 2014;2:97–106. (In Russian)

27. Altunina LK, Kuvshinov VA, Rodionova NI. Composition for sediment removal from oil wells and reservoir bottomhole zone. Patent RF, no. RU 2552434 C1; 2014. (In Russian)

28. Peshkin OV, Markhasin VI, Rakhmankulov DL, Devlikamov VV, Enikeev RM, Zlotskii SS, et al. Method for treatment of bottomhole zone of water injection wells. Inventor's certificate USSR, no. SU 1283359 A1; 1987. (In Russian)

29. Baikov UM, Garifullin ShS, Khazipov RKH, Silishchev NN, Rakhmankulov DL, Kantor EA, et al. Composition for removing tar-asphaltene deposits. Inventor's certificate USSR, no. SU 655715 A1; 1979. (In Russian)

30. Baikov UM, Garifullin ShS, Khazipov RKH, Rakhmankulov DL, Silishchev NN, Kantor EA. Composition for removal of asphalt-resin-wax deposits. Inventor's certificate USSR, no. SU 707954

A1; 1980. (In Russian)

31. Khazipov RKH, Silishchev NN, Imashev UB, Shchekoturova VYa, Rakhmankulov DL. Reagent for removal of tar-asphaltene deposits. Inventor's certificate USSR, no. SU 662700 A1; 1980. (In Russian)

32. Khazipov RKH, Silishchev NN, Gerasimova MG, Rakhmankulov DL, Syrkin AM, Kantor EA. Reagent for removal of asphalt-tarry and paraffinic deposits. Inventor's certificate USSR, no. SU 715602 A1; 1980. (In Russian)

33. Imashev UB, Khazipov RKH, Gerasimova MG, Agisheva SA, Rakhmankulov DL. Reagent for removal of asphaltene sediments. Inventor's certificate USSR, no. SU 730784 A1; 1980. (In Russian)

34. Baikov UM, Garifullin ShS, Khazipov RKH, Silishchev NN, Morozov YuD, Rakhmankulov DL. Reagent for removal of asphaltene sediments. Inventor's certificate USSR, no. SU 791942 A1; 1980. (In Russian)

35. Baikov UM, Garifullin ShS, Khazipov RKH, Silishchev NN, Rakhmankulov DL, Syrkin AM, et al. Composition for removal of asphalt-resinous and paraffinic deposits. Inventor's certificate USSR, no. SU 651119 A1; 1979. (In Russian)

36. Konesev GV, Mavlyutov MR, Rakhmatullin VR, Rakhmankulov DL, Chukturov GK, Khabibullin RR, et al. Drilling mud. Inventor's certificate USSR, no. SU 1303604 A1; 1987. (In Russian)

37. Rakhmatullin VR, Spivak AI, Mavlyutov MR, Rakhmankulov DL, Konesev GV, Shakhmaev ZM, et al. Flushing liquid. Inventor's certificate USSR, no. SU 1379303 A1; 1988. (In Russian)

38. Mavlyutov MR, Konesev GV, Gareev AA, Rakhmankulov DL, Yagafarov RG, Zlotskii SS, et al. Flushing liquid. Inventor's certificate USSR, no. SU 666194 A1, 1979. (In Russian)

39. Rakhmankulov DL, Pimenova VT, Molyavko MA, Kochinashvili ST. Stimulator of dissolution of gypsum-hydrocarbon deposits. Inventor's certificate USSR, no. SU 514011 A1, 1976. (In Russian)

40. Rakhmankulov DL, Karakhanov RA, Zlotskii SS, Kantor EA, Imashev UB, Syrkin AM. Chemistry and technology of 1,3-dioxacycloalkanes. Results of Science and Technology. Series Technology of organic substances. Vol. 5. Moscow: VINITI RAN; 1979. 287 p. (In Russian)

41. Rakhmankulov DL, Kantor EA, Karakhanov RA. Acid-catalyzed transformations of 1,3-dioxacyclanes in the liquid phase. Alcoholysis. Thiols. Etherolysis. *Basic organic synthesis and petrochemistry*. 1979;2:3–4. (In Russian)

42. Buldakova NS, Novikova NV, Fakhrieveva GV, Zhukov AYU, Gazizyanova AR. Formation of approaches to the selection of bactericides to suppress the vital activity of sulphate-reducing bacteria. *Neftepromyslovoe delo = Oilfield Engineering*. 2020;6:68–72. (In Russian) [https://doi.org/10.30713/0207-2351-2020-6\(618\)-68-72](https://doi.org/10.30713/0207-2351-2020-6(618)-68-72)

43. Khazipov RKH, Rakhmankulov DL, Zlotskii

SS, Matytsina OI, Kotova TP, Zorin VV, et al. *Reagent for preventing growth of sulfate-reducing bacteria*. Inventor's certificate USSR, no. SU 812742 A1, 1981. (In Russian)

44. Vaver VI, Beklemisheva AM, Karataeva GK, Zorin VV, Uzikova VN, Zlotskii SS, et al. *Reagent for suppressing the vital activity of sulfate-reducing bacteria*. Inventor's certificate USSR, no. SU 988776 A1, 1983. (In Russian)

45. Khazipov RKh, Khlestkin RN, Rakhmankulov DL, Syrkin AM, Kantor EA, Ploshkina NV, et al. *Reagents for preventing growth of sulfate-reducing*

bacteria. Inventor's certificate USSR, no. SU 739218 A1, 1980. (In Russian)

46. Lapshova AA, Zorin VV, Uzikova VN, Zlotskii SS, Rakhmankulov DL, Karakhanov RA. *Reagent for inhibiting sulfate-reducing bacteria*. Inventor's certificate USSR, no. SU 986865 A1, 1983. (In Russian)

47. Kurmaeva ES, Chalova OB, Khazipov RKh, Kiladze TK, Kantor EA, Rakhmankulov DL. *3-Cyclohexyl-5-chloromethyl-1,3-oxazolidine as a bactericide for inhibiting growth of sulfate-reducing bacteria and a method for its preparation*. Inventor's certificate USSR, no. SU 1211258 A1, 1986. (In Russian)

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Михайлова Наталья Николаевна,

к.х.н., доцент,
Уфимский государственный нефтяной
технический университет,
450064, г. Уфа, ул. Космонавтов, 1,
Российская Федерация,
✉ e-mail: ximik2008@mail.ru

Мамлиева Альбина Вилевна,

аспирант,
Уфимский государственный нефтяной
технический университет,
450064, г. Уфа, ул. Космонавтов, 1,
Российская Федерация,
e-mail: albina.mamlieva@mail.ru

Тептерева Галина Алексеевна,

д.т.н., доцент,
Уфимский государственный нефтяной
технический университет,
450064, г. Уфа, ул. Космонавтов, 1,
Российская Федерация,
e-mail: teptereva.tga@yandex.ru

Шавшукова Светлана Юрьевна,

д.т.н., профессор кафедры общей,
аналитической и прикладной химии,
Уфимский государственный нефтяной
технический университет,
450064, г. Уфа, ул. Космонавтов, 1,
Российская Федерация,
e-mail: sshavshukova@mail.ru

Злотский Семен Соломонович,

д.х.н., профессор,
заведующий кафедрой общей, аналитической
и прикладной химии,
Уфимский государственный нефтяной
технический университет,
450064, г. Уфа, ул. Космонавтов, 1,
Российская Федерация,
e-mail: nocturne@mail.ru

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Natalia N. Mikhailova,

Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Ufa State Petroleum Technological University,
1, Kosmonavtov St., Ufa, 450064,
Russian Federation,
✉ e-mail: ximik2008@mail.ru

Albina V. Mamlieva,

Postgraduate Student,
Ufa State Petroleum Technological University,
1, Kosmonavtov St., Ufa, 450064,
Russian Federation,
e-mail: albina.mamlieva@mail.ru

Galina A. Teptereva,

Dr. Sci. (Engineering), Associate Professor,
Ufa State Petroleum Technological University,
1, Kosmonavtov St., Ufa, 450064,
Russian Federation,
e-mail: teptereva.tga@yandex.ru

Svetlana Yu. Shavshukova,

Dr. Sci. (Engineering), Professor,
Department of General, Analytical
and Applied Chemistry,
Ufa State Petroleum Technological University,
1, Kosmonavtov St., Ufa, 450064,
Russian Federation,
e-mail: sshavshukova@mail.ru

Semyon S. Zlotskii,

Dr. Sci. (Chemistry), Professor,
Head of the Department of General, Analytical
and Applied Chemistry,
Ufa State Petroleum Technological University,
1, Kosmonavtov St., Ufa, 450064,
Russian Federation,
e-mail: nocturne@mail.ru

Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Поступила в редакцию 15.02.2021.

Одобрена после рецензирования 28.02.2021.

Принята к публикации 28.02.2021.

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

The final manuscript has been read and approved by all the co-authors.

The article was submitted 15.02.2021.

Approved after reviewing 28.02.2021.

Accepted for publication 28.02.2021.



Синтез и изучение свойств алкилфосфатов как поверхностно-активных компонентов щелочно-ПАВ-полимерного состава для повышения нефтеотдачи пласта

© Н.Ю. Третьяков*, Л.П. Паничева, Е.А. Турнаева*, С.С. Волкова*,
Д.С. Адаховский*, М.Р. Матвеев**, И.Н. Кольцов***, А.А. Громан***

*Тюменский государственный университет, г. Тюмень, Российская Федерация

**НОРКЕМ Лимитед, г. Флориана, Мальта

***ООО «ГАЗПРОМНЕФТЬ – Технологические партнёрства»,
г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

Резюме: Одним из способов повышения нефтеотдачи пласта является химическое заводнение (CEOR) составами, содержащими щелочные компоненты, поверхностно-активные вещества (ПАВ) и полимеры (ASP-технология). Разработка и синтез новых высокоэффективных промышленных поверхностно-активных веществ позволяют вывести данную технологию на новый уровень и оптимизировать составы химических реагентов с учетом требований, диктуемых пластовыми условиями месторождений Западной Сибири. Одним из видов ПАВ, которые возможно использовать в ASP-технологии, являются алкилфосфаты различного строения. Целью данной работы являлся синтез и изучение свойств коммерческих (полупромышленных) образцов алкилфосфатов и алкоксилированных алкилфосфатов смешанного состава, отвечающих требованиям эффективного компонента ПАВ состава ASP-заводнения. Синтез осуществлялся из промышленных образцов жирных спиртов реакцией фосфатирования пятиокисью фосфора. При целевом проектировании исходного сырья (изменения структуры, молекулярно-массового распределения в спиртах) и условий процесса синтеза возможно получить смесь моно- и дизамещенных эфиров фосфорной кислоты определенного соотношения, обеспечивающую (без добавки со-ПАВ) получение многокомпонентной эффективной композиции ПАВ для ASP-состава. В ходе работы были синтезированы три эффективных смесовых образца алкилфосфатов и алкоксилированных алкилфосфатов. Методом масс-спектрометрии высокого разрешения, ИК-спектроскопии и потенциометрического титрования установлен состав синтезированных фосфорных эфиров. При температуре пласта полученные образцы обеспечивают достаточную растворимость в нефтewытесняющем водном растворе при технологически необходимом интервале минерализации, совместимость с другими компонентами, низкие значения межфазного натяжения (IFT) на границе с нефтью месторождений Западной Сибири, формирование достаточного объема эмульсионной фазы в фазовом эксперименте. Данные первичного лабораторного исследования доказывают эффективность синтезированных ПАВ для использования их в химических методах увеличения нефтеотдачи пласта – ASP-технологиях, на месторождениях Западной Сибири.

Ключевые слова: поверхностно-активное вещество, алкилфосфат, алкоксилированный алкилфосфат, щелочно-ПАВ-полимерное заводнение

Благодарности: Настоящая статья подготовлена по результатам научно-технического сотрудничества Тюменского государственного университета, ГК «НОРКЕМ» и ПАО «Газпромнефть» в рамках реализации проекта «РосПАВ», объединяющего научные исследования в сфере применения поверхностно-активных веществ российского производства для повышения нефтеотдачи в CEOR-проектах. Компьютерное моделирование структур молекул и синтез поверхностно-активных веществ класса алкилфосфатов и алкоксилированных алкилфосфатов проведен в лаборатории ГК «НОРКЕМ». Лабораторные исследования синтезированных ПАВ выполнены с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Рациональное природопользование и физико-химические исследования» Института химии Тюменского государственного университета при экспертной и финансовой поддержке ПАО «Газпромнефть».

Для цитирования: Третьяков Н.Ю., Паничева Л.П., Турнаева Е.А., Волкова С.С., Адаховский Д.С., Матвеев М.Р., Кольцов И.Н., Громан А.А. Синтез и изучение свойств алкилфосфатов как поверхностно-активных компонентов щелочно-ПАВ-полимерного состава для повышения нефтеотдачи пласта. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т. 11. N 1. С. 147–158. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-147-158>

Synthesis of alkyl phosphates and investigation of their surface-active properties in an alkaline surfactant polymer system for enhanced oil recovery

Nikolai Yu. Tret'yakov*, Larisa P. Panicheva, Elena A. Turnaeva*, Svetlana S. Volkova*, Denis S. Adakhovskii*, Maxim R. Matveev**, Igor N. Koltsov***, Andrey A. Groman***

*University of Tyumen, Tyumen, Russian Federation

**NORCHEM Limited, Floriana, Malta

***GAZPROMNEFT – Technological Partnerships LLC,
Saint Petersburg, Russian Federation

Abstract: Chemical flooding is a technique of enhanced oil recovery (CEOR) using formulations containing alkaline components, surfactants and polymers (ASP technology). The development and synthesis of novel highly efficient industrial surfactants take this technology to a new level, allowing the chemical composition of reagents to be tailored to the reservoir conditions of fields in Western Siberia. Alkyl phosphates with various structures are one type of the surfactants that can be used in ASP technology. This work aimed to synthesize and examine the properties of commercial (semi-industrial) alkyl phosphates and alkoxyated alkyl phosphates of mixed composition that meet the requirements of an efficient surfactant component of an ASP-flooding formulation. The synthesis was carried out using industrial fatty alcohols by the phosphating reaction with phosphorus pentoxide. A mixture of mono- and disubstituted phosphoric acid esters of a defined ratio can be obtained by target tailoring of the feedstock properties (structural changes, molecular weight distribution in alcohols) and the synthesis conditions. This mixture, requiring no addition of co-surfactants, is an effective multi-component surfactant for an ASP-system. In this work, three effective alkyl phosphates and alkoxyated alkyl phosphates blends were synthesized. The composition of the synthesized phosphoric esters was evaluated by high-resolution mass spectrometry (HRMS), infrared (IR) spectroscopy and potentiometric titration. At reservoir temperature, the obtained samples provided sufficient solubility in an oil-displacing aqueous solution in the technologically required salinity interval, compatibility with other components, low interfacial tension (IFT) values at the interface between ASP solution and oil from Western Siberia fields, and the formation of the sufficient volume of the emulsion phase in a phase experiment. The primary laboratory research data proved the efficiency of the synthesized surfactants in ASP technology in the fields of Western Siberia.

Keywords: surfactant, alkyl phosphate, alkoxyated alkyl phosphate, ASP flooding

Acknowledgement: This article was prepared based on the results of scientific and technical cooperation between the University of Tyumen, NORCHEM Ltd. and Gazpromneft oil company within the framework of the RosPAV project, which combines scientific research in the field of using Russian-made surfactants to enhance oil recovery in CEOR projects. Computer modeling of molecular structures and synthesis of alkyl phosphate and alkoxyated alkyl phosphate surfactants were carried out in the laboratory of NORCHEM Ltd. Synthesized surfactants were studied using the equipment of the Research Resource Center "Natural Resource Management and Physical-Chemical Research", University of Tyumen with financial and expert support of Gazpromneft oil company.

For citation: Tret'yakov NYu, Panicheva LP, Turnaeva EA, Volkova SS, Adakhovskii DS, Matveev MR, Kol'tsov IN, Groman AA. Synthesis of alkyl phosphates and investigation of their surface-active properties in an alkaline surfactant polymer system for enhanced oil recovery. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya* = *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(1):147–158. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-147-158>

ВВЕДЕНИЕ

При получении коммерческих поверхностно-активных веществ (ПАВ) стадии очистки и выделения отдельных компонентов представлены ограниченно, поэтому такие образцы представляют собой, как правило, смесь большого количества веществ, в том числе гомологов. Возникает необходимость регулирования у промышленных ПАВ содержания компонентов как способа управления его эффективностью в отдельных областях использования, например, повышение

нефтеотдачи пласта, вытеснение нефти.

Одним из способов повышения нефтеотдачи пласта является химическое заводнение составами, содержащими щелочные компоненты, ПАВ и полимеры – ASP-технологии (или бесщелочные составы – SP-технологии) [1, 2]. Состав закачиваемой при химическом заводнении водной фазы содержит ПАВ, со-ПАВ, соразтворитель, щелочной агент, полимер, электролиты [3].

Существует широкий спектр ПАВ (АПАВ, КПАВ, НПАВ), имеющих потенциал к использо-

ванию в составе ASP- и SP-технологий [4]. Как указано в обзоре [5], в современных комбинированных составах химического заводнения на месторождениях наиболее часто используют различного строения АПАВ класса сульфатов, сульфонатов, карбоксилатов и НПАВ класса жирных спиртов и аминов.

Разработка и синтез высокоэффективных новых промышленных ПАВ и совершенствование алгоритмов экспериментальных исследований позволяют вывести технологию химического заводнения (Chemical Enhanced Oil Recovery – CEOR) на новый уровень, оптимизировать составы химических реагентов с учетом требований, диктуемых пластовыми условиями реальных месторождений [6, 7]. Одно из требований разработки составов CEOR для месторождений Западной Сибири – эффективное действие в условиях высоких температур (80–90 °C).

Одним из видов ПАВ, которые возможно использовать в указанных технологиях, являются алкилфосфаты различного строения. Результаты исследований свойств лабораторных образцов и перспективность применения ПАВ класса фосфорных эфиров в составах, используемых для увеличения нефтеотдачи пластов, приведены в статьях [8, 9] и патенте [10]. Для подбора эффективного состава ASP-заводнения (Alkaline Surfactant Polymer flood) необходимо регулировать следующие свойства алкилфосфатов: совместимость с компонентами пластовых вод и ASP-состава, солюбилизующую способность, эффективность снижения межфазного натяжения на границе раздела водная фаза – нефть, создание устойчивой маловязкой третьей фазы (Winsor III – WIII) [11, 12]. Имеющиеся образцы коммерческих ПАВ класса алкилфосфатов в большинстве случаев не отвечают требованиям CEOR.

Целью данной работы являлся синтез коммерческих образцов алкоксилированных алкилфосфатов смешенного состава, отвечающих требованиям эффективного компонента ПАВ состава ASP-заводнения месторождений Западной Сибири.

Для реализации данной цели были поставлены следующие задачи:

- синтез ПАВ с регулировкой состав исходного сырья и параметров синтеза для получения продуктов, отвечающих требованиям эффективного компонента состава ASP-заводнения;
- исследование состава синтезированных ПАВ методами масс-спектрометрии высокого разрешения, ИК-спектроскопии, потенциометрического титрования;
- исследование свойств синтезированных ПАВ на соответствие показателей эффективных компонентов для химического заводнения ASP-технологии: изучение оптическими методами растворов синтезированных ПАВ при технологи-

чески необходимой температуре и минерализации; исследование поверхностной активности синтезированных ПАВ путем измерения межфазного натяжения на границе водного раствора с нефтью (метод вращающейся капли) и фазового поведения системы нефть – водный раствор ПАВ (фазовый эксперимент).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исходным сырьем для синтеза ПАВ являлись: спирты $C_nH_{2n+1}OH$ ($n = 9–18$) производства компании «Sasol Germany GmbH» (Германия), алкоксилированные спирты $C_nH_{2n+1}(C_2H_4O)_mCH_2CH_2OH$ ($n = 9–18$; $m = 0–14$) производства ООО «Завод синтанолов» (ГК «НОРКЕМ», Россия), оксид фосфора (V) производства ТОО «Казфосфат» (Казахстан).

Синтез осуществляли по методике, представленной в работе [13], в реакторе объемом 3 л при интенсивности перемешивания 200–250 об./мин в течение 1–5 ч. Масса загрузочной смеси – 1,0 кг. Температурный режим поддерживался в диапазоне 50–100 °C; перед началом добавления пятиоксида фосфора включали охлаждение для поддержания заданной температуры реакционной смеси. При синтезе мольное соотношение компонентов – спирт (спирты) : P_2O_5 : вода – варьировалось: (2–6) : (0–1) : (0–2). Полученную смесь продуктов не разделяли.

Для приготовления модельной воды с заданной минерализацией использовали натрий хлористый (х.ч., ГОСТ 4233-77), натрий углекислый (б/в, ч.д.а., ГОСТ 83-79), для получения прозрачных водных растворов ПАВ в заданном интервале минерализации использовался соразтворитель – изобутиловый спирт (ИБС) (ч.д.а., ГОСТ 6016-77). Для получения состава ASP использовали полимер марки FLOPAAM 3230 производства компании SNF (Франция), представляющий собой сополимер акриламида и акрилата с молекулярной массой 5–8 МДа, проявляющий устойчивость при высоких температурах (70–85 °C) и общей минерализации (TDS) до 35 г/л; степень гидролиза – 30 мольн.%.

Состав синтезированных ПАВ можно исследовать методом масс-спектрометрии высокого разрешения [14]. Данные исследования проводили на квадруполь-времяпролетном масс-спектрометре Agilent 6545 Q-TOF LC/MS (США). Для установления состава был проведен масс-спектрометрический анализ растворов образцов ФЭ (1,2 мг/мл) в водном растворе метилового спирта (50:50 % об.) без хроматографического разделения компонентов на колонке. В источник ионизации вводили 5 мкл раствора ПАВ. Подвижная фаза – аммонийно-ацетатный буфер с $pH = 5,5$.

Результаты синтеза алкилфосфатов подтверждали методом ИК-спектроскопии на ИК-Фурье спектрометре Cary 630 FTIR (США).

Состав синтезированных фосфорных эфиров

уточняли методом потенциометрического титрования [15, 16] с использованием автоматического потенциометрического титратора марки Аквилон АТП-02 (Россия).

В соответствии с методикой [12] 50 мл раствора с навеской синтезированного образца в кислой форме массой 0,4–0,5 г титровали 0,1 М раствором гидроксида натрия. После определения второй точки перегиба титрование прерывали и добавляли раствор хлорида кальция для снижения pH, далее титрование возобновляли до определения третьей точки перегиба. Данные потенциометрического титрования (три точки эквивалентности) позволяют соотнести количество моно- и диэфиров, остаточной фосфорной кислоты в образце, используя формулы, представленные в работе [12]. Растворимость ПАВ интерпретировали по оптической плотности водных растворов, измеренной на приборе УФ-ВИД спектрофотометр Agilent 8453 (США).

Для определения области наибольшей эффективности синтезированного ПАВ проводили фазовый эксперимент и измеряли межфазное натяжение на границе водный раствор ПАВ – нефть. Фазовый эксперимент проводили по общепринятой методике в области подбора ASP-композиции [17, 18]. Равные объемы нефти и водного раствора ПАВ с различной минерализацией, нагретые до заданной температуры (83 °С), помещали в пробирки, герметизировали и интенсивно встряхивали. Данные системы термостатировали в течение заданного периода времени в статичном режиме с периодической фиксацией объемов эмульсионной, водной и органической фаз. Оптимальные значения минерализации водного раствора (оптимум солёности) определяли по наличию в системе симметрично расположенного WIII [19]. Данное фазовое поведение соответствует области максимальной эффективности ПАВ в составе ASP.

Определение межфазного натяжения на границе раствор ПАВ – нефть проводили на тензиометре KRÜSS Spinning Drop Tensiometer – SITE 100 (Германия) методом вращающейся капли при температуре эксперимента 83 °С.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Алкилфосфаты относятся к анионактивным ПАВ, применяемым в разнообразных промышленных технологиях как моющие, смачивающие, ингибирующие компоненты. В данной работе ставилась цель синтеза и соотнесения состава ПАВ класса алкилфосфатов и алкоксилированных алкилфосфатов с эффективностью его использования в составах ASP-заводнения на месторождениях Западной Сибири.

Критерии эффективности ПАВ для CEOR по технологии ASP-заводнения [5]:

1) растворимость ПАВ в щелочном водном

растворе ПАВ при добавке соразстворителя (ИБС) в технологически интересующем интервале минерализации при 60 °С). Критерий – образование истинного прозрачного раствора или коллоидного раствора с устойчивой мелкодисперсной фазой (значения оптической плотности до 0,5) [3, 20];

2) при смешении нефти и раствора ПАВ в рамках фазового эксперимента должна формироваться симметричная трехфазная система – нефть–эмульсия–водный раствор (WIII);

3) межфазное натяжение на границе раздела фаз вода–нефть должно быть ультранизким ($IFT < 1 \cdot 10^{-2}$ мН/м).

Промышленные образцы алкилфосфатов российского производства, представленные на рынке, не соответствуют требованиям, предъявляемым к компонентам ПАВ для эффективных композиций ASP, планируемых к использованию на месторождениях Западной Сибири.

Современные исследования показывают, что эффективными для CEOR являются композиции из двух и более ПАВ [2, 9], различающиеся по размерам и структуре молекул, но совместимые в поверхностном слое и формирующие мицеллы смешанного типа, за счет чего дающие синергетический эффект [21, 22]. При синтезе поверхностно активных веществ класса алкилфосфатов преимущественно получается смесь моно- и дизамещенных эфиров фосфорной кислоты (рис. 1), что позволяет при целевом проектировании исходного сырья и условий процесса получить сразу многокомпонентную эффективную композицию ПАВ для ASP-состава.

Для получения эффективного состава промышленного образца алкилфосфатов необходимо регулировать строение гидрофобной части – углеводородного радикала, что достигается путем изменения структуры, молекулярно-массового распределения в исходных спиртах, в том числе использование алкоксилированных спиртов, и варьирования соотношения моно- и диэфиров в продуктах реакции.

В данной работе проведен синтез двадцати алкилфосфатов и алкоксилированных алкилфосфатов, отличающихся составом и структурой компонентов. Исследования синтезированных образцов ПАВ показали, что три из них (ФЭ-1, ФЭ-2, ФЭ-3) отвечают требованиям, предъявляемым к компонентам состава ASP.

Для синтеза ПАВ класса фосфорных эфиров были использованы спирты ROH с различной гомологической линейкой C₉–C₁₈, алкоксилированные спирты RO(CH₂CH₂O)_mCH₂CH₂OH ($m = 0–14$). Молярное соотношение компонентов при синтезе ФЭ-1: спирт ROH – RO(CH₂CH₂O)_mCH₂CH₂OH ($R = C_9–C_{18}; m = 0–5$) / P₂O₅/вода 3 : 1 : 0. Температурный режим поддерживался в интервале 50–60 °С, время синтеза – 5 ч, масса исходной

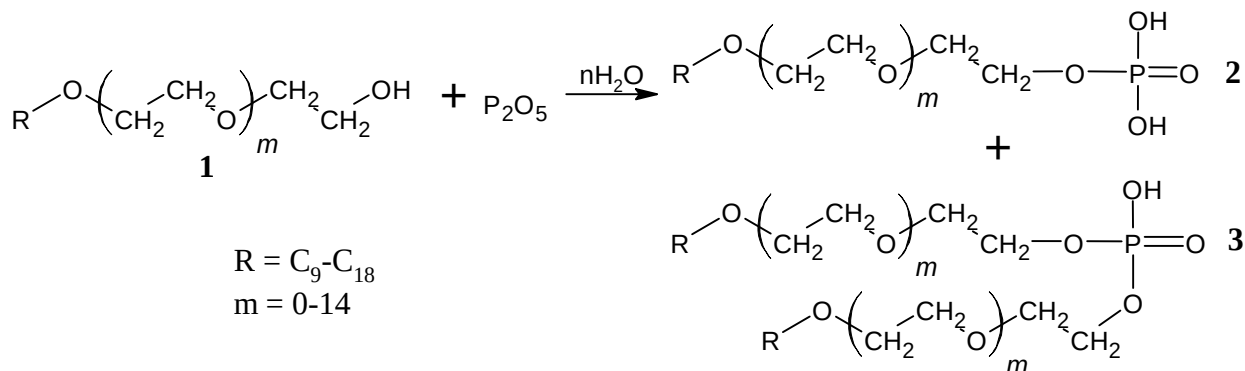


Рис. 1. Схема синтеза фосфорных эфиров: 1 – спирт; 2 – моноэфир фосфорной кислоты; 3 – диэфир фосфорной кислоты

Fig. 1. Scheme of phosphoric esters synthesis: 1 – alcohol; 2 – phosphoric acid monoester; 3 – phosphoric acid diester

смеси – 1 кг. Мольное соотношение компонентов при синтезе ФЭ-2: спирт ROH ($\text{R} = \text{C}_9\text{-C}_{15}$) – $\text{RO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, ($\text{R} = \text{C}_9\text{-C}_{15}$; $m = 0\text{-}14$) / P_2O_5 / вода 3,5 : 1 : 0,5. Температура – в интервале 60–80 °С, время синтеза – 6 ч, масса исходной смеси – 1 кг. Мольное соотношение компонентов при синтезе ФЭ-3: спирт ROH ($\text{R} = \text{C}_9\text{-C}_{18}$ $m = 0$) / P_2O_5 / вода 4 : 1 : 0. Температура – 60–80 °С, время синтеза – 4,5 ч, масса исходной смеси – 1 кг.

Исходные жирные спирты различного состава с углеводородным радикалом в интервале $\text{C}_9\text{-C}_{18}$, являясь промышленным продуктом нефтехимического синтеза, представляют собой смесь гомологов с определенным молекулярно-массовым распределением. Часть исходных спиртов проходит стадию алкоксилирования (оксиэтилирования) с последующим фосфатированием P_2O_5 по реакции [23], представленной на рис. 1, с получением промышленного образца ПАВ, содержащего в определенном соотношении моно- и диэфиры фосфорной кислоты, а также остаточную фосфорную кислоту. Режим проведения процесса и состав исходного сырья позволяют регулировать свойства продукта. Полученную кислую смесь при необходимости можно нейтрализовать щелочью, NH_3 или моно-, ди- или триэтаноламином [7]. При повышении pH водного раствора синтезированных продуктов увеличивается доля анионной формы и растет гидрофильно-липофильный баланс (ГЛБ) комбинированного ПАВ.

Результаты синтеза алкилфосфатов подтверждали методом ИК-спектроскопии. В ИК-спектрах всех образцов (ФЭ-1, ФЭ-2, ФЭ-3) были обнаружены характерные полосы поглощения группой P=O в интервале 1250–1200 cm^{-1} и колебания, связанные с группой P-O-C , в интервале 1100–1000 cm^{-1} , что свидетельствует о получении продуктов класса фосфорных эфиров.

Авторами работы [15] при синтезе фосфорных эфиров из спирта октанол-1 при мольном отношении жирный спирт / P_2O_5 / вода – 2 : 1 : 1 были по-

лучены моноэфир и диэфир (80 и 20% соответственно). Для более длинноцепочечного спирта (октадеканол-1) образование диэфира не наблюдалось, моноэфир составлял 100%. В работе [22] отмечается, что температура плавления для спирта C_8 находится в интервале 20–30 °С, а для C_{18} – от 60 до 70 °С.

В работе [16] показано, что доля моно- и диэфиров фосфорной кислоты зависит от степени оксиэтилирования и длины углеводородного хвоста: чем длиннее углеводородная часть молекулы спирта и чем выше в ней число оксиэтильных звеньев, тем ниже доля диэфиров в продуктах реакции. Предполагается, что данный эффект может быть связан со стерическими ограничениями. При этом чем длиннее углеводородный хвост, тем менее чувствительна реакция к числу оксиэтильных групп. Содержание образующихся моно- и диалкилфосфатов зависит также от молярного соотношения спирта и фосфорилирующего агента. Так, при соотношении спирт : $\text{P}_2\text{O}_5 = 1:4$ образуются преимущественно моноалкилфосфаты.

Доля образующихся моно- и диэфиров и свободной фосфорной кислоты в составе продуктов синтеза алкилфосфорных эфиров определяется потенциометрическим титрованием [12, 22, 23]. Кривые потенциометрического титрования образца ФЭ-3 приведены на рис. 2. Следует отметить, что данный метод позволяет оценить только соотношение моно-, диэфиров и свободной остаточной кислоты (в кислой форме ПАВ). Остаточное содержание НПАВ не определяется.

Влияние длины углеводородного хвоста и степени оксиэтилирования спирта [17, 18] подтверждают результаты потенциометрического определения в смесовых синтезированных образцах ФЭ-1, ФЭ-2, ФЭ-3, представленные на рис. 3. Полученные данные показывают наличие в синтезированных образцах различного соотношения моно- и диэфиров, варьирующегося от 50 : 48 до 28 : 69.

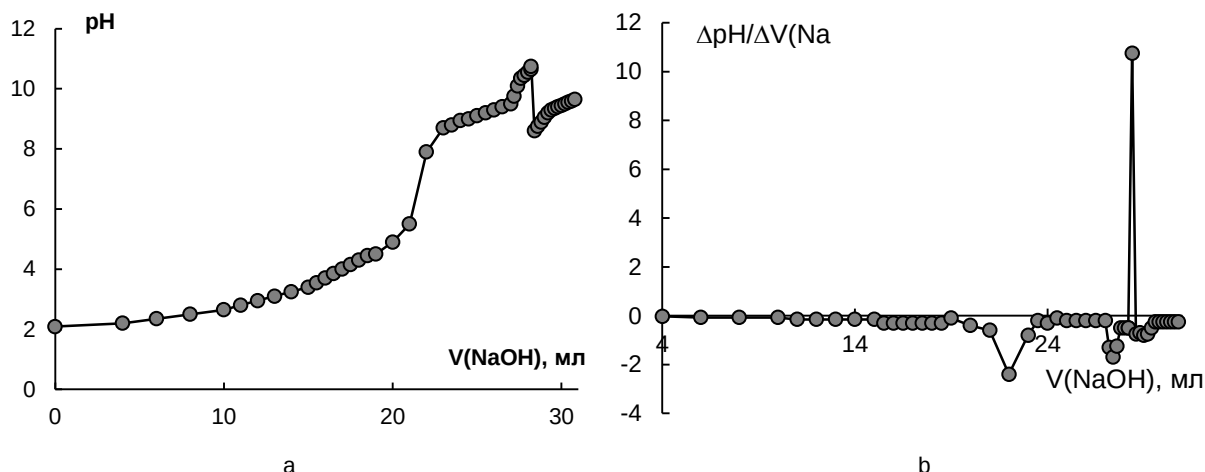


Рис. 2. Кривая потенциометрического титрования (а) и дифференциальная кривая (b) образца ФЭ-3

Fig. 2. Potentiometric titration curve (a) and differential curve (b) of FE-3 sample

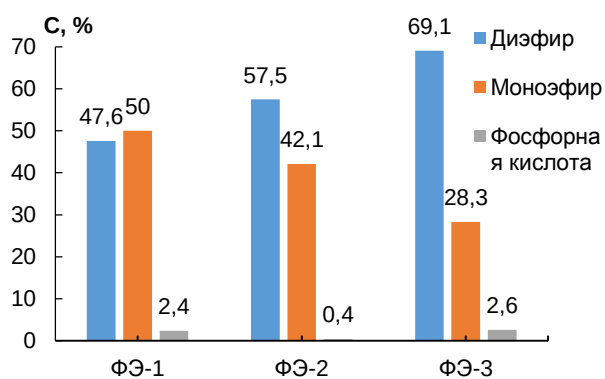


Рис. 3. Соотношение моно-, диэфиров и фосфорной кислоты в синтезированных образцах ФЭ-1, ФЭ-2, ФЭ-3. Данные получены с помощью метода потенциометрического титрования

Fig. 3. Ratio of mono-, diesters and phosphoric acid in the synthesized samples FE-1, FE-2, FE-3. The data were obtained using the potentiometric titration method

Сложность количественного определения алкилфосфатов заключается в нахождении их молекулярно-массового распределения по гидрофобному радикалу или полярным фрагментам в многокомпонентной системе, которая может включать моно- и диэфиры фосфорной кислоты и остатки ряда исходных спиртов.

Для установления состава был проведен масс-спектрометрический анализ растворов образца ФЭ (1,2 мг/мл) в водном растворе метилового спирта (50 : 50% об.) без хроматографического разделения компонентов. Фрагмент масс-спектра ФЭ-3 в режиме отрицательной ионизации в диапазоне ионов 150–610 m/z представлен на рис. 4. Расшифровка данных показывает наличие в образце моноалкилфосфорных эфиров с молекулярными массами (М-Н) с $m/z = 223–349$, и диалкилфосфорных эфиров с

$m/z = 349–601$, что соответствует молекулам с углеводородными хвостами C9–C18.

Моноэфиры (М-Н), m/z : 223,1224; 237,1397; 238,143; 251,1568; 252,16; 265,1742; 266,1773; 279,1919; 280,1945; 293,2089; 294,2115; 307,2252; 308,2286; 321,2423; 349,2767.

Диэфиры (М-Н), m/z : 349,2767; 377,311; 391,3283; 405,3455; 419,3627; 433,38; 447,3973; 461,4144; 475,2991; 475,4317; 489,3164; 489,4489; 503,3337; 503,4661; 517,3511; 517,4829; 518,3545; 531,3687; 531,5; 532,3719; 545,3861; 545,5174; 546,3891; 559,4036; 560,4063; 573,4209; 574,4236; 587,438; 588,4412; 601,455.

Масс-спектрометрический анализ синтезированных ПАВ позволил по основным ионам установить гомологический состав компонентов.

Для проверки эффективности синтезированных образцов алкилфосфатов в составах АСП для СЕОР была исследована их растворимость в воде с различной минерализацией. На рис. 5 представлен график зависимости оптической плотности водного раствора ФЭ-1 в нейтральной форме (нейтрализация NaOH, pH = 7,2) от минерализации водной фазы. Как видно из представленных зависимостей, образец ФЭ-1 имеет хорошую растворимость при 60 °C до минерализации раствора 30,0 г/л; выше этого значения (до 50 г/л) формируется технологически допустимая мелкодисперсная система, не образующая осадков в течении суток.

При увеличении в образцах синтезированных алкилфосфатов доли диэфиров (более гидрофобных молекул ПАВ) растворимость в минерализованном водном растворе ухудшается. Так, для образца ФЭ-3 получены прозрачные растворы при минерализации до 18 г/л, и с технологически допустимой мелкодисперсной фазой – при минерализации до 38 г/л (см. рис. 5).

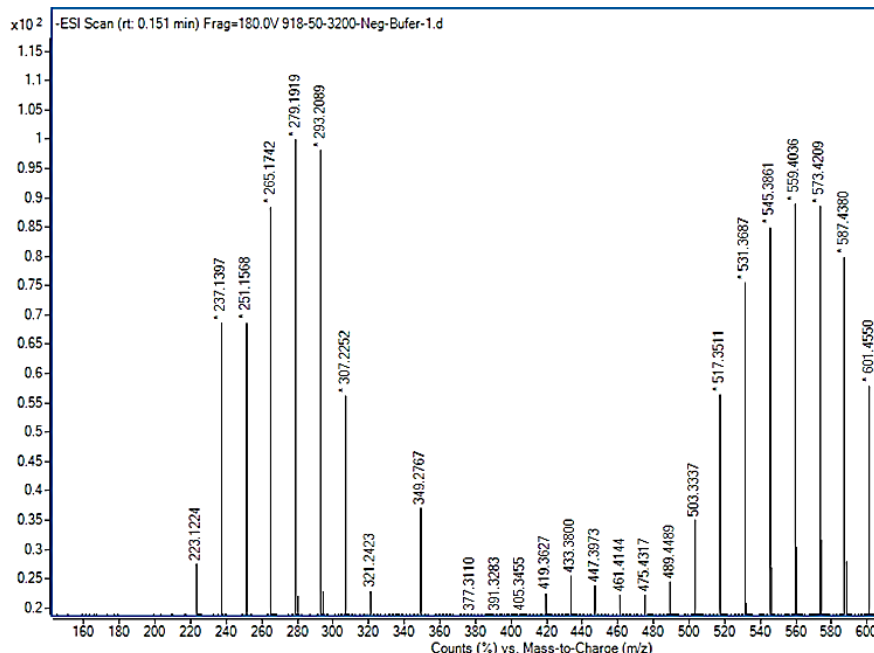


Рис. 4. Фрагмент масс-спектра водного раствора ПАВ ФЭ-3: моно- (m/z 223–349) и дифосфорные эфиры (m/z = 349–610) в условиях отрицательной ионизации (метод прямого ввода – электроспрей)

Fig. 4. Fragment of the mass spectrum of an aqueous solution of FE-3 surfactant: mono- (m/z = 349–685) and diphosphoric ethers (m/z = 349–685) under negative ionization (direct injection method – electrospray)

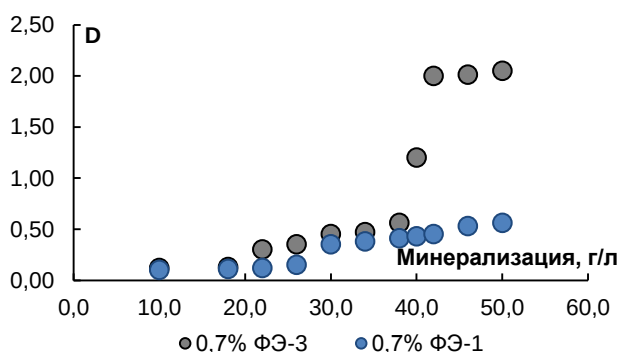


Рис. 5. Оптическая плотность 0,7% ФЭ, 1,0% Na_2CO_3 , 2,0% ИБС в щелочных водных растворах в диапазоне минерализации 10,0–50,0 г/л при 60 °C; λ = 500 нм, длина кюветы l = 2 см

Fig. 5. Optical density of 0.7% FE, 1.0% Na_2CO_3 , 2.0% IBA in alkaline aqueous solutions in the range of mineralization 10.0–50.0 g/l, at 60 °C, at λ = 500 nm, cuvette length l = 2 cm

Для оценки эффективности синтезированных образцов ПАВ в ASP-составах были проведены фазовые эксперименты, в которых после интенсивного перемешивания равных объемов нефти и водного раствора вытеснения (ASP-состав) отслеживалось фазовое поведение системы в статическом режиме при фиксированной температуре (температуре пласта). В качестве щелочного агента в составах был использован карбонат натрия, также добавляли полимер марки FLOPAAM 3230. Данные реагенты показали свою

эффективность во многих исследованиях ASP-технологий (например, [24]) и дают хорошую совместимость с синтезированными образцами ПАВ.

Наибольшую эффективность щелочные ПАВ-полимерные составы проявляют в области оптимальной солёности. Оптимумом солёности называется область минерализации исходных водных растворов вытеснения, в которой образуется наибольший объем третьей фазы (в рамках фазового эксперимента) и характерно наименьшее значение межфазного натяжения на границе нефть – раствор ASP.

Фазовый эксперимент с щелочным водным раствором (без добавления полимера) на основе ФЭ-1 показал оптимальный интервал минерализации – 19,0–45,0 г/л, для образца ФЭ-2 оптимум находился в пределах 17,0–45,0 г/л, для ФЭ-3 – 14,0–37,0 г/л. Снижение интервала оптимальной солёности можно объяснить увеличением доли дизфилов фосфорной кислоты, увеличивающих гидрофобность комбинированного ПАВ. Параметр солёности нефти рассчитан по формуле:

$$\sigma = \frac{V_o}{V_s},$$

где V_o – объем нефти, растворенный в микроэмульсии; V_s – объем поверхностно-активного вещества в составе микроэмульсии.

Для эффективных систем параметр солёности должен иметь значение более 10 [25, 26]. Для всех воднонефтяных систем на основе синте-

зированных ПАВ класса алкилфосфатов (ФЭ-1, ФЭ-2, ФЭ-3) значения этого параметра через 7 суток термостатирования располагаются в интервале от 40 до 95, что доказывает эффективность синтезированных ПАВ для составов АСП.

Данный фазовый эксперимент хорошо согласуется с областью низких значений ИФТ на графике зависимости межфазного натяжения (на границе нефть – раствор ПАВ) от минерализации водного раствора [13, 14, 27].

При повышении концентрации электролита в водном растворе изменяется весь спектр физико-химических свойств поверхностно-активного вещества, что приводит к формированию области минимальных значений межфазного натяжения, называемой оптимумом солености [4]. При значениях минерализации в области оптимума солености для состава АСП характерна, как правило, максимальная эффективность вытеснения нефти. Зависимость межфазного натяжения для системы 0,7% ФЭ-3, 1,0% Na_2CO_3 , 2,0% ИБС на границе с нефтью месторождения Западной Сибири представлена на рис. 6. Как видно из графика зависимости, область оптимальной солености для данной системы лежит в интервале минерализации 19,0–30,0 г/л и в минимуме (23 г/л) имеет значения ниже $1 \cdot 10^{-2}$ мН/м.

Фазовый эксперимент для состава на основе ФЭ-1 (0,7% ФЭ-1; 0,15% FLOPAAM 3230; 2,0% ИБС; 1,0% Na_2CO_3) с добавкой полимера показывает незначительное изменение оптимума солености – с 19,0–45,0 г/л до 18,0–42,0 г/л, при сохранении объема третьей фазы, что можно объяснить влиянием добавки полимера, обладающего некоторыми поверхностно-активными свойствами и изменяющим суммарный гидро-

фильно-липофильный баланс в сторону увеличения липофильности (рис. 7). Анализ фазового поведения с добавкой комбинированного состава АСП на основе синтезированных алкилфосфатов и этоксилированных алкилфосфатов доказывает их эффективность и возможность регулировки свойств ПАВ за счет изменения состава для подбора под определенные значения минерализации водной фазы.

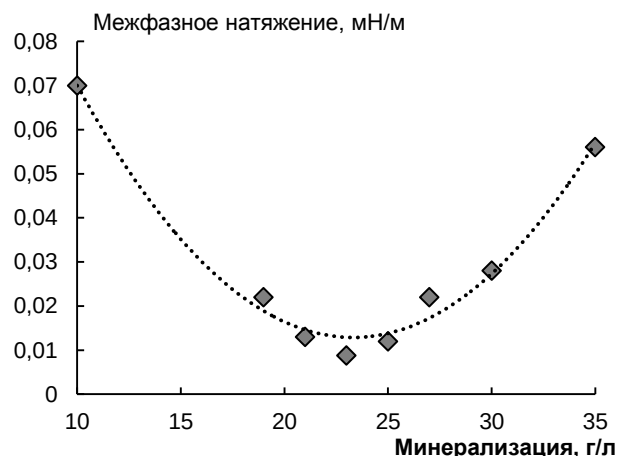


Рис. 6. Зависимость межфазного поверхностного натяжения на границе раздела нефтяная фаза – водный раствор ПАВ (0,7% ФЭ, 1,0% Na_2CO_3 , 2,0% ИБС) с нефтью месторождения Западной Сибири от минерализации водной фазы при температуре 83 °С

Fig. 6. Dependence of interfacial surface tension at the interface between the oil phase and an aqueous solution of surfactants 0.7% FE, 1.0% Na_2CO_3 , 2.0% IBA, with oil from the Western Siberia field on the salinity of the water phase at a temperature of 83 °C

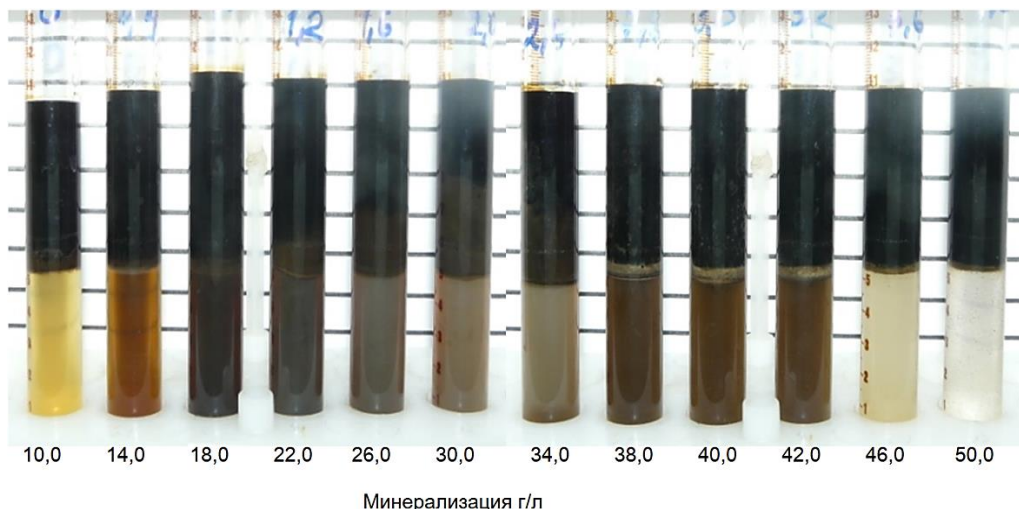


Рис. 7. Фотофиксация фазового эксперимента в диапазоне минерализации 10,0–50,0 г/л при исследовании фазового поведения ПАВ-полимер-щелочного раствора (0,7% ФЭ-1; 0,15% FLOPAAM 3230; 2,0% ИБС; 1,0% Na_2CO_3) с нефтью месторождения Западной Сибири при 83 °С через 12 суток термостатирования

Fig. 7. Photofixation of a phase experiment in the range of mineralization 10.0–50.0 g/L when studying the phase behavior of an alkaline surfactant-polymer solution (0.7% FE-1; 0.15% FLOPAAM 3230; 2.0% IBA; 1.0% Na_2CO_3) with oil from the Western Siberia field at 83 °C after 12 days of thermostating

Раствор ASP, полученный при смешении всех компонентов (0,7% ФЭ(1-3); 0,15% FLOПААМ 3230; 2,0% ИБС; 1,0% Na₂CO₃), соответствует критериям эффективности состава для химического заводнения.

ВЫВОДЫ

1. Проведен целевой синтез трех образцов ПАВ класса алкилфосфатов, свойства которых соответствуют требованиям, предъявляемым к эффективным комбинированным ПАВ, входящим в состав ASP-композиции для химического заводнения в рамках повышения нефтеотдачи пласта.

2. Методом масс-спектрометрии высокого разрешения, ИК-спектроскопии и потенциометрического титрования установлена структура

синтезированных фосфорных эфиров. Показано, что использование в процессе синтеза промышленных образцов спиртов или их смеси, варьирование условий процесса приводят к образованию сложной композиции алкилфосфатных компонентов в товарном продукте.

3. Проведены первичные лабораторные исследования, включающие фазовый эксперимент, изучение растворимости синтезированных ПАВ в водах с различным уровнем минерализации, измерение межфазного натяжения на границе нефть – водный раствор ASP-состава. Данные исследования доказывают эффективность синтезированных ПАВ для использования их в химических методах увеличения нефтеотдачи пласта – ASP-технологиях, на месторождениях Западной Сибири.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Alvarado V., Manrique E. Enhanced oil recovery: an update review // *Energies*. 2010. Vol. 3. Issue 9. P. 1529–1575. <https://doi.org/10.3390/en3091529>
2. Koltsov I., Groman A., Milchakov S., Tret'yakov N., Panicheva L., Volkova S., et al. Evaluating reservoir fluids geochemistry for planning of surfactant-polymer flooding. Conference Proceedings, IOR 2019 – 20th European symposium on improved oil recovery. 8–11 April 2019, Pau, France. Pau; 2019. Vol. 2019. P. 1–17. <https://doi.org/10.3997/2214-4609.201900091>
3. Levitt D., Jackson A.C., Heinson C., Britton L.N., Malik T., Dwarakanath V., et al. Identification and Evaluation of High-Performance EOR Surfactants // *SPE Reservoir Evaluation & Engineering*. 2009. Vol. 12. Issue 02. P. 243–253. <https://doi.org/10.2118/100089-MS>
4. Negin C., Saeedi A., Xie Q. Most common surfactants employed in chemical enhanced oil recovery // *Petroleum*. 2017. Vol. 3. Issue 2. P. 197–211. <https://doi.org/10.1016/j.petlm.2016.11.007>
5. Massarweh O., Abushaikh A.S. The use of surfactants in enhanced oil recovery: A review of recent advances // *Energy Reports*. 2020. Vol. 6. P. 3150–3178. <https://doi.org/10.1016/j.egyr.2020.11.009>
6. Ahmadi M.A., Shadizadeh S.R. Implementation of a high-performance surfactant for enhanced oil recovery from carbonate reservoirs // *Journal of Petroleum Science and Engineering*. 2013. Vol. 110. P. 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2013.07.007>
7. Сидоровская Е.А., Турнаева Е.А., Третьяков Н.Ю., Паничева Л.П., Громан А.А., Мулявин С.Ф. Геологические и геохимические характеристики месторождения как основа подбора компонентов ПАВ-полимерного заводнения // *Нефть. Газ. Новации*. 2020. N 2 (230). С. 29–35.
8. Du Z., Zhou D., Chen Y., Chen M., Zhu P. Surface properties of butanol phosphate esters in alkali solutions // *Journal of Surfactants and Detergents*. 2010. Vol. 13. Issue 2. P. 201–206. <https://doi.org/10.1007/s11743-009-1145-3>
9. Zhao T., Feng N., Zhao Y., Zhang G. Adsorption behavior and application performance of branched aliphatic alcohol polyoxyethylene ether phosphate // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2020. Vol. 606. 125482. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.125482>
10. Morvan M., Lannibois D., Bendejacq D. Enhanced crude oil recovery. Patent FR, no. WO2008090267A2; 2007.
11. Pal S., Mushtaq M., Banat F., Sumaiti A.M.A. Review of surfactant-assisted chemical enhanced oil recovery for carbonate reservoirs: challenges and future perspectives // *Petroleum Science*. 2018. Vol. 15. Issue 4. P. 77–102. <https://doi.org/10.1007/s12182-017-0198-6>
12. Belhaj A.F., Elraies K.A., Mahmood S.M., Zulkifli N.N., Akbari S., Hussien O.S-E. The effect of surfactant concentration, salinity, temperature, and pH on surfactant adsorption for chemical enhanced oil recovery: a review // *Journal of Petroleum Exploration and Production Technology*. 2020. Vol. 10. Issue 1. P. 125–137. <https://doi.org/10.1007/s13202-019-0685-y>
13. Tracy D.J., Reiersen R.L. Commercial synthesis of monoalkyl phosphates // *Journal of Surfactants and Detergents*. 2002. Vol. 5. Issue 2. P. 169–172. <https://doi.org/10.1007/s11743-002-0218-9>
14. Dufour A., Thiébaud D., Ligiero L., Loriau M., Vial J. Chromatographic behavior and characterization of polydisperse surfactants using Ultra-High-Performance Liquid Chromatography hyphenated to High-Resolution Mass Spectrometry // *Journal of Chromatography A*. 2020. Vol. 1614. 460731. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460731>
15. Belosinschi D., Chabot B., Brouillette F. Release paper: can phosphatase esters be an alternative to silicone? // *Bioresources*. 2012. Vol. 7. Issue 1. P. 902–912.
16. O'Lenick Jr A.J., Parkinson J.K. Phosphate esters: chemistry and properties // *Surfactants*. 1995. Vol. 27. Issue 11. P. 17–20.
17. Karnanda W., Benzagouta M.S., AlQuraishi A., Amro M.M. Effect of temperature, pressure, salinity, and surfactant concentration on IFT for surfactant flooding optimization // *Arabian Journal of Geosciences*

es. 2013. Vol. 6. Issue 9. P. 3535–3544. <https://doi.org/10.1007/s12517-012-0605-7>

18. Chou S.I., Shah D.O. The optimal salinity concept for oil displacement by oil-external microemulsions and graded salinity slugs // *Journal of Canadian Petroleum Technology*. 1981. Vol. 20. Issue 3. P. 83–91. <https://doi.org/10.2118/81-03-08>

19. Nelson R.C., Pope G.A. Phase relationships in chemical flooding // *Journals of Society of Petroleum Engineers*. 1978. Vol. 18. Issue 5. P. 325–338. <https://doi.org/10.2118/6773-PA>

20. Walde P., Wessicken M., Rädler U., Berclaz N., Conde-Frieboes K., Luisi P.L. Preparation and characterization of vesicles from mono-n-alkyl phosphates and phosphonates // *The Journal of Physical Chemistry B*. 1997. Vol. 101. Issue 38. P. 7390–7397. <https://doi.org/10.1021/jp970898n>

21. Puerto M.C., Hirasaki G.J., Miller C.A., Barnes J.R. Surfactant systems for EOR in high-temperature, high-salinity environment // *SPE Journal*. 2012. Vol. 17. Issue 1. P. 11–19. <https://doi.org/10.2118/129675-PA>

22. Schulman J.H., Cockbain E.G. Molecular interactions at oil/water interfaces. Part I. Molecular complex formation and the stability of oil in water emulsions // *Transactions of the Faraday Society*. 1940. Vol. 35. P. 651–661. <https://doi.org/10.1039/TF9>

403500651

23. Kwon T.-H., Lee E.S., Lee S.M., Bae J.-Y. Synthesis of TRITON™ X-based phosphate ester surfactants and their self-charring behavior // *Polymer Degradation and Stability*. 2007. Vol. 92. Issue 8. P. 1546–1554. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2007.05.015>

24. Volokitin Y., Shuster M., Karpan V., Koltsov I., Mikhaylenko E., Bondar M., et al. Results of alkaline-surfactant-polymer flooding pilot at west salym field. In: *SPE EOR conference at oil and gas West Asia*. 26–28 March 2018, Muscat. 2018. P. 1–25. <https://doi.org/10.2118/190382-MS>

25. Bourrel M., Verzaro F., Chambu C. Effect of oil type on solubilization by amphiphiles // *SPE Reservoir Engineering*. 1987. Vol. 2. Issue 1. P. 41–53. <https://doi.org/10.2118/12674-PA>

26. Huh C. Interfacial tensions and solubilizing ability of a microemulsion phase that coexists with oil and brine // *Journal of Colloid and Interface Science*. 1979. Vol. 72. Issue 2. P. 408–426. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(79\)90249-2](https://doi.org/10.1016/0021-9797(79)90249-2)

27. Tichelkamp T., Vu Y., Nourani M., Oye G. Interfacial tension between low salinity solutions of sulfonate surfactants and crude and model // *Energy and Fuels*. 2014. Vol. 28. Issue 4 P. 2408–2414. <https://doi.org/10.1021/ef4024959>

REFERENCES

1. Alvarado V, Manrique E. Enhanced oil recovery: an update review. *Energies*. 2010;3(9):1529–1575. <https://doi.org/10.3390/en3091529>

2. Koltsov I, Groman A, Milchakov S, Tret'yakov N, Panicheva L, Volkova S, et al. Evaluating reservoir fluids geochemistry for planning of surfactant-polymer flooding. In: *IOR 2019: Proceedings of 20th European symposium on improved oil recovery*. 8–11 April 2019, Pau, France. Pau; 2019, vol. 2019, p. 1–17. <https://doi.org/10.3997/2214-4609.201900091>

3. Levitt D, Jackson AC, Heinson C, Britton LN, Malik T, Dwarakanath V, et al. Identification and Evaluation of High-Performance EOR Surfactants. *SPE Reservoir Evaluation & Engineering*. 2009;12(02):243–253. <https://doi.org/10.2118/100089-MS>

4. Negin C, Saeedi A, Xie Q. Most common surfactants employed in chemical enhanced oil recovery. *Petroleum*. 2017;3(2):197–211. <https://doi.org/10.1016/j.petlm.2016.11.007>

5. Massarweh O, Abushaikh AS. The use of surfactants in enhanced oil recovery: A review of recent advances. *Energy Reports*. 2020;6:3150–3178. <https://doi.org/10.1016/j.egyr.2020.11.009>

6. Ahmadi MA, Shadizadeh SR. Implementation of a high-performance surfactant for enhanced oil recovery from carbonate reservoirs. *Journal of Petroleum Science and Engineering*. 2013;110:66–73. <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2013.07.007>

7. Sidorovskaya EA, Turnaeva EA, Tret'yakov NYu, Panicheva LP, Groman AA, Mulyavin SF. Geological and geochemical characteristics of the field as the basis to select surfactant-polymer flooding compo-

nents. *Neft. Gaz. Novatsii*. 2020;2:29–35. (In Russian)

8. Du Z, Zhou D, Chen Y, Chen M, Zhu P. Surface properties of butanol phosphate esters in alkali solutions. *Journal of Surfactants and Detergents*. 2010;13(2):201–206. <https://doi.org/10.1007/s11743-009-1145-3>

9. Zhao T, Feng N, Zhao Y, Zhang G. Adsorption behavior and application performance of branched aliphatic alcohol polyoxyethylene ether phosphate. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2020;606:125482. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.125482>

10. Morvan M, Lannibois Drean H, Bendejacq D. Enhanced crude oil recovery. Patent FR, no. WO2008090267A2; 2007. (In France)

11. Pal S, Mushtaq M, Banat F, al Sumaiti AM. Review of surfactant-assisted chemical enhanced oil recovery for carbonate reservoirs: challenges and future perspectives. *Petroleum Science*. 2018;15(4):77–102. <https://doi.org/10.1007/s12182-017-0198-6>

12. Belhaj AF, Elraies KA, Mahmood SM, Zulkifli NN, Akbari S, Hussien OS-E. The effect of surfactant concentration, salinity, temperature, and pH on surfactant adsorption for chemical enhanced oil recovery: a review. *Journal of Petroleum Exploration and Production Technology*. 2020;10(1):125–137. <https://doi.org/10.1007/s13202-019-0685-y>

13. Tracy DJ, Reiersen RL. Commercial synthesis of monoalkyl phosphates. *Journal of Surfactants and Detergents*. 2002;5(2):169–172. <https://doi.org/10.1007/s11743-002-0218-9>

14. Dufour A, Thiébaud D, Ligiero L, Loriau M, Vial J. Chromatographic behavior and characterization of

polydisperse surfactants using Ultra-High-Performance Liquid Chromatography hyphenated to High-Resolution Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2020;1614:460731. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460731>

15. Belosinschi D, Chabot B, Brouillette F. Release paper: can phosphatase esters be an alternative to silicone? *Bioresources*. 2012;7(1):902–912.

16. O'Lenick Jr AJ, Parkinson JK. Phosphate esters: chemistry and properties. *Surfactants*. 1995;27(11):17–20.

17. Kamanda W, Benzagouta MS, AlQuraishi A, Amro MM. Effect of temperature, pressure, salinity, and surfactant concentration on IFT for surfactant flooding optimization. *Arabian Journal of Geosciences*. 2013;6(9):3535–3544. <https://doi.org/10.1007/s12517-012-0605-7>

18. Chou SI, Shah DO. The optimal salinity concept for oil displacement by oil-external microemuls and graded salinity slugs. *Journal of Canadian Petroleum Technology*. 1981;20(3):83–91. <https://doi.org/10.2118/81-03-08>

19. Nelson RC, Pope GA. Phase relationships in chemical flooding. *Journals of Society of Petroleum Engineers*. 1978;18(5):325–338. <https://doi.org/10.2118/6773-PA>

20. Walde P, Wessicken M, Rädler U, Berclaz N, Conde-Frieboes K, Luisi PL. Preparation and characterization of vesicles from mono-n-alkyl phosphates and phosphonates. *The Journal of Physical Chemistry B*. 1997;101(38):7390–7397. <https://doi.org/10.1021/jp970898n>

21. Puerto MC, Hirasaki GJ, Miller CA, Barnes JR. Surfactant systems for EOR in high-temperature, high-

salinities environment. *SPE Journal*. 2012;17(1):11–19. <https://doi.org/10.2118/129675-PA>

22. Schulman JH, Cockbain EG. Molecular interactions at oil/water interfaces. Part I. Molecular complex formation and the stability of oil in water emulsions. *Transactions of the Faraday Society*. 1940;35:651–661. <https://doi.org/10.1039/TF9403500651>

23. Kwon T-H, Lee ES, Lee SM, Baea J-Y. Synthesis of TRITON™ X-based phosphate ester surfactants and their self-charring behavior. *Polymer Degradation and Stability*. 2007;92(8):1546–1554. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2007.05.015>

24. Volokitin Y, Shuster M, Karpan V, Koltsov I, Mikhaylenko E, Bondar M, et al. Results of alkaline-surfactant-polymer flooding pilot at west salym field. In: *SPE EOR conference at oil and gas West Asia*. 26–28 March 2018, Muscat. 2018, p. 1–25. <https://doi.org/10.2118/190382-MS>

25. Bourrel M, Verzaro F, Chambu C. Effect of oil type on solubilization by amphiphiles. *SPE Reservoir Engineering*. 1987;2(1):41–53. <https://doi.org/10.2118/12674-PA>

26. Huh C. Interfacial tensions and solubilizing ability of a microemulsion phase that coexists with oil and brine. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1979;72(2):408–426. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(79\)90249-2](https://doi.org/10.1016/0021-9797(79)90249-2)

27. Tichelkamp T, Vu Y, Nourani M, Oye G. Interfacial tension between low salinity solutions of sulfonate surfactants and crude and model. *Energy and Fuels*. 2014;28(4):408–2414. <https://doi.org/10.1021/ef4024959>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Третьяков Николай Юрьевич,
к.х.н., профессор, директор ЦКП
«Рациональное природопользование
и физико-химические исследования»,
Тюменский государственный университет,
625003, г. Тюмень, ул. Володарского, 6,
Российская Федерация,
e-mail: nikckp@mail.ru

Паничева Лариса Петровна,

Турнаева Елена Анатольевна,
к.х.н., доцент, заведующая сектором
хроматографии и спектроскопии
ЦКП «Рациональное природопользование
и физико-химические исследования»,
Тюменский государственный университет,
625003, г. Тюмень, ул. Володарского, 6,
Российская Федерация,
✉ e-mail: eturnaeva@yandex.ru

Волкова Светлана Станиславовна,
к.х.н., профессор, заместитель директора
ЦКП «Рациональное природопользование

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Nikolai Yu. Tret'yakov,
Cand. Sci. (Chemistry), Professor,
Director of Research Resource Center
“Rational Nature Management and Physical
and Chemical Research”,
University of Tyumen,
6, Volodarsky St., Tyumen, 625003,
Russian Federation,
e-mail: nikckp@mail.ru

Larisa P. Panicheva,

Elena A. Turnaeva,
Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Head of Chromatography and Spectroscopy
Sector of Research Resource Center,
University of Tyumen,
6, Volodarsky St., Tyumen, 625003,
Russian Federation,
✉ e-mail: eturnaeva@yandex.ru

Svetlana S. Volkova,
Cand. Sci. (Chemistry), Professor,
Deputy Director of Research Resource Center,

и физико-химические исследования»,
Тюменский государственный университет,
625003, г. Тюмень, ул. Володарского, 6,
Российская Федерация,
e-mail: svolkova2008@mail.ru

Адаховский Денис Сергеевич,
аспирант,
Тюменский государственный университет,
625003, г. Тюмень, ул. Володарского, 6,
Российская Федерация,
e-mail: denisa1494@gmail.com

Матвеев Максим Рауфович,
к.х.н., директор по развитию бизнеса,
НОРКЕМ лимитед,
FRN1913 г. Флориана
набережная Валлетта № 6
45-46 Комплекс Форни, причал Пинто,
Мальта
e-mail: m.matveev@norchem.com.mt

Кольцов Игорь Николаевич,
эксперт технологического офиса
«Методы увеличения нефтеотдачи»,
ООО «ГАЗПРОМНЕФТЬ – Технологические
Партнерства»,
190000, г. Санкт-Петербург, ул. Якубовича, 24а,
Российская Федерация,
e-mail: koltsov.in@gazprom-neft.ru

Громан Андрей Андреевич,
руководитель технологического офиса
«Методы увеличения нефтеотдачи»,
ООО «ГАЗПРОМНЕФТЬ – Технологические
Партнерства»,
190000, г. Санкт-Петербург, ул. Якубовича, 24а,
Российская Федерация,
e-mail: Groman.AA@gazpromneft-ntc.ru

Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта ин-
тересов.

*Все авторы прочитали и одобрили оконча-
тельный вариант рукописи.*

*Поступила в редакцию 14.11.2020
Одобрена после рецензирования 11.01.2021.
Принята к публикации 28.02.2021.*

“Rational Nature Management and Physical
and Chemical Research”,
University of Tyumen,
6, Volodarsky St., Tyumen, 625003,
Russian Federation,
e-mail: svolkova2008@mail.ru

Denis S. Adakhovskii,
Postgraduate Student,
University of Tyumen,
6, Volodarsky St., Tyumen, 625003,
Russian Federation,
e-mail: denisa1494@gmail.com

Maxim R. Matveev,
Cand. Sci. (Chemistry),
Director of Business Development,
NORCHEM Limited,
Valletta Waterfront, no. 6,
45-46 Forni Complex, Pinto Wharf, Floriana
FRN1913, Malta,
e-mail: m.matveev@norchem.com.mt

Igor N. Koltsov,
Expert of EOR Technology Office
“Methods of enhanced oil recovery”,
Gazpromneft – Technological Partnerships LLC,
24a, Yakubovich St., Saint Petersburg, 190000,
Russian Federation,
e-mail: koltsov.in@gazprom-neft.ru

Andrey A. Groman,
Head of EOR Technology Office
“Methods of enhanced oil recovery”,
Gazpromneft – Technological Partnerships LLC,
24a, Yakubovich St., Saint Petersburg, 190000,
Russian Federation,
e-mail: Groman.AA@gazpromneft-ntc.ru

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests re-
garding the publication of this article.

*The final manuscript has been read and ap-
proved by all the co-authors.*

*The article was submitted 14.11.2020.
Approved after reviewing 11.01.2021.
Accepted for publication 28.02.2021.*

Оригинальная статья / Original article

УДК 544.723.2 : 546.766

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-159-164>



Процесс адсорбционного извлечения ионов хрома(VI) из агрессивных водных растворов

© О.В. Рыбарчук, В.И. Дударев, Г.Н. Дударева

Иркутский национальный исследовательский технический университет,
г. Иркутск, Российская Федерация

Резюме: Хром – один из наиболее эффективных металлов, использующихся для защиты и декоративного покрытия разнообразных изделий. Однако процесс хромирования протекает, как правило, в сильноокислой среде, что влечет за собой образований опасных и агрессивных растворов. Для удаления хрома из таких растворов исследована возможность использования углеродного адсорбента, который позволяет осуществлять практически полное извлечение металла из производственных растворов до остаточного содержания не более $0,05 \text{ мг/дм}^3$. Одним из значимых преимуществ углеродного адсорбента является его способность извлекать ионы хрома(VI) без стадии его восстановления до трехвалентного состояния. Установлено, что максимальная сорбционная емкость сорбента проявляется в сильноокислой среде при $\text{pH} = 1,2\text{--}2,5$. Такая среда обуславливает образование в растворе димера $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, являющегося адсорбируемым ионом. Предложена схема узла адсорбционного извлечения металла из растворов электрохимического производства. В качестве аппарата выбран адсорбер с псевдооживленным слоем, поскольку взаимодействие потока с адсорбентом в данных реакторах является максимальным. Конструкция адсорбера в виде цилиндрической колонны с конусообразными верхней и нижней частями предполагает установку внутри аппарата распределительных решеток. Предлагается отработанный хромосодержащий раствор электрохимического производства после усреднителя направлять напрямую в адсорбер с загрузкой углеродного адсорбента. В целях обеспечения непрерывности режима очистки необходимо применять два параллельно работающих адсорбера. Рассчитаны технические параметры адсорбера: диаметр – 1,2 м; высота – 7,5 м; объем загрузки – $5,9 \text{ м}^3$; высота загрузки – 6 м, а также характеристики процесса: линейная скорость потока вдоль стенок адсорбера – $12,75 \text{ м/ч}$; продолжительность работы аппарата до регенерации угля – 21 сутки. Предложенная схема может быть рекомендована для создания оборотного водопользования.

Ключевые слова: ионы хрома(VI), углеродный адсорбент, адсорбер, технологическая схема

Для цитирования: Рыбарчук О.В., Дударев В.И., Дударева Г.Н. Процесс адсорбционного извлечения ионов хрома(VI) из агрессивных водных растворов. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т. 11. N 1. С. 159–164. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-159-164>

Adsorptive extraction of chromium (VI) ions from corrosive aqueous solutions

Olga V. Rybarchuk, Vladimir I. Dudarev, Galina N. Dudareva

Irkutsk National Research Technical University,
Irkutsk, Russian Federation

Abstract: Chromium is one of the most effective metals used for protection and decorative coating of various products. However, chrome plating typically occurs in a strongly acid medium, thus involving the formation of dangerous and corrosive solutions. In this article, we investigate the possibility of removing chromium from such solutions using carbon adsorbents, which allow for almost complete extraction of the metal from production solutions up to a residual content of no more than 0.05 mg/dm^3 . A significant advantage of carbon adsorbents is their ability to extract chromium (VI) ions without chromium reduction to the trivalent state. It was established that the sorbent under study exhibits the maximum sorption capacity in a strongly acidic medium at $\text{pH} = 1.2\text{--}2.5$. This medium causes the formation of a $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ dimer in the solution, which is an adsorbed ion. A scheme of a production unit for chromium adsorption from solutions of electrochemical production was proposed. The choice of an adsorber with a fluidized bed was determined by the maximal interaction of the flow with the adsorbent in such reactors. The adsorber design in the form of a cylindrical column with tapered upper and lower parts assumes installation of distribution grids inside the apparatus. It is proposed to forward the chromium-containing solution of electrochemical production remained after the avera-

ging tank directly to the adsorber with the loading of the carbon adsorbent. In order to ensure the continuity of the extraction mode, it is necessary to apply two parallel working adsorbers, whose technical parameters were calculated to be as follows: the diameter of 1.2 m; the height of 7.5 m; the loading volume of 5.9 m³; and the loading height of 6 m. The calculated process parameters were determined: the linear flow rate along the walls of the adsorber – 12.75 m/h; the duration of the apparatus operation before coal regeneration – 21 days. The proposed scheme can be recommended for recycling water supply.

Keywords: chromium (VI) ions, carbon adsorbent, adsorber, technological scheme

For citation: Rybarchuk OV, Dudarev VI, Dudareva GN. Adsorptive extraction of chromium (VI) ions from corrosive aqueous solutions. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(1):159–164. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/227-2925-2021-11-1-159-164>

ВВЕДЕНИЕ

Хром является одним из наиболее эффективных металлов, использующихся для защиты поверхности разнообразных изделий промышленного и бытового назначения [1–9]. Декоративные и прочностные свойства хромового покрытия, несмотря на технологические сложности нанесения его на поверхность, позволяют электрохимическому производству сохранять и развивать технологию в широком промышленном и географическом диапазоне¹ [10–14]. Процесс покрытия изделий хромом осуществляется, как правило, в сильноокислой среде [15], что влечет за собой образование опасных агрессивных водных растворов. По сложившейся практике концентрированные растворы хрома нейтрализуются и осаждаются большим количеством стандартных реагентов, например, бисульфитом натрия, и затем хранятся длительное время в высокотоксичных шламохранилищах [16].

Ранее авторами настоящей статьи был разработан адсорбционный процесс извлечения ионов хрома(VI) из отработанных электрохимических растворов с использованием углеродного адсорбента [17]. Процесс позволяет осуществлять практически полное извлечение металла из производственных растворов до остаточного содержания не более 0,05 мг/дм³, что соответствует требованиям ГН 2.1.5.1305-03². Цель данной работы – расчет и аппаратное оформление этого процесса.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Углеродный адсорбент представляет собой черные гранулы неправильной формы со средним размером частиц от 0,5 до 2 мм. Удельная поверхность определена по адсорбции йода и составляет 550 м²/г. Суммарный объем пор (по воде) составил 0,61 см³/г, сорбционная активность по йоду – 84%. Механическая прочность

адсорбента – 82%, насыпная плотность – 550 г/дм³. Сорбционная емкость адсорбента по отношению к ионам хрома(VI) была определена в статическом режиме и составила 1,21 ммоль/г (при температуре 294 К). В динамическом режиме обменная емкость составила около 60% от статической (при температуре 294 К равна 0,7 ммоль/г) [18].

Концентрацию ионов хрома(VI) в исследуемых растворах определяли спектрофотометрическим методом (прибор КФК-3, Россия)³. Периодически концентрацию ионов металла контролировали атомно-абсорбционным методом (прибор Квант-2А, Россия) и ICP-методом количественного анализа (прибор ICPE-9000, Shimadzu, Япония). Контрольный анализ катионного состава сточных вод проводили с применением ионного хроматографа фирмы Shimadzu (Япония) с кондуктометрическим детектором CDD-10 AVP.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Одно из значимых качеств адсорбента – способность извлекать ионы хрома(VI) без стадии его восстановления до трехвалентного состояния. Установлено, что максимальная сорбционная емкость наблюдается в кислой среде при pH = 1,2–2,5 [18]. Такая среда обуславливает образование в растворе димера Cr₂O₇²⁻, являющегося адсорбируемым ионом. Возможности применения углеродного адсорбента исследованы с целью использования в производственной схеме действующего машиностроительного предприятия.

В предлагаемом варианте отработанный хромсодержащий раствор электрохимического производства после усреднителя направляется напрямую в адсорбер с загрузкой углеродного адсорбента. Разработанная схема узла извлечения ионов хрома(VI) адсорбционным методом представлена на рисунке.

¹Joung J.P. Codeposition of particulate matter with chromium // *Plating Surf. Finish*. 1975. No. 62 (4). P. 348–349.

²ГН 2.1.5.1305-03. Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования: постановл. Министерства здравоохранения РФ от 30.04.2003 г. № 78.

³Лаврухина А.К., Юкина Л.В. Аналитическая химия хрома. М.: Наука. 1979. 218 с.

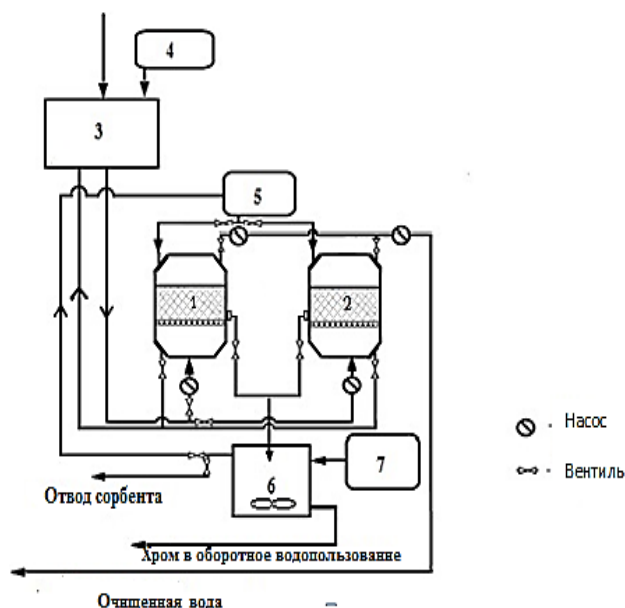


Схема узла извлечения ионов хрома(VI) адсорбционным методом:

1, 2 – адсорберы с псевдоожиженным слоем;
 3 – усреднитель хромосодержащих растворов;
 4 – емкость с кислотой; 5 – емкость с адсорбентом;
 6 – десорбер; 7 – емкость с NaOH

Scheme of unit for chromium (VI) ions absorption extraction:

1, 2 – fluidized bed adsorbers;
 3 – chromium solution tank;
 4 – acid tank; 5 – container with adsorbent;
 6 – desorber; 7 – NaOH tank

Отработанные хромсодержащие растворы на производстве выделяются отдельной линией, поэтому на извлечение ионов хрома(VI) не оказывают влияния ионы других металлов. Растворы проходят через усреднитель 3 для корректировки pH, где оптимальную кислотность среды (pH = 1–2) поддерживают добавлением раствора серной кислоты из емкости 4. Затем хромовый раствор насосом подается в нижнюю корпусную часть адсорбера 1 (2), далее происходит процесс сорбции на углеродном адсорбенте. В качестве реакторов выбраны адсорберы с псевдоожиженным слоем. Данные аппараты имеют ряд преимуществ по сравнению с другими конструкциями адсорберов: большая площадь контакта фаз при том же объеме загрузки, большее время контакта фаз. Взаимодействие потока с адсорбентом в таких реакторах является максимальным. Бак 5 служит емкостью для хранения адсорбента перед подачей его в аппарат. Очищенный раствор выводится из адсорбера через отверстие в верхней части аппарата. Концентрация хрома(VI) на выходе из аппарата не превышает предельно допустимую (ПДК) и составляет

0,05 мг/дм³ (как для водоемов рыбохозяйственного назначения). Для организации непрерывного процесса предложено использовать два адсорбера: после насыщения углеродного адсорбента в первом аппарате его переключают на перезагрузку, а второй включают на сорбцию. Во время перезагрузки адсорбент направляется в десорбер 6, оснащенный мешалкой, куда подается 1%-й раствор гидроксида натрия 7. Концентрированный раствор хрома после десорбции предлагается возвращать в электрохимическое производство для дальнейшего использования хрома. Регенерированный адсорбент направляется в бак 5. Сорбционные возможности адсорбента позволяют использовать его в пяти полных циклах сорбционно-десорбционного процесса. Отработанный адсорбент из адсорбера отводится в смеситель. После десорбции элюат обрабатывается гидроксидом кальция. Полученный осадок отфильтровывается, а затем хром переводится в концентрированный раствор бихромата калия и может использоваться повторно в электрохимическом процессе.

Разработанные на сегодняшний день модели адсорберов позволяют применять их в качестве основных аппаратов, однако они должны быть адаптированы под конкретное производство. Нами выполнен расчет параметров адсорбера с псевдоожиженным слоем для извлечения металла с применением углеродного адсорбента. Конструкция адсорбера в виде цилиндрической колонны с конусообразными верхней и нижней частями предполагает установку внутри аппарата распределительных решеток. Для загрузки фильтрующего материала в верхней части колонны предусмотрен штуцер. Для выгрузки адсорбента штуцер установлен на уровне распределительной решетки. Расчет основных параметров адсорбера производили согласно СНиП 2.04.03-85⁴ с учетом данных, полученных в ходе опытных исследований. Содержание ионов хрома в данных растворах находится в пределах 0,2–29,7 мг/дм³ (табл. 1).

По полученным результатам остаточная концентрация ионов хрома(VI) в исследуемых растворах составила 0,03–0,04 мг/дм³. В качестве исходных данных для расчета адсорбционного извлечения металла принимали следующие: начальная концентрация ионов хрома(VI) C_n – 10 мг/л; требуемая степень извлечения C_k – 0,03 мг/дм³; производительность q_w – 12,5 м³/ч; изотерма сорбции соответствует уравнению Фрейндлиха: a_{sb} в мг/г; C в мг/дм³; $a_{sb}^{max} = 4,52 \cdot C_k^{1/1,94}$; углеродный адсорбент имеет истинную плотность ρ_T – 1700 кг/м³, насыпную ρ_{nac} – 550 кг/м³, диаметр гранул адсорбента $d = 0,5$ –2 мм; заданная степень исчерпания

⁴СНиП 2.04.03-85. Строительные нормы и правила. Канализация. Наружные сети и сооружения (с Изменениями № 1); утв. постановл. Госкомитета СССР по делам строительства от 21.05.1985 г. № 71. М.: ЦИТП Госстроя СССР. 1986. 70 с.

емкости адсорбента $K_{sb} = 0,7$; порозность неподвижного слоя $\varepsilon_n = 0,5$.

В сутки аппарат может пропускать 300 м^3 отработанных растворов. За это время загрузка из углеродного адсорбента способна поглотить до 3000 г хрома. Время контакта фаз в псевдоожиженном слое составит 20 мин. Переключение адсорберов обычно производится раньше полного насыщения загрузки, поскольку при времени, граничащем со временем полного насыщения адсорбента, концентрация металлов в растворе близка к равновесной и скорость сорбции снижается.

Результаты расчетов параметров адсорбера представлены в табл. 2.

Выполнено технико-экономическое обоснование и сравнение предложенного способа извлечения хрома с существующими технологиями с учетом требований, предъявляемых к качеству очищенной воды, на примере машиностроительного завода. На реализацию реагентного способа извлечения на действующем предприятии расходы на материалы составляют 5909,77 тыс. руб. в год, а эксплуатационные затраты в целом достигают 6648,96 тыс. руб. в год [15]. При использовании же адсорбционного метода затраты на материалы составят 4216,98 тыс. руб. в год, что почти на 30% ниже текущих затрат. Представленная схема позволит сократить затраты производства на 1482,37 тыс. руб. в год.

Таблица 1. Усредненный химический состав хромсодержащих растворов электрохимического производства

Table 1. Average chemical composition of chromium solutions of electrochemical industry

Источник загрязнения отработанной воды	Концентрация ионов металлов, мг/дм ³			
	Медь(II)	Цинк(II)	Железо(III)	Хром(VI)
После меднения и цинкования	73,1	25,0	111,9	29,7
После нейтрализации стоков	6,8	4,1	24,9	2,4
После хромирования	46,0	12,6	58,0	14,1
После нейтрализации хромово-кислых стоков	6,9	2,4	8,2	0,3
После промывки алюминиевых плат	0,7	3,4	10,0	0,2

Таблица 2. Характеристики адсорбера с псевдоожиженным слоем адсорбента для извлечения ионов хрома(VI)

Table 2. Characteristics of fluidized adsorbent bed plant for chromium (VI) ions extraction

Показатель	Значение
Размер частиц адсорбента, мм	0,5–2,0
Общая площадь работающих адсорберов, м ²	0,98
Высота загрузки одного адсорбера, м	6
Линейная скорость потока, м/ч	12,75
Высота адсорбера, м	7,5
Диаметр адсорбера, м	1,2
Продолжительность работы одного адсорбера до регенерации адсорбента, сут.	21
Продолжительность работы одного адсорбера до перезагрузки адсорбента, сут.	57

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана схема узла извлечения ионов хрома(VI) из агрессивных водных промышленных растворов с применением углеродных адсорбентов. В качестве реакторов выбраны адсорберы с псевдоожиженным слоем, поскольку взаимодействие потока с адсорбентом в данных реакторах является максимальным. Рассчитаны

основные параметры адсорбера. Адсорбционный метод извлечения металла с применением углеродного адсорбента является весьма эффективным и позволяет производить извлечение хрома до ПДК водных растворов. Экономический эффект от внедрения адсорбционной схемы существенно сократит сверхнормативные затраты производства.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Солодкова Л.Н., Кудрявцев В.Н. Электрохимическое хромирование. М.: Глобус, 2007. 191 с.
2. Успехи гальванотехники. Обзор мировой специальной литературы за 2016–2017 годы // Гальванопластика и обработка поверхности. 2018. Т. 26. N 1. С. 4–10. https://doi.org/10.47188/0869-5326_2018_26_1_4
3. Железнов Е.В., Кузнецов В.В. Композиционные хромовые покрытия с ультрадисперсными частицами ВNвюрц и WC, получаемые из электролитов на основе Cr(VI) // Гальванотехника и обработка поверхности. 2017. Т. 25. N 1. С. 34–40. https://doi.org/10.47188/0869-5326_2017_25_1_34
4. Bakanov V.I., Nesterova N.V., Yakupov A.A.

Features of electroplating of nanocrystalline chromium coatings from electrolytes based on Cr(III) // Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces. 2017. Vol. 53. Issue 3. P. 426–432. <https://doi.org/10.1134/S2070205117030054>

5. Tseluikin V.N. On the structure and properties of composite electrochemical coatings. A review // Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces. 2016. Vol. 52. Issue 2. P. 254–266. <https://doi.org/10.1134/S2070205116010251>

6. Isakov V.P., Lyamkin A.I., Nikitin D.N., Shalimova A.S., Solntsev A.V. Structure and properties of chromium-nanodiamond composite electrochemical coatings // Protection of Metals and Physical Chemi-

stry of Surfaces. 2010. Vol. 46. Issue 5. P. 578–581. <https://doi.org/10.1134/S2070205110050138>

7. Vinokurov E.G., Arsenkin A.M., Grigorovich K.V., Bondar' V.V. Electrodeposition and physico-mechanical properties of chromium coatings modified with disperse particles // *Protection of Metals*. 2006. Vol. 42. Issue 3. P. 290–294. <https://doi.org/10.1134/S0033173206030131>

8. Поляков Н.А., Абрашов А.А., Паутов Д.В., Данилов А.И. Защитная способность композиционных хромовых покрытий из сульфатнооксалатных растворов-суспензий Cr(III) с добавками наночастиц SiC, Al₂O₃, SiO₂ и MoS // *Практика противокоррозионной защиты*. 2013. N 4 (70). С. 63–65.

9. Бородин И.П., Шатов Ю.С., Ширяев В.Ю., Щеренкова И.С. Структура и свойства хромовых покрытий с нанодiamondными упрочняющими частицами // *Наноиндустрия*. 2011. N 2 (26). С. 40–43.

10. Rekha M.Y., Punith Kumar M.K., Srivastava C. Electrochemical behaviour of chromium-graphene composite coatings // *RSC Advances*. 2016. Vol. 6. Issue 67. P. 62083–62090. <https://doi.org/10.1039/C6RA06509K>

11. Narayan R., Narayana B.H. Electrodeposited chromium-graphite composite coatings // *Journal of the Electrochemical Science and Technology*. 1981. Vol. 128. Issue 8. P. 1704–1708.

12. Графушин Р.В., Винокуров Е.Г., Махина В.С., Бурхуша Т.Ф. Электроосаждение и физико-механические свойства композиционных покрытий на основе хрома с различными модификациями углерода // *Гальванотехника и обработка поверх-*

ности. 2018. Т. 26. N 2. С. 26–32. https://doi.org/10.47188/0869-5326_2018_26_2_26

13. Перельгин Ю.П. Некоторые вопросы экологии гальванического производства // *Гальванотехника и обработка поверхности*. 2018. Т. 26. N 2. С. 57–61. https://doi.org/10.47188/0869-5326_2018_26_2_57

14. Перельгин Ю.П., Зорькина О.В., Безбородова О.Е., Зуева Т.В., Флягин А.А. Новый подход к очистке сточных вод и отработанных электролитов гальванических производств // *Водоочистка, водоподготовка, водоснабжение*. 2010. N 2 (26). С. 54–57.

15. Виноградов С.С. Экологически безопасное гальваническое производство. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Глобус, 2002. 352 с.

16. Фазлутдинов К.К., Марков В.Ф., Маскаева Л.Н. Утилизация хромсодержащих стоков. Часть 1. Структура и состав осадков при восстановлении хрома(VI) железной стружкой в сернокислых растворах // *Бутлеровские сообщения*. 2014. Т. 37. N 2. С. 10–17.

17. Пат. № 2547756, Российская Федерация. Способ очистки сточных вод от ионов хрома(VI) / О.В. Климова, В.И. Дударев, Е.Г. Филатова; патентообладатель Иркутский государственный технический университет; заявл. 13.11.2013; опубл. 10.04.2015. Бюл. № 10.

18. Климова О.В., Дударев В.И., Филатова Е.Г. Изучение процессов сорбции ионов хрома(VI) на углеродном сорбенте // *Водоочистка*. 2013. N 10. С. 6–14.

REFERENCES

1. Solodkova LN, Kudryavtsev VN. *Electrochemical chrome plating*. Moscow: Globus; 2007. 191 p. (in Russian).

2. Jelinek TW. Advances in metal finishing – an assessment of the international literature 2016–2017. *Galvanotekhnika i obrabotka poverkhnosti*. 2018;26(1):4–10. (In Russian) https://doi.org/10.47188/0869-5326_2018_26_1_4

3. Zheleznov EV, Kuznetsov VV. Chromium-based composite coatings deposited from Cr (VI) baths containing ultradispersed particles of BNwuerzie and WC. *Galvanotekhnika i obrabotka poverkhnosti*. 2017;25(1):34–40. (In Russian) https://doi.org/10.47188/0869-5326_2017_25_1_34

4. Bakanov VI, Nesterova NV, Yakupov AA. Features of electroplating of nanocrystalline chromium coatings from electrolytes based on Cr(III). *Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces*. 2017;53(3):426–432. <https://doi.org/10.1134/S2070205117030054>

5. Tseluikin VN. On the structure and properties of composite electrochemical coatings. A review. *Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces*. 2016;52(2):254–266. <https://doi.org/10.1134/S2070205116010251>

6. Isakov VP, Lyamkin AI, Nikitin DN, Shalimova AS, Solntsev AV. Structure and properties of

chromium-nanodiamond composite electrochemical coatings. *Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces*. 2010;46(5):578–581. <https://doi.org/10.1134/S2070205110050138>

7. Vinokurov EG, Arsenkin AM, Grigorovich KV, Bondar' VV. Electrodeposition and physico-mechanical properties of chromium coatings modified with disperse particles. *Protection of Metals*. 2006;42(3):290–294. <https://doi.org/10.1134/S0033173206030131>

8. Polyakov NA, Abrashov AA, Pautov DV, Danilov AI. Protective ability of composite chromium coatings from sulfate-oxalate suspension Cr (III) solutions with additives of SiC, Al₂O₃, SiO₂ and MoS₂ nanoparticles. *Praktika protivokorroziionnoi zashchity*. 2013;4:63–65. (In Russian)

9. Borodin IP, Shatov US, Shiryayev VU, Scherenkova IS. Structure and properties of chromic coatings with nanodiamond strengthening particles. *Nanoindustriya = Nanoindustry*. 2011;2:40–43. (In Russian)

10. Rekha MY, Punith Kumar MK, Srivastava C. Electrochemical behaviour of chromium-graphene composite coatings. *RSC Advances*. 2016;6(67):62083–62090. <https://doi.org/10.1039/C6RA06509K>

11. Narayan R, Narayana BH. Electrodeposited

chromium-graphite composite coatings. *Journal of the Electrochemical Science and Technology*. 1981; 128(8):1704–1708.

12. Grafushin RV, Vinokurov EG, Makhina VS, Burukhina TF. Electrodeposition and physic-mechanical properties of composite coatings based on chrome with various carbon modifications. *Gal'vanotekhnika i obrabotka poverkhnosti*. 2018;26(2):26–32. (In Russian) https://doi.org/10.47188/0869-5326_2018_26_2_26

13. Pereygin YuP. Some Environmental Problems in Electroplating Industry. *Gal'vanotekhnika i obrabotka poverkhnosti*. 2018;26(2):57–61. (In Russian) https://doi.org/10.47188/0869-5326_2018_26_2_57

14. Pereygin YuP, Zorkina OV, Bezborodova OYe, Zueva TV, Flyagin AA. The new approach to sewage treatment and the fulfilled electrolytes. *Vodoochistka, vodopodgotovka, vodosnabzhenie*.

2010;2:54–57. (In Russian)

15. Vinogradov SS. *Environmentally safe galvanic production*. Moscow: Globus; 2002. 352 p. (In Russian)

16. Fazlutdinov KK, Markov VPh, Maskayeva LN. Disposal of waste chromium. Part 1. The structure and composition of precipitation during recovery of chromium (VI) iron shavings in sulfuric acid solutions. *Butlerovskie soobshcheniya = Butlerov Communications*. 2014;37(2):10–17. (In Russian)

17. Klimova OV, Dudarev VI, Filatova EG. *Method of purifying waste water from chromium (VI)*. Patent RF, no. 2547756; 2013. (In Russian)

18. Dudarev VI, Filatova EG, Klimova OV. Study of the processes of sorption of chrome (VI) ions at carbonic sorbent. *Vodoochistka*. 2013;10:6–14. (In Russian)

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Рыбарчук Ольга Владилинвна,

к.т.н., доцент

Иркутский национальный исследовательский технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
✉ e-mail: Oklim89@mail.ru

Дударев Владимир Иванович,

д.т.н., профессор,

Иркутский национальный исследовательский технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
e-mail: vdudarev@mail.ru

Дударева Галина Николаевна,

к.х.н., доцент

Иркутский национальный исследовательский технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
e-mail: gndudareva@mail.ru

Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Поступила в редакцию 13.05.2020.

Одобрена после рецензирования 28.06.2020.

Принята к публикации 28.02.2021.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Olga V. Rybarchuk,

Cand. Sci. (Engineering),

Associate Professor,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
✉ e-mail: Oklim89@mail.ru

Vladimir I. Dudarev,

Dr. Sci. (Engineering), Professor

Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
e-mail: vdudarev@mail.ru

Galina N. Dudareva,

Cand. Sci. (Chemistry)

Associate Professor,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
e-mail: gndudareva@mail.ru

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

The final manuscript has been read and approved by all the co-authors.

The article was submitted 13.05.2020.

Approved after reviewing 28.06.2020.

Accepted for publication 28.02.2021.

Оригинальная статья / Original article

УДК 546.56-121 : 546.05 : 547.781.1

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-165-170>



Исследование металлополимерных нанокompозитов меди методом УФ-спектроскопии

© А.А. Иванова, А.И. Емельянов,
С.А. Коржова, А.С. Поздняков

Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН,
г. Иркутск, Российская Федерация

Резюме. Получены новые полимерные медьсодержащие нанокompозиты на основе поли-*N*-винилимидазола. Формирование нанокompозитов осуществляли методом химического восстановления ионов меди из раствора ацетата меди аскорбиновой кислотой в водной среде в присутствии полимера. Нанокompозиты получали при молярном соотношении полимер:Cu(II) 10:1 и 5:1. В результате реакции восстановления были получены нанокompозиты в виде порошков красно-коричневого цвета с металлическим блеском. Установлено, что содержание меди в полученных нанокompозитах зависит от исходного молярного соотношения стабилизирующего поли-*N*-винилимидазола и Cu(II) и составляет 5,9 и 11,7%. Образование наноразмерных частиц меди исследовано и подтверждено методом УФ-спектроскопии. В оптических спектрах водных растворов медьсодержащих нанокompозитов наблюдаются максимумы при 537–541 и 646–651 нм, что подтверждает образование ультрадисперсной меди в наноразмерном состоянии. Полученные медьсодержащие нанокompозиты на основе поли-*N*-винилимидазола являются перспективными в медицине, катализе, для применения в оптических, сенсорных и электронных устройствах.

Ключевые слова: поли-*N*-винилимидазол, полимерные нанокompозиты, наночастицы меди

Благодарности: Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Иркутской области (проект № 20-43-383004). Основные результаты получены с использованием оборудования Байкальского аналитического центра коллективного пользования СО РАН.

Для цитирования: Иванова А.А., Емельянов А.И., Коржова С.А., Поздняков А.С. Исследование металлополимерных нанокompозитов меди методом УФ-спектроскопии. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т. 11. N 1. С. 165–170. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-165-170>

Study of metal-polymer copper nanocomposites using the method of UV spectroscopy

Anastasia A. Ivanova, Artem I. Emel'yanov,
Svetlana A. Korzhova, Alexander S. Pozdnyakov

A.E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry SB RAS, Irkutsk, Russian Federation

Abstract: New polymer copper-containing nanocomposites based on poly-*N*-vinylimidazole were obtained. The formation of nanocomposites was carried out using the method of chemical reduction of copper ions from a solution of copper acetate with ascorbic acid in an aqueous medium in the presence of a polymer. Nanocomposites were prepared at the polymer:Cu (II) molar ratio of 10:1 and 5:1. The reduction reaction yielded powder nanocomposites of a red-brown colour and having a metallic shine. It was found that the content of copper in the obtained nanocomposites depends on the initial molar ratio of the stabilising poly-*N*-vinylimidazole and Cu (II), reaching 5.9% and 11.7%. The formation of nanosized copper particles was investigated and confirmed by UV spectroscopy. The optical spectra of aqueous solutions of the obtained copper-containing nanocomposites contained maxima at 537–541 and 646–651 nm, which confirmed the formation of ultradispersed copper in the nanosized state. The obtained copper-containing nanocomposites based on poly-*N*-vinylimidazole are promising materials for use in medicine and catalysis, as well as in optical, sensor and electronic devices.

Keywords: poly-*N*-vinylimidazole, polymer nanocomposites, copper nanoparticles

Acknowledgments. The research was carried out with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research and the Government of the Irkutsk Region (project No. 20-43-383004). The main results were obtained using the equipment of the Baikal Analytical Centre for Collective Use of the SB RAS.

For citation: Ivanova AA, Emel'yanov AI, Korzhova SA, Pozdnyakov AS. Study of metal-polymer copper nanocomposites using the method of UV spectroscopy. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya* = *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(1):165–170. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-165-170>

ВВЕДЕНИЕ

Наночастицы металлов являются объектами активного изучения в связи с их повышенной реакционной способностью, интересными биологическими свойствами, малыми размерами и способностью проникать в клетки организма [1–3]. В настоящее время наблюдается значительный рост использования наноразмерных структур, в частности, наночастиц меди. Специфические свойства наночастиц меди открывают широкие возможности для создания новых композитов для медицины, сельского хозяйства, эффективных катализаторов, сенсорных систем и другое [4–6].

Одной из важнейших проблем является синтез стабильных наночастиц заданного размера, в течение длительного времени сохраняющих высокую химическую или биологическую активность. Поэтому поиск путей стабилизации таких частиц является актуальным направлением исследования. В качестве эффективных стабилизаторов используются различные высокомолекулярные соединения как природного (хитозан, целлюлоза, арабиногалактан и др.) [7, 8], так и синтетического (поли-N-винилпирролидон, полиакриламид, поли-N-винил-1,2,4-триазол и др.) происхождения [9–11].

В данной работе в качестве стабилизатора мелкодисперсных частиц меди был использован поли-N-винилимидазол (ПВИ), который обладает широким спектром практически значимых свойств и активно используется в различных областях [12, 13]. Отличительной особенностью полимеров на основе поли-N-винилимидазола является наличие пиридинового атома азота в структуре азольного кольца, который проявляет электронодонорные свойства, что открывает широкие возможности для модификации полимеров. Такие полимеры эффективно сорбируют ионы металлов, образуя координационные комплексы с каталитической активностью [14, 15].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

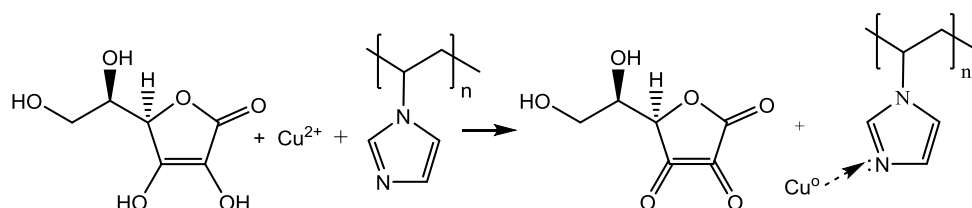
В качестве исходных соединений использо-

вали поли-N-винилимидазол, полученный по методике, представленной в работе [16], моногидрат ацетата меди ($\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – CuAc) (99,9%, Sigma-Aldrich) и аскорбиновую кислоту (99,9%, Sigma-Aldrich). Этиловый спирт и ацетон очищали в соответствии с общепринятыми методиками. Содержание меди в нанокompозитах определяли методом атомно-абсорбционного анализа с использованием Shimadzu AA-6200. УФ-спектры снимали на спектрофотометре Shimadzu UV 2450.

Синтез нанокompозитов: Синтез проводили на водяной бане с обратным холодильником. Смесь ПВИ (3,2 ммоль) и аскорбиновой кислоты (2,7 и 6,4 ммоль), растворенных в воде, интенсивно перемешивали в течение 40 мин, нагревая до 80 °С. Затем по каплям добавляли водный раствор моногидрата ацетата меди (0,3 и 0,6 ммоль) и перемешивали в течение 2 ч. Реакционную смесь осаждали в ацетон, центрифугировали и сушили до постоянного веса. В результате получены нанокompозиты в виде темно-коричневых порошков с выходом 83–85%.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Восстановление ионов меди из CuAc осуществляли в водной среде при постоянном перемешивании в присутствии полимера и восстановителя. Молярное соотношение ПВИ : Cu(II) составляло 10:1 и 5:1. Для предотвращения окисления наночастиц во время синтеза в растворе создавалась бескислородная среда. В качестве восстановителя использовали аскорбиновую кислоту, которая широко применяется для восстановления ионов меди [17, 18], при этом восстановление металла происходит даже при малых концентрациях кислоты [18]. Редокс-процесс обеспечивается за счет электронного перехода от восстановителя L-аскорбиновой кислоты к ионам меди, и происходит последующее зарождение атомов меди в матрице стабилизирующего агента [19].



В ходе реакции наблюдается изменение цвета реакционной смеси от светло-коричневого до темного красно-коричневого. В результате реакции восстановления были получены нанокompо-

зиты в виде порошков красно-коричневого цвета с содержанием меди 5,9 и 11,7%.

За ходом реакции следили по спектрам оптического поглощения реакционных растворов в

водной среде. Спектры регистрировали через различные интервалы времени после добавления моногидрата ацетата меди к смеси полимера и аскорбиновой кислоты. На рис. 1, а представлены спектры исходных соединений.

При смешении ПВИ и аскорбиновой кислоты при комнатной температуре видимых изменений

не происходит. После нагревания до 80 °С появляется плечо с максимумом 354 нм (рис. 1, б). Введение в смесь водного раствора ацетата меди приводит к появлению интенсивного пика в той же области, при этом полностью исчезает пик с максимумом 755 нм, соответствующий Cu^{2+} (см. рис. 1, б).

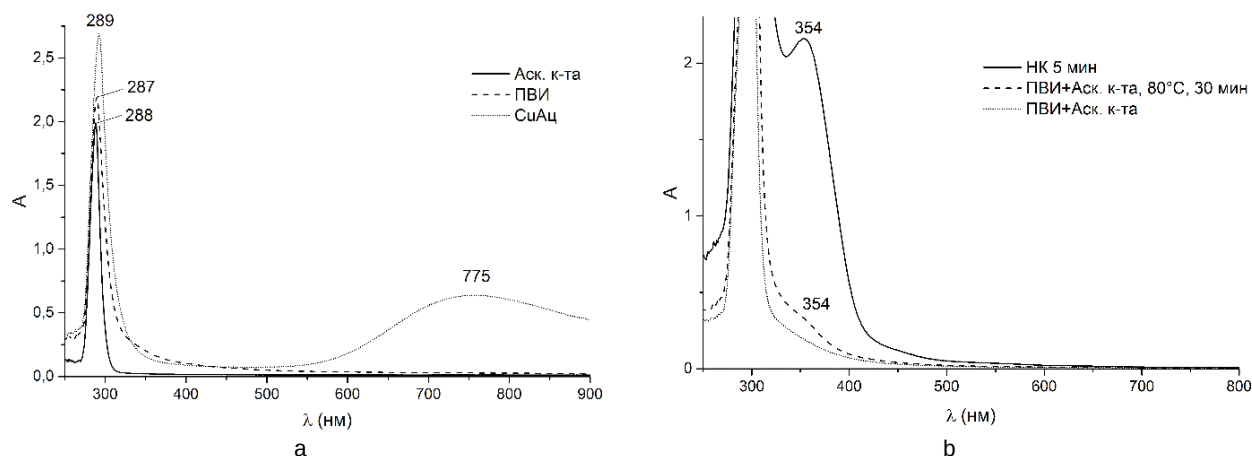


Рис. 1. Оптические спектры поглощения исходных соединений (а) и начала образования наноразмерных частиц в водной среде (б)

Fig. 1. Fig. 1. Optical absorption spectra of the starting compounds (a) and the beginning of the nanosized particles formation in an aqueous medium (b)

В начале реакции образуется комплекс меди с аскорбиновой кислотой, который подвергается окислительно-восстановительному распаду с образованием продуктов окисления аскорбиновой кислоты и ультрадисперсной меди [19, 20], которая взаимодействует с пиридиновыми атомами азота ПВИ. Такое взаимодействие обеспечивает эффективную стабилизацию наночастиц меди на ранних стадиях формирования.

Образование наночастиц меди наблюдается уже через 10 мин от начала реакции, появляется характерное красновато-коричневое окрашивание (рис. 2). В спектрах оптического поглощения наблюдаются два максимума поверхностного плазмонного резонанса: 537–541 и 646–651 нм, что указывает на присутствие частиц меди в металлическом состоянии разного размера [21, 22]. Слабый сдвиг максимумов в длинноволновую область свидетельствует об укрупнении наночастиц металла [23]. Реакция восстановления меди прекращается через 120 мин.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, методом химического восстановления ионов меди из раствора ацетата меди были получены наноконпозиты меди и поли-N-винилимидазола. В качестве восстановите-

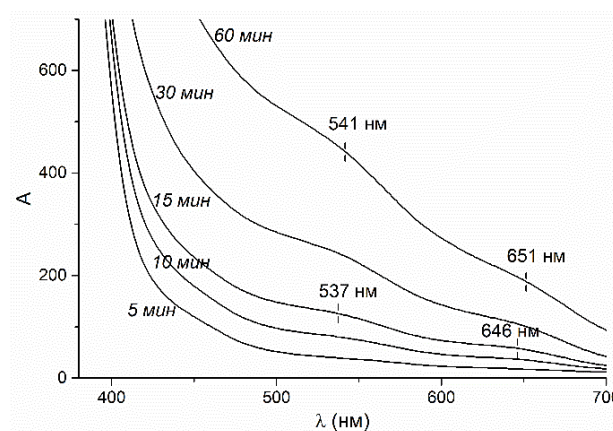


Рис. 2. Оптические спектры поглощения наноконпозита во времени

Fig. 2. Optical absorption spectra of the nanocomposite in time

ля использовали аскорбиновую кислоту. Спектры оптического поглощения реакционных растворов в водной среде подтверждают образование частиц меди в наноразмерном состоянии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ivanchev S.S., Ozenn A.N. Nanostructures in polymer systems // Polymer Science. Series B. 2006. Vol. 48. Issue 4. P. 213–225. <https://doi.org/10.1134/S1560090406070153>

2. Lee J.H., Gulumian M., Faustman E.M., Workman T., Jeon K., Yu I.J. Blood biochemical and

hematological study after subacute intravenous injection of gold and silver nanoparticles and coadministered gold and silver nanoparticles of similar sizes // *Biomed Research International*. 2018. Vol. 2018. 10 p. <https://doi.org/10.1155/2018/8460910>

3. Shurygina I.A., Prozorova G.F., Trukhan I.S., Korzhova S.A., Fadeeva T.V., Pozdnyakov A.S., et al. Nontoxic silver/poly-1-vinyl-1,2,4-triazole nanocomposite materials with antibacterial activity // *Nanomaterials*. 2020. Vol. 10. Issue 8. P. 1477. <https://doi.org/10.3390/nano10081477>

4. Ahn Y., Jeong Y., Lee D., Lee Y. Copper nanowire – graphene core-shell nanostructure for highly stable transparent conducting electrodes // *ACS Nano*. 2015. Vol. 9. Issue 3. P. 3125–3133. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.5b00053>

5. Malandrakis A.A., Kavroulakis N., Chrysikopoulos C.V. Synergy between Cu-NPs and fungicides against *Botrytis cinerea* // *Science of the Total Environment*. 2020. Vol. 703. P. 135557. <https://doi.org/j.scitotenv.2019.135557>

6. Pozdnyakov A.S., Emel'yanov A.I., Kuznetsova N.P., Ermakova T.G., Bolgova Y.I., Trofimova O.M., et al. A Polymer Nanocomposite with CuNP Stabilized by 1-Vinyl-1,2,4-triazole and Acrylonitrile Copolymer // *Synlett*. 2016. Vol. 27. Issue 6. P. 900–904. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1561292>

7. Muhammad G., Hussain M.A., Amin M., Hussain S.Z., Hussain I., Abbas Bukhari S.N., et al. Glucuronoxylan-mediated silver nanoparticles: green synthesis, antimicrobial and wound healing applications // *RSC Advances*. 2017. Vol. 7. P. 42900–42908. <https://doi.org/10.1039/C7RA07555C>

8. Prokhorov E., España-Sánchez B.L., Luna-Bárcenas G., Padilla-Vaca F., Cruz-Soto M.-E., Vázquez-Lepe M.O., et al. Chitosan/copper nanocomposites: Correlation between electrical and antibacterial properties // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2019. Vol. 180. P. 186–192. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.04.047>

9. Panarin E.F. Biologically active polymer nanosystems // *Russian Chemical Bulletin*. 2017. Vol. 66. Issue 10. P. 1812–1820. <https://doi.org/10.1007/s11172-017-1952-z>

10. Zezina E.A., Emel'yanov A.I., Pozdnyakov A.S., Myachina G.F., Abramchuk S.S., Feldman V.I., et al. Radiation-induced synthesis of copper nanostructures in the films of interpolymer complexes // *Radiation Physics and Chemistry*. 2019. Vol. 158. P. 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2019.01.019>

11. Pozdnyakov A.S., Ivanova A.A., Emel'yanov A.I., Bolgova Y.I., Trofimova O.M., Myachina G.F. Water-soluble stable polymer nanocomposites with AuNPs based on the functional poly(1-vinyl-1,2,4-triazole-co-N-vinylpyrrolidone) // *Journal Organometallic Chemistry*. 2020. Vol. 922. P. 121352. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2020.121352>

12. Nakabayashi K., Mori H. Recent progress in controlled radical polymerization of N-vinyl mono-

mers // *European Polymer Journal*. 2013. Vol. 49. Issue 10. P. 2808–2838. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2013.07.006>

13. Lebedeva O.V., Pozhidaev Y.N., Shaglaeva N.S., Pozdnyakov A.S., Bochkareva S.S. Polyelectrolytes based on nitrogenous bases // *Theoretical Foundations of Chemical Engineering*. 2010. Vol. 44. Issue 5. P. 786–790. <https://doi.org/10.1134/S0040579510050258>

14. Selivanova A.V., Tyurin V.S., Beletskaya I.P. Palladium nanoparticles supported on poly(N-vinylimidazole-co-N-vinylcaprolactam) as an effective recyclable catalyst for the Suzuki reaction // *ChemPlusChem*. 2014. Vol. 79. Issue 9. P. 1278–1283. <https://doi.org/10.1002/cplu.201402111>

15. Zhou Y., Zhu M., Li S. Self-switchable catalysis by a nature-inspired polymer nanoreactor containing Pt nanoparticles // *Journal of Materials Chemistry A*. 2014. Vol. 2. Issue 19. P. 6834–6839. <https://doi.org/10.1039/C3TA15053D>

16. Pekel N.P., Güven O. Investigation of complex formation between poly(N-vinylimidazole) and various metal ions using the molar ratio method // *Colloid and Polymer Science*. 1999. Vol. 277. Issue 6. P. 570–573. <https://doi.org/10.1007/s003960050426>

17. Fathima J.B., Pugazhendhi A., Oves M., Venis R. Synthesis of eco-friendly copper nanoparticles for augmentation of catalytic degradation of organic dyes // *Journal of Molecular Liquids*. 2018. Vol. 260. P. 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.03.033>

18. Cheng X., Zhang X., Yin H., Wang A., Xu Y. Modifier effects on chemical reduction synthesis of nanostructured copper // *Applied Surface Science*. 2006. Vol. 253. Issue 5. P. 2727–2732. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2006.05.125>

19. Xiong J., Wang Y., Xue Q., Wu X. Synthesis of highly stable dispersions of nanosized copper particles using L-ascorbic acid // *Green Chemistry*. 2011. Vol. 13. Issue 4. P. 900–904. <https://doi.org/10.1039/c0gc00772b>

20. Солдатенко Е.М., Доронин С.Ю., Чернова Р.К. Химические способы получения наночастиц меди // *Бутлеровские сообщения*. 2014. Т. 37. N 2. С. 103–113.

21. Dhas N.A., Raj C.P., Gedanken A. Synthesis, characterization, and properties of metallic copper nanoparticles // *Chemistry of Materials*. 1998. Vol. 10. Issue 5. P. 1446–1452. <http://dx.doi.org/10.1021/cm9708269>

22. Rajesh K.M., Ajitha B., Reddy Y.A.K., Suneetha Y., Reddy P.S. Synthesis of copper nanoparticles and role of pH on particle size control // *Materials Today: Proceedings*. 2016. Vol. 3. Issue 6. P. 1985–1991. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2016.04.100>

23. Mott D., Galkowski J., Wang L., Luo J., Zhong C.-J. Synthesis of size-controlled and shaped copper nanoparticles // *Langmuir*. 2007. Vol. 23. Issue 10. P. 5740–5745. <https://doi.org/10.1021/la0635092>

REFERENCES

1. Ivanchev SS, Ozenn AN. Nanostructures in polymer systems. *Polymer Science Series B*. 2006;48(4): 213–225. <https://doi.org/10.1134/S1560090406070153>
2. Lee JH, Gulumian M, Faustman EM, Workman T, Jeon K, Yu IJ. Blood biochemical and hematological study after subacute intravenous injection of gold and silver nanoparticles and coadministered gold and silver nanoparticles of similar sizes. *Biomed Research International*. 2018;2018. 10 p. <https://doi.org/10.1155/2018/8460910>
3. Shurygina IA, Prozorova GF, Trukhan IS, Korzhova SA, Fadeeva TV, Pozdnyakov AS, et al. Nontoxic silver/poly-1-vinyl-1,2,4-triazole nanocomposite materials with antibacterial activity. *Nanomaterials*. 2020;10(8): 1477. <https://doi.org/10.3390/nano10081477>
4. Ahn Y, Jeong Y, Lee D, Lee Y. Copper nanowire – graphene core-shell nanostructure for highly stable transparent conducting electrodes. *ACS Nano*. 2015;9(3):3125–3133. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.5b00053>
5. Malandrakis AA, Kavroulakis N, Chrysikopoulos CV. Synergy between Cu-NPs and fungicides against *Botrytis cinerea*. *Science of the Total Environment*. 2020;703:135557. <https://doi.org/j.scitotenv.2019.135557>
6. Pozdnyakov AS, Emel'yanov AI, Kuznetsova NP, Ermakova TG, Bolgova YI, Trofimova OM, et al. A Polymer Nanocomposite with CuNP Stabilized by 1-Vinyl-1,2,4-triazole and Acrylonitrile Copolymer. *Synlett*. 2016;27(6):900–904. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1561292>
7. Muhammad G, Hussain MA, Amin M, Hussain SZ, Hussain I, Abbas Bukhari SN, et al. Glucuronoxylan-mediated silver nanoparticles: green synthesis, antimicrobial and wound healing applications. *RSC Advances*. 2017;7:42900–42908. <https://doi.org/10.1039/C7RA07555C>
8. Prokhorov E, España-Sánchez BL, Luna-Bárcenas G, Padilla-Vaca F, Cruz-Soto M-E, Vázquez-Lepe MO, et al. Chitosan/copper nanocomposites: Correlation between electrical and antibacterial properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2019;180:186–192. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.04.047>
9. Panarin EF. Biologically active polymer nanosystems. *Russian Chemical Bulletin*. 2017;66(10):1812–1820. <https://doi.org/10.1007/s11172-017-1952-z>
10. Zezina EA, Emel'yanov AI, Pozdnyakov AS, Myachina GF, Abramchuk SS, Feldman VI, et al. Radiation-induced synthesis of copper nanostructures in the films of interpolymer complexes. *Radiation Physics and Chemistry*. 2019;158:115–121. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2019.01.019>
11. Pozdnyakov AS, Ivanova AA, Emel'yanov AI, Bolgova YI, Trofimova OM, Myachina GF. Water-soluble stable polymer nanocomposites with AuNPs based on the functional poly(1-vinyl-1,2,4-triazole-co-N-vinylpyrrolidone). *Journal Organometallic Chemistry*. 2020;922:121352. <https://doi.org/10.1016/j.jorgchem.2020.121352>
12. Nakabayashi K, Mori H. Recent progress in controlled radical polymerization of N-vinyl monomers. *European Polymer Journal*. 2013;49(10):2808–2838. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2013.07.006>
13. Lebedeva OV, Pozhidaev YN, Shaglaeva NS, Pozdnyakov AS, Bochkareva SS. Polyelectrolytes based on nitrogenous bases. *Theoretical Foundations of Chemical Engineering*. 2010;44(5):786–790. <https://doi.org/10.1134/S0040579510050258>
14. Selivanova AV, Tyurin VS, Beletskaya IP. Palladium nanoparticles supported on poly(N-vinyl-imidazole-co-N-vinylcaprolactam) as an effective recyclable catalyst for the Suzuki reaction. *ChemPlusChem*. 2014;79(9):1278–1283. <https://doi.org/10.1002/cplu.201402111>
15. Zhou Y, Zhu M, Li S. Self-switchable catalysis by a nature-inspired polymer nanoreactor containing Pt nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry A*. 2014;2(19):6834–6839. <https://doi.org/10.1039/C3TA15053D>
16. Pekel NP, Güven O. Investigation of complex formation between poly(N-vinyl imidazole) and various metal ions using the molar ratio method. *Colloid and Polymer Science*. 1999;277(6):570–573. <https://doi.org/10.1007/s003960050426>
17. Fathima JB, Pugazhendhi A, Oves M, Venis R. Synthesis of eco-friendly copper nanoparticles for augmentation of catalytic degradation of organic dyes. *Journal of Molecular Liquids*. 2018;260:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.03.033>
18. Cheng X, Zhang X, Yin H, Wang A, Xu Y. Modifier effects on chemical reduction synthesis of nanostructured copper. *Applied Surface Science*. 2006; 253(5):2727–2732. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2006.05.125>
19. Xiong J, Wang Y, Xue Q, Wu X. Synthesis of highly stable dispersions of nanosized copper particles using L-ascorbic acid. *Green Chemistry*. 2011;13(4): 900–904. <https://doi.org/10.1039/c0gc00772b>
20. Soldatenko E.M., Doronin S.Yu., Chernova R.K. Chemical methods for producing copper nanoparticles. *Butlerovskie Soobshcheniya = Butlerov Communication*. 2014;37(2):103–113. (In Russian)
21. Dhas NA, Raj CP, Gedanken A. Synthesis, characterization, and properties of metallic copper nanoparticles. *Chemistry of Materials*. 1998;10(5):1446–1452. <http://dx.doi.org/10.1021/cm9708269>
22. Rajesh KM, Ajitha B, Reddy YAK, Suneetha Y, Reddy PS. Synthesis of copper nanoparticles and role of pH on particle size control. *Materials Today: Proceedings*. 2016;3(6):1985–1991. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2016.04.100>
23. Mott D, Galkowski J, Wang L, Luo J, Zhong C-J. Synthesis of size-controlled and shaped copper nanoparticles. *Langmuir*. 2007;23(10):5740–5745. <https://doi.org/10.1021/la0635092>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Иванова Анастасия Андреевна,
младший научный сотрудник,
Иркутский институт химии
им. А.Е. Фаворского СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Фаворского, 1,
Российская Федерация,
✉ e-mail: ivanova93@irioch.irk.ru

Емельянов Артем Иванович,
к.х.н., старший научный сотрудник,
Иркутский институт химии
им. А.Е. Фаворского СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Фаворского, 1,
Российская Федерация,
e-mail: emelyanov@irioch.irk.ru

Коржова Светлана Анатольевна,
к.х.н., научный сотрудник,
Иркутский институт химии
им. А.Е. Фаворского СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Фаворского, 1,
Российская Федерация,
e-mail: korzhova@irioch.irk.ru

Поздняков Александр Сергеевич,
к.х.н., заведующий лабораторией
функциональных полимеров,
Иркутский институт химии
им. А.Е. Фаворского СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Фаворского, 1,
Российская Федерация,
e-mail: pozdnyakov@irioch.irk.ru

Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

*Все авторы прочитали и одобрили оконча-
тельный вариант рукописи.*

*Поступила в редакцию 14.09.2020.
Одобрена после рецензирования 28.10.2020.
Принята к публикации 28.02.2021.*

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Anastasia A. Ivanova,
Junior Researcher,
A.E. Favorsky Irkutsk Institute
of Chemistry SB RAS,
1, A.E. Favorsky St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
✉ e-mail: ivanova93@irioch.irk.ru

Artem I. Emel'yanov
Cand. Sci. (Chemistry), Senior Researcher,
A.E. Favorsky Irkutsk Institute
of Chemistry SB RAS,
1, A.E. Favorsky St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
e-mail: emelyanov@irioch.irk.ru

Svetlana A. Korzhova
Cand. Sci. (Chemistry), Researcher,
A.E. Favorsky Irkutsk Institute
of Chemistry SB RAS,
1, A.E. Favorsky St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
e-mail: korzhova@irioch.irk.ru

Alexander S. Pozdnyakov
Cand. Sci. (Chemistry),
Head of Laboratory of Functional Polymers,
A.E. Favorsky Irkutsk Institute
of Chemistry SB RAS,
1, A.E. Favorsky St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
e-mail: pozdnyakov@irioch.irk.ru

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests re-
garding the publication of this article.

*The final manuscript has been read and ap-
proved by all the co-authors.*

*The article was submitted 14.09.2020.
Approved after reviewing 28.10.2020.
Accepted for publication 28.02.2021.*

Уважаемые читатели!

Приглашаем Вас к активному творческому сотрудничеству по научным направлениям:

- Химические науки
- Физико-химическая биология
- Химическая технология

Журнал «Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология» включен в перечень рецензируемых научных изданий (**Перечень ВАК**) и следующие базы данных: Web of Science (**ESCI**), Chemical Abstracts Service (**CAS**), **EBSCO** Publishing Databases, European Reference Index for the Humanities and the Social Sciences (**ERIH PLUS**), **ВИНИТИ РАН**, система Российского индекса научного цитирования, представлен в электронной библиотеке «**Cyberleninka**», Directory of Open Access Journals (**DOAJ**) и описан в **Ulrich's Periodicals Directory**.

Публикациям журнала присваивается **DOI (Digital object identifier)**.

Редколлегия

Dear readers!

We would like to invite you to creative cooperation in the fields:

- Chemical Sciences
- Physical-Chemical and General Biology
- Chemical Technology

The Journal «Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya» is included in the list of journals which are regarded as academic publications by the State Commission for Academic Degrees and Titles (**ВАК**). The Journal also is indexing in Web of Science (**ESCI**), Chemical Abstracts Service (**CAS**), **EBSCO** Publishing Databases, European Reference Index for the Humanities and the Social Sciences (**ERIH PLUS**), **VINITI** Database (Referativnyi Zhurnal), Russian Science Citation Index, included in the digital scientific library **Cyberleninka**, Directory of Open Access Journals (**DOAJ**) and is described in **Ulrich's Periodicals Directory**.

Publications are assigned a **DOI (Digital object identifier)**.

Editorial Board

ИЗВЕСТИЯ ВУЗОВ
Прикладная химия и биотехнология
Том 11 N 1 (36) 2021

12+

PROCEEDINGS OF UNIVERSITIES
Applied chemistry and biotechnology
Volume 11 N 1 2021

Редактор О.А. Терновская
Перевод на английский язык: Thomas A. Beavitt, Christopher JP Scott, Michael Beavitt,
М.В. Стрелецкая, А.Р. Бойко, Н.Г. Попова, Е.А. Привалова
Компьютерный набор и верстка А.В. Куртовой
Ответственный за выпуск Ю.Н. Пожидаев

Дата выхода в свет 31.03.2021. Формат 60 x 90 / 8.
Бумага офсетная. Печать цифровая. Усл. печ. л. 22.
Тираж 500 экз. Зак. 61. Поз. плана 5н.

Отпечатано в типографии издательства
ФГБОУ ВО «Иркутский национальный
исследовательский технический университет»
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83

Издание распространяется бесплатно
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, Россия, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83

Адрес типографии:
664074, Россия, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 81/12А