

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

12+

Том 11 N 3

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 3 2021



ИЗДАТЕЛЬСТВО
Иркутского национального исследовательского
технического университета



ИЗВЕСТИЯ ВУЗОВ
Прикладная химия и биотехнология
Том 11 N 3 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

PROCEEDINGS OF UNIVERSITIES
Applied chemistry and biotechnology
IZVESTIYA VUZOV.
Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya
Volume 11 N 3 2021
EDITORIAL BOARD

Editor in Chief :

Sergei N. Evstafev

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. Ielovich

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

- Бишимбаева Г.К., Налибаева А.М., Сайдуллаева С.А., Жанабаева А.К., Болд А., Абдикалыков Е.Н. Синтез и исследование экстракционных свойств новых фосфорсодержащих экстрагентов тяжелых металлов..... 340
- Иринчинова Н.В., Дударев В.И., Филатова Е.Г., Асламова В.С. Регрессионные модели адсорбции ионов никеля(II) углеродными сорбентами..... 349

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

- Коновалов М.С., Коновалова Е.Ю., Егорова И.Н., Жданова Г.О., Стом Д.И. Фототрофы в альтернативной энергетике..... 358
- Бабынин Э.В., Дегтярева И.А. Возможности использования информационных ресурсов в биоремедиации..... 372
- Серба Е.М., Римарева Л.В., Оверченко М.Б., Игнатова Н.И., Медриш М.Э., Павлова А.А., Соколова Е.Н. Подбор мультиэнзимной композиции и условий подготовки концентрированного зернового сула..... 384
- Малкова А.В., Евдокимов И.Ю., Ширманов М.В., Иркитова А.Н., Дудник Д.Е. Разработка пробиотика для животных и аквакультуры на основе штаммов *Bacillus toyonensis* B-13249 и *Bacillus pumilus* B-13250..... 393
- Филинова Н.В., Ломоватская Л.А., Романенко А.С. Экзогенный кальций модулирует активность аденилатциклаз растений картофеля при биотическом стрессе..... 403
- Скиба Е.А., Скиба М.А., Пятунина О.И. Раствор азотной кислоты после обработки мискантуса как регулятор роста гороха посевного (*Pisum sativum* L.) *in vitro*..... 413
- Смирнова Ю.Д., Рабинович Г.Ю., Фомичева Н.В. Получение наноразмерного кремнегуминового препарата и его первичная апробация..... 421
- Крыжко А.В., Буджурова У.М., Аметова Э.Д., Новиков И.А., Соболева Е.Е., Смаглий Н.Н., Решетник Г.В. Особенности влияния штамма *Bacillus thuringiensis* 888 на содержание эфирного масла, антиоксидантов и флавоноидов в растениях *Origanum vulgare* L..... 430
- Бурлаченко А.С., Салищева О.В., Дышлюк Л.С. Изучение скорости биодеструкции амфотерного сурфактанта кокаמידопропилбетаина бактериями рода *Pseudomonas* и активным илом..... 441
- Миневич И.Э., Нечипоренко А.П., Гончарова А.А., Ситникова В.Е. Динамика макронутриентов в процессе кратковременного проращивания семян льна..... 449
- Гисматулина Ю.А., Будаева В.В., Ситникова А.Е., Бычин Н.В., Гладышева Е.К., Шавыркина Н.А., Миронова Г.Ф., Севастьянова Ю.В. Композиционная бумага из бактериальной наноцеллюлозы и хвойной целлюлозы..... 460
- Зубченко А.В., Кожевникова Е.Ю., Барков А.В., Топольюк Ю.А., Шнырева А.В., Винокуров В.А., Магадова Л.А. Возможности использования базидиального гриба *Trametes hirsuta* MT-17.24 в биодеструкции полианионной целлюлозы..... 472

ХИМИЧЕСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ

- Черепанов В.Д., Дьячкова С.Г., Кузора И.Е., Дубровский Д.А., Лукина В.И. Трансформация нефтяных дисперсных систем в процессе эксплуатации..... 481

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Очиров О.С., Стельмах С.А., Григорьева М.Н., Окладникова В.О., Могнонов Д.М. Синтез и исследование олигогексаметиленгуанидин гидроиодида в качестве рентгеноконтрастного вещества..... 491
- Недвецкая Г.Б., Айзина Ю.А. Установление зависимости потенциала биологической активности от NH-кислотности соединения..... 497

CONTENTS

CHEMICAL SCIENCES

- Bishimbayeva G.K., Nalibayeva A.M., Saidullayeva S.A., Zhanabaeva A.K., Bold A., Abdikalykov Y.N.** Synthesis and study of the extraction properties of new phosphorus-containing extractants of heavy metal..... 340
- Irinchinova N.V., Dudarev V.I., Filatova E.G., Aslamova V.S.** Regression models of nickel (II) ion adsorption by carbon sorbent..... 349

PHYSICAL-CHEMICAL BIOLOGY

- Konovalov M.S., Konovalova E.Yu, Egorova I.N., Zhdanova G.O., Stom D.I.** Phototrophs in alternative energy Babynin EV, Degtyareva IA. Possibilities of using information resources in bioremediation..... 358
- Serba E.M., Rimareva L.V., Overchenko M.B., Ignatova N.I., Medrish M.E., Pavlova A.A., Sokolova E.N.** Selecting multi-enzyme composition and preparation conditions for strong wort..... 384
- Malkova A.V., Evdokimov I.Yu., Shirmanov M.V., Irkitova A.N., Dudnik D.E.** Development of a probiotic for animals and aquaculture based on *Bacillus toyonensis* B-13249 and *Bacillus pumilus* B-13250 strains..... 393
- Filina N.V., Lomovatskaya L.A., Romanenko A.S.** Exogenous calcium modulates the activity of adenylate cyclases in potato plants under biotic stress..... 403
- Skiba E.A., Skiba M.A., Pyatunina O.I.** Nitric acid solution after treating miscanthus as a growth regulator of seed peas (*Pisum sativum* L.) *in vitro*..... 413
- Smirnova Yu.D., Rabinovich G.Yu., Fomicheva N.V.** Obtaining a nanosized silica-humic preparation and its initial approbation..... 421
- Kryzhko A.V., Budzhurova U.M., Ametova E.D., Novikov I.A., Soboleva E.E., Smaglii N.N., Reshetnik G.V.** Features of the *Bacillus thuringiensis* 888 strain's influence on the content of essential oil, antioxidants and flavonoids in *Origanum vulgare* L..... 430
- Burlachenko A.S., Salishcheva O.V., Dyshlyuk L.S.** Study into biodegradation of cocamidopropyl betaine, an amphoteric surfactant, by *Pseudomonas* bacteria and activated sludge..... 441
- Minevich I.E., Nechiporenko A.P., Goncharova A.A., Sitnikova V.E.** Dynamics of macronutrients during short-term germination of flax seeds..... 449
- Gismatulina Yu.A., Budaeva V.V., Sitnikova A.E., Bychin N.V., Gladysheva E.K., Shavyrkina N.A., Mironova G.F., Sevastyanova Yu.V.** Bacterial nanocellulose and softwood pulp for composite paper..... 460
- Zubchenko A.V., Kozhevnikova E.Yu., Barkov A.V., Topolyuk Yu.A., Shnyreva A.V., Vinokurov V.A., Magadova L.A.** Potential use of basidiomycota *Trametes hirsuta* MT-17.24 in biodegradation of polyanionic cellulose..... 472

CHEMICAL TECHNOLOGY

- Cherepanov V.D., D'yachkova S.G., Kuzora I.G., Dubrovskii D.A., Lukina V.I.** Transformation of oil dispersed systems during operation..... 481

BRIEF COMMUNICATION

- Ochirov O.S., Stelmakh S.A., Grigor'eva M.N., Okladnikova V.O., Mognonov D.M.** Synthesis and study of oligohexamethyleneguanidine hydroiodide as a radiopaque substance 491
- Nedvetskaya G.B., Aizina Yu.A.** Prediction of the biological activity of a compound depending on its NH-acidity..... 497

Оригинальная статья / Original article

УДК 547.34; 66.669

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-340-348>



Синтез и исследование экстракционных свойств новых фосфорсодержащих экстрагентов тяжелых металлов

© Г.К. Бишимбаева*, А.М. Налибаева*, С.А. Сайдуллаева**,
А.К. Жанабаева*, А. Болд*, Е.Н. Абдикалыков*

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

**ТОО «Институт высоких технологий», г. Алматы, Казахстан

Резюме: *Металлургическая отрасль является одним из краеугольных камней, лежащих в фундаменте современной химической науки и промышленности, и интенсивно развивается во многих странах. Широкое внедрение экстракционных методов извлечения, концентрирования и разделения металлов как наиболее продуктивных влечет за собой необходимость поиска и создания новых эффективных экстрагентов металлов. Среди соединений, пригодных для использования в качестве экстрагентов, наибольшее распространение получили органические фосфиты и фосфаты, которые позволяют проводить экстракционные процессы с хорошей избирательностью и эффективностью. Цель данного исследования – отработка оптимальных условий синтеза и наработка укрупненных партий 4,5-диметил-2-(2,2,2-трифторэтокси)-1,3,2-диоксафосфолана и 5,5-диметил-2-(2,2,3,3,4,4,5,5-октафторпентокси)-1,3,2-диоксафосфоринана, изучение экстракционных свойств полученных фосфорсодержащих гетероциклических соединений при выделении урана из товарного десорбата. Синтез новых представителей указанных полифторалкилированных пяти- и шестичленных гетероциклических соединений фосфора реализован взаимодействием 2-хлор-1,3,2-диоксафосфолана с трифторэтанолом и реакцией замещения-циклизации полифторалкилированного дихлорфосфита с 2,2-диметил-1,3-пропандиолом. Реакции легко протекают в системах триэтиламин–гексан или пиридин–диэтиловый эфир при температуре от минус десяти до комнатной, выход целевых гетероциклов составляет 53–57%. Изучены экстракционные свойства синтезированных полифторалкилированных диоксафосфолана и диоксафосфоринана и показано, что применение указанных фосфорсодержащих гетероциклических соединений в качестве экстрагентов позволяет извлекать технически ценного металла до 12,4 и 15,2% соответственно. В качестве исходного сырья в процессе экстракции использовали азотнокислые и сернокислые растворы товарного десорбата гидрометаллургического производства Казахстана.*

Ключевые слова: 2-полифторалкокси-1,3,2-диоксафосфоланы, 2-полифтор-алкокси-1,3,2-диоксафосфоринаны, тяжелые металлы, экстрагенты, экстракция

Благодарности: Работа выполнена при финансовой поддержке Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан (грант № AP08856550).

Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории неперехватных гетероциклических соединений Иркутского института химии им. А.Е. Фаворского СО РАН академику Б.А. Трофимову, д.х.н., проф. Н.К. Гусаровой, к.х.н. С.И. Верхотуровой, к.х.н. С.Н. Арбузовой за консультации по проведению синтеза фосфорорганических соединений и помощь в интерпретации спектральных данных.

Для цитирования: Бишимбаева Г.К., Налибаева А.М., Сайдуллаева С.А., Жанабаева А.К., Болд А., Абдикалыков Е.Н. Синтез и исследование экстракционных свойств новых фосфорсодержащих экстрагентов тяжелых металлов. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2021. Т. 11. N 3. С. 340–348. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-340-348>

Synthesis and study of the extraction properties of new phosphorus-containing extractants of heavy metals

Gaukhar K. Bishimbayeva*, Arailym M. Nalibayeva*, Sabina A. Saidullayeva**,
Asem K. Zhanabaeva*, Amangul Bold*, Yerlan N. Abdikalykov*

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

**Institute of High Technologies, Almaty, Kazakhstan

Abstract: *The metallurgical industry is one of the cornerstones of contemporary chemical science and industry and it is developing rapidly in many countries. The widespread introduction of metal extraction, concentra-*

tion and separation as the most productive methods entails the need to search for and create new effective metal extractants. Among the compounds, suitable for use as extractants, the most widespread are organic phosphites and phosphates, which allow performing extraction processes with good selectivity and efficiency. The purposes of this article include finalizing the optimal synthesis conditions and developing larger batches of 4,5-dimethyl-2-(2,2,2-trifluoroethoxy)-1,3,2-dioxaphospholane and 5,5-dimethyl-2-(2,2,3,3,4,4,5,5-octafluoropentoxy)-1,3,2-dioxaphosphorinane, and study of the extraction properties of the obtained phosphorus-containing heterocyclic compounds in the separation of uranium from the commercial desorbate. The synthesis of new representatives of the indicated polyfluoroalkylated five- and six-membered heterocyclic phosphorus compounds was conducted using the interaction of 2-chloro-1,3,2-dioxaphospholane with trifluoroethanol and the substitution–cyclization reaction of polyfluoroalkylated dichlorophosphite with 2,2-dimethyl-1,3-propanediol. Reactions easily proceed in triethylamine–hexane or pyridine–diethyl ether systems at temperatures ranging between minus ten to room temperature, with the output of target heterocycles of 53–57%. The studies of extraction properties of synthesized poly-fluorinealkylated dioxaphospholane and dioxaphosphorinane show that the use of these phosphorus-containing heterocyclic compounds as extractants allows extracting a technically valuable metal up to 12.4 and 15.2%, respectively. Nitric and sulfuric acid solutions of commercial desorbate of hydrometallurgical production in Kazakhstan were used as feedstock in the extraction process.

Keywords: 2-polyfluoroalkoxy-1,3,2-dioxaphospholans, 2-polyfluoro-alkoxy-1,3,2-dioxaphosphorinans, heavy metals, extractants, extraction

Acknowledgement: The research was funded by the Science Committee of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan (Grant no. AP08856550).

The authors are grateful to the staff of the Laboratory of unsaturated heteroatomic compounds of A.E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry SB RAS Academician B.A. Trofimov, Doctor of Chemical Sciences, Professor N.K. Gusarova, Candidate of Chemical Sciences S.I. Verkhoturova, Candidate of Chemical Sciences S.N. Arbuzova for their advises on synthesis of organophosphorus compounds and on spectral data interpretation.

For citation: Bishimbayeva GK, Nalibayeva AM, Saidullayeva SA, Zhanabaeva AK, Bold A, Abdikalykov YN. Synthesis and study of the extraction properties of new phosphorus-containing extractants of heavy metals. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(3):340–348. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-340-348>

ВВЕДЕНИЕ

Органические фосфиты и фосфаты позволяют проводить экстракционные процессы с хорошей избирательностью и эффективностью, благодаря чему нашли широкое применение в качестве комплексонов и экстрагентов при получении цветных металлов в гидрометаллургических процессах [1–7]. Природа заместителей в эфирах фосфорной кислоты существенно влияет на экстракционную способность реагента [8–10].

Введение в молекулы фосфатов и фосфитов функциональных групп, например, полифторалкильных, способствует увеличению экстракционной активности, селективности, экстракционной емкости по целевому компоненту, совместимости с разбавителями, легкости регенерации, химической стойкости, негорючести этих экстрагентов. Наличие в молекуле экстрагентов полифторалкильных групп способствует повышению их негорючести [11–17], а также меняет их гидрофильно-гидрофобный баланс (повышает липофильность и гидрофобность) [18], что способствует увеличению экстракционной активности за счет лучшей растворимости в углеводородных разбавителях [19].

Естественно предположить, что содержание в молекуле экстрагентов одновременно фосфатных и полифторалкильных групп усилит экстракционные свойства таких полифункциональных

соединений и откроет удобный подход к созданию инновационных материалов.

Цель настоящего исследования – разработка оптимальных условий синтеза 4,5-диметил-2-(2,2,2-трифторэтокси)-1,3,2-диоксафосфолана и 5,5-диметил-2-(2,2,3,3,4,4,5,5-октафторпентокси)-1,3,2-диоксафосфоринана, изучение возможности использования синтезированных циклических фосфитов в качестве экстрагентов при выделении урана из товарного десорбата уранового производства.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. Фосфор треххлористый (99%, Sigma-Aldrich); 2,2,2-трифторэтанол (более 99%, Sigma-Aldrich); диэтиловый эфир (более 99,8%, Sigma-Aldrich); 1,3-пропандиол (99%, Alfa); гексан, х.ч., ТУ 2631-158-44493179-13; триэтиламин (более 99%, Sigma-Aldrich); пиридин (более 99,5%, AppliChem).

Исходный 2-хлор-4,5-диметил-1,3,2-диоксафосфолан получен на основе реакции 2,3-бутандиола с трихлоридом фосфора в присутствии N,N-диметил-анилина [20]; исходный 2,2,3,3,4,4,5,5-октафторпентилдихлорфосфит синтезирован взаимодействием 2,2,3,3,4,4,5,5-октафторпентанола с трихлоридом фосфора в присутствии каталитических количеств триэтиламина по известной методике [21].

Методы. Спектры ЯМР ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P получены на спектрометрах Bruker DPX 400 и Bruker AV-400 (400,13; 101,61; 376,50 и 161,98 МГц соответственно) в растворе CDCl_3 , внутренний стандарт – ГМДС (^1H , ^{13}C), CFCl_3 (^{19}F), внешний стандарт – 85%-ая H_3PO_4 (^{31}P). Для отнесения сигналов в спектрах ЯМР ^1H , ^{13}C использованы двумерные гомо- и гетероядерные методы спектроскопии ЯМР: COSY, HSQC, HMBC. ИК-спектры записаны на спектрометре Bruker IFS 25 в тонком слое.

Методика синтеза 4,5-диметил-2-(2,2,2-трифторэтокси)-1,3,2-диоксафосфолана (3). К раствору 20,41 г (0,204 моль) 2,2,2-трифторэтанола (2) и 24,68 г (0,244 моль) триэтиламина в 240 мл абсолютного гексана добавляли по каплям при перемешивании раствор 31,52 г (0,204 моль) 4,5-диметил-2-хлор-1,3,2-диоксафосфолана (1) в 30 мл гексана в течение 2 ч при температуре от -10 до -3 °С, при этом наблюдали образование белого осадка гидрохлорида триэтиламония. Охлаждение убирали, реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре еще в течение 3 ч, оставляли на 15 ч. Осадок отфильтровывали и промывали гексаном (3x20 мл). Растворитель из фильтрата отгоняли при пониженном давлении, остаток перегоняли в вакууме. Выход синтезированного 4,5-диметил-2-(2,2,2-трифторэтокси)-1,3,2-диоксафосфолана (3) составил 25,40 г (57%). Это бесцветная жидкость чистотой 95% (данные ЯМР ^1H и ^{31}P), температура кипения – 57 – 59 °С (10 мм рт. ст.), существует в виде трех стереоизомеров в соотношении 6,5 : 1,5 : 1 (согласно ^1H и ^{31}P ЯМР).

Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д. для *R,R(S,S)*-изомера: 1,36 д (3H, CH_3 , $^3J_{\text{HH}}$ 6,0 Гц), 1,42 д (3H, CH_3 , $^3J_{\text{HH}}$ 6,0 Гц), 3,78–3,86 м (2H, CH), 4,09 м (2H, CH_2); для *R,S*-цис-изомера: 1,36 д (6H, 2CH_3 , $^3J_{\text{HH}}$ 6,0 Гц), 4,09 м (2H, CH_2), 4,48 м (2H, 2CH); для *R,S*-транс-изомера: 1,22 д (6H, 2CH_3 , $^3J_{\text{HH}}$ 6,0 Гц), 4,09 м (2H, CH_2); 4,58 м (2H, 2CH). Спектр ЯМР ^{19}F , δ_{F} , м.д.: для *R,R(S,S)*-изомера – 75,20 т (CF_3 , $^3J_{\text{HF}}$ 8,2 Гц); для *R,S*-транс-изомера – 75,34 т (CF_3 , $^3J_{\text{HF}}$ 8,2 Гц); для *R,S*-цис-изомера – 75,21 т (CF_3 , $^3J_{\text{HF}}$ 8,2 Гц). Спектр ЯМР ^{31}P , δ_{P} , м.д.: для *R,S*-транс-изомера – 139,6; для *R,R(S,S)*-изомера – 144,1; для *R,S*-цис-изомера – 149,4.

Методика синтеза 5,5-диметил-2-(2,2,3,3,4,4,5,5-октафторпентокси)-1,3,2-диоксафосфоринана (6). К раствору 33,40 г (0,100 моль) 2,2,3,3,4,4,5,5-октафторпентилдихлорфосфита (4) в 230 мл диэтилового эфира добавляли по каплям при перемешивании раствор 10,42 г (0,100 моль) 2,2-диметил-1,3-пропандиола (5) и 15,80 г (0,200 моль) пиридина в 190 мл диэтилового эфира в течение 2 ч при температуре от -10 до -5 °С, при этом наблюдали образование белого осадка гидрохлорида пиридина. Охлаждение убирали, реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре еще в течение 3 ч, оставляли на

15 ч. Осадок отфильтровывали и промывали диэтиловым эфиром (3x20 мл). Растворитель из фильтрата отгоняли при пониженном давлении, остаток перегоняли в вакууме. Получили 9,70 г (53%) 5,5-диметил-2-(2,2,3,3,4,4,5,5-октафторпентокси)-1,3,2-диоксафосфоринана (6) – прозрачная жидкость, температура кипения – 82 °С (1 мм рт. ст.), d_4^{20} – 1,4467, n_D^{20} – 1,3839. Спектральные характеристики идентичны характеристикам синтезированного ранее диоксафосфоринана [18]: ИК-спектр, ν , cm^{-1} : 2965 с, 2939 с, 2912 с, 2889 с, 1722 с, 1674 с, 1632 с, 1475 с, 1464 с, 1399 с, 1372 с, 1331 с, 1309 с, 1303 с, 1290 с, 1246 с, 1224 с, 1173 с, 1133 с, 1098 с, 1052 с, 1009 с, 964 с, 944 с, 910 с, 902 с, 867 с, 809 с, 793 с, 784 с, 754 с, 704 с, 689 с, 674 с, 624 с, 608 с, 573 с, 563 с, 546 с, 538 с, 522 с, 506 с, 461 с, 415 с, 383 с. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 0,75 с (3H, Me), 1,25 с (3H, Me), 3,37 т (2H_e, 2CH_2 -4(6), $^2J_{\text{HH}}$ 10,8, $^3J_{\text{HP}}$ 10,8 Гц), 4,13 уш. д (2H_a, 2CH_2 -4(6), $^2J_{\text{HH}}$ 10,8 Гц), 4,24 т. д (2H, CH_2CF_2 , $^3J_{\text{HF}}$ 13,9, $^3J_{\text{HP}}$ 7,3 Гц), 6,06 т. т (1H, CHF_2 , $^2J_{\text{HF}}$ 52,1, $^3J_{\text{HF}}$ 5,5 Гц). Спектр ЯМР ^{13}C , δ_{C} , м.д.: 22,2 (CH_3), 22,5 (CH_3), 32,6 д (C^5 , $^3J_{\text{CP}}$ 4,4 Гц), 60,0 т. д (CH_2CF_2 , $^2J_{\text{CF}}$ 26,4, $^2J_{\text{CP}}$ 21,6 Гц), 69,3 ($\text{C}^{4,6}$), 107,7 т. т (HCF_2 , $^1J_{\text{CF}}$ 254,3, $^2J_{\text{CF}}$ 31,0 Гц), 110,1 т. т (HCF_2CF_2 , $^1J_{\text{CF}}$ 265,2, $^2J_{\text{CF}}$ 31,0 Гц), 111,0 т. т ($\text{CF}_2\text{CF}_2\text{CH}_2$, $^1J_{\text{CF}}$ 265,6, $^2J_{\text{CF}}$ 30,4 Гц), 115,1 т. т. д (CF_2CH_2 , $^1J_{\text{CF}}$ 256,4, $^2J_{\text{CF}}$ 30,6, $^3J_{\text{CP}}$ 6,3 Гц). Спектр ЯМР ^{19}F , δ_{F} , м.д.: -137,4 д. м (CHF_2 , $^2J_{\text{FH}}$ 52,1 Гц), -130,4 м (CF_2CHF_2), -125,4 м ($\text{CF}_2\text{CF}_2\text{CHF}_2$), -120,6 м (CH_2CF_2). Спектр ЯМР ^{31}P , δ_{P} , м.д.: 123,6 т ($^4J_{\text{PF}}$ 5,7 Гц). Найдено, %: С – 33,21; Н – 3,72; F – 42,02; P – 8,62. $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{F}_8\text{O}_3\text{P}$. Вычислено, %: С – 32,98; Н – 3,60; F – 41,74; P – 8,51.

Процесс экстракции. Укрупненные партии синтезированных 4,5-диметил-2-(2,2,2-трифторэтокси)-1,3,2-диоксафосфолана (3) и 5,5-диметил-2-(2,2,3,3,4,4,5,5-октафторпентокси)-1,3,2-диоксафосфоринана (6) были успешно протестированы в процессе экстракции урана в условиях заводской лаборатории. В качестве исходного сырья использовали сернокислый раствор товарного десорбата уранового производства с концентрацией урана $15,00$ г/дм³ (концентрация серной кислоты в товарном десорбате – $26,95$ г/дм³), а также азотнокислый раствор товарного десорбата с концентрацией урана $15,00$ г/дм³ (концентрация азотной кислоты в товарном десорбате – $52,50$ г/дм³). Содержание в приготовленном растворе из ЗОУ (закись-окись урана), г/дм³: U – 10,30; HNO_3 – 56,40. Содержание в урансодержащем растворе, приготовленном из ХКПУ (химический концентрат природного урана), г/дм³: U – 10,60; H_2SO_4 – 25,70. В качестве экстрагентов использовали синтезированные 4,5-диметил-2-(2,2,2-трифторэтокси)-1,3,2-диоксафосфолан и 5,5-диметил-2-(2,2,3,3,4,4,5,5-октафторпентокси)-1,3,2-диоксафосфоринан.

Концентрацию урана определяли по стандартной

методике для водных растворов и органической фазы – титрованием ванадатом аммония¹.

Экстракцию урана проводили путем единовременного контакта синтезированных экстрагентов и водных растворов сернистой или азотнокислого товарного десорбата при постоянном перемешивании на магнитной мешалке. Температура в производственном помещении – 24 °С, время контакта – 20 мин. Соотношение соединений при изучении экстракционных свойств – О : В = 1 : 10.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез экстрагентов. Реакция 4,5-диметил-2-хлор-1,3,2-диоксафосфолана (1) с 2,2,2-трифторэтанолом (2) легко протекает в системе триэтиламин-гексан (от -10 до 22 °С, 5 ч) и приводит к образованию 4,5-диметил-2-(2,2,2-трифторэтоксид)-1,3,2-диоксафосфолана (3) с выходом 57% (рис. 1).

Согласно данным ЯМР (¹H, ¹³C, ³¹P), синтезированный фосфолан (3) существует в виде трех изомеров: основной **A** – энантиомерная пара *RR(SS)*, имеет *транс*-расположение метильных групп в фосфолановом цикле, два других (мезоформы **B** и **C**) – *цис*-расположение метильных групп (рис. 2). В одной мезоформе (средний по содержанию в смеси изомер **B**, *RS-цис*) метильные заместители находятся в *цис*-, а в другой (минорный продукт **C**, *RS-транс*) в *транс*-положении по отношению к фторалкоксильной группе при атоме фосфора. Соотношение этих трех изомеров составляет 6,5 : 1,5 : 1.

Значительно большее содержание изомера **A** в смеси объясняется, возможно, большей тер-

модинамической стабильностью изомера с *транс*-ориентацией метильных заместителей в положениях 4 и 5 диоксафосфоланового кольца. Отнесение изомеров проведено на основании различий в ЯМР ¹H, ¹³C, ³¹P-спектроскопических параметрах [22, 23].

Особенностью синтезированного соединения является то, что в монометильных производных химический сдвиг ³¹P в *транс*-изомерах находится в более сильном поле по сравнению с *цис*-изомерами (на 3-4 м.д.). При этом химические сдвиги ³¹P в *RS-транс*-изомерах находятся в сильном поле (136–139 м. д.), тогда как *RR(S,S)*-изомер и *RS-цис*-изомер резонируют в областях 140–144 м.д. и 148–150 м.д. соответственно; протоны метильных групп в *транс*-положении к заместителю на фосфоре резонируют на 0,1 м.д. в более сильном поле относительно протонов метильных групп в *цис*-положении. Химические сдвиги метиновых протонов кольца в *транс*-изомере находятся в более слабом поле – на 0,3–0,4 м.д. Вицинальная КССВ фосфора (3–6 Гц) с углеродом метильной группы в *транс*-положении к фторалкоксильному заместителю больше, чем с углеродом метильной группы в *цис*-положении (~1 Гц).

Взаимодействием 2,2,3,3,4,4,5,5-октафторпентилдихлорфосфита (4) и 2,2-диметил-1,3-пропандиола (5) был синтезирован 5,5-диметил-2-(2,2,3,3,4,4,5,5-октафторпентоксид)-1,3,2-диоксафосфоринан (6). Реакция замещения-циклизации протекает в мягких условиях (система Р_у/Et₂O, -10–22 °С, 5 ч), выход диоксафосфоринана (6) – 53% (рис. 3).

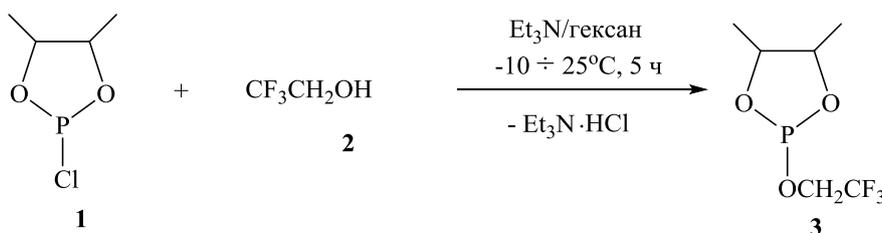


Рис. 1. Образование 4,5-диметил-2-(2,2,2-трифторэтоксид)-1,3,2-диоксафосфолана (3)

Fig. 1. Formation of 4,5-dimethyl-2-(2,2,2-trifluoroethoxy)-1,3,2-dioxaphospholane (3)

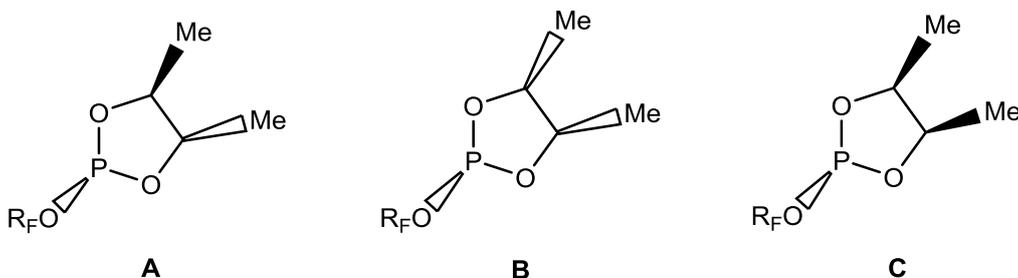


Рис. 2. Структура 4,5-диметил-2-хлор-1,3,2-диоксафосфолана

Fig. 2. Structure of 4,5-dimethyl-2-chloro-1,3,2-dioxaphospholane

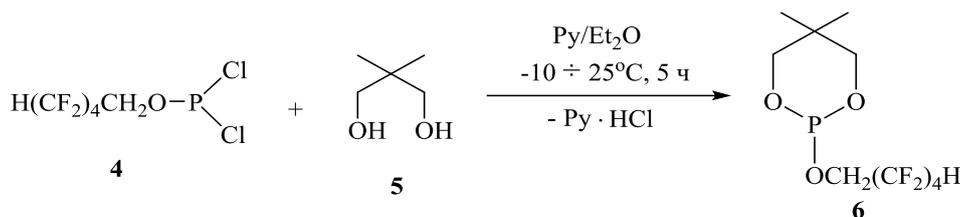


Рис. 3. Синтез 5,5-диметил-2-(2,2,3,3,4,4,5,5-октафторпентокси)-1,3,2-диоксафосфоринан 6

Fig. 3. Synthesis of 5,5-dimethyl-2-(2,2,3,3,4,4,5,5-octafluoropentoxy)-1,3,2-dioxaphosphorinane 6

Согласно данным ЯМР (^1H , ^{13}C , ^{31}P), фосфоринан (**6**) существует в виде двух изомеров – с *цис*- и *транс*-расположением алкоксильного заместителя при атоме фосфора и метильной группы в кольце, с преобладающим содержанием *цис*-изомера. Отнесение изомеров проведено на основании различий в их ЯМР-спектрах [24, 25]. Обнаружено, что химические сдвиги ^{31}P *транс*-изомеров (аксиальная ориентация заместителя у фосфора) находятся в более сильном поле по сравнению с *цис*-изомерами (на 4 м.д.), вицинальная $^3J_{\text{P-C}(5)}$ в *цис*-изомерах значительно больше (12–16 Гц) по сравнению с $^3J_{\text{P-C}(5)}$ в *транс*-изомерах (5 Гц) [24, 25].

Тестирование экстракционных свойств 4,5-диметил-2-(2,2,2-трифторэтоксид)-1,3,2-диоксафосфолана (3). При смешивании фосфолана (**3**) и азотнокислого раствора урансодержащего товарного десорбата образовалось две фазы: органическая и водная. При этом органическая фаза изменила свою окраску с бесцветной на желтую, экстрагент (**3**) растворился на 95%.

При проведении экстракции на сернокисл

растворе фосфолан (**3**) растворился более чем на 55%. Содержание урана в процессе извлечения из азотнокислого раствора в маточнике экстракции – 9,32 г/дм³, а в органической фазе – 25,80 г/дм³, извлечение урана составило 1,42%. Содержание урана при извлечении из сернокисло

Тестирование экстракционных свойств 5,5-диметил-2-(2,2,3,3,4,4,5,5-октафторпентокси)-1,3,2-диоксафосфоринана (6). При взаимодействии фосфоринана (**6**) с урансодержащим азотнокислым раствором получены две фазы с содержанием урана, г/дм³: в маточнике экстракции – 8,91; в органической фазе – 21,10; извлечение урана составило 15,22%. Органическая фаза изменила свою окраску с бесцветной на желтую, объем не изменился, исследуемый фосфоринан не растворился. Граница разделения фаз четкая, ярко выраженная, образования эмульсии (так называемой бороды) – третьей фазы, не наблюдалось (табл. 2).

Таблица 1. Результаты экстракции урана из азотнокислых и сернокислых урансодержащих растворов 4,5-диметил-2-(2,2,2-трифторэтоксид)-1,3,2-диоксафосфоланом

Table 1. Results of uranium extraction from uranium nitric and sulfuric solutions with 4,5-dimethyl-2-(2,2,2-trifluoroethoxy)-1,3,2-dioxaphospholane

Маточник экстракции				Органическая фаза раствора		Извлечение урана из раствора, %
Раствор	Концентрация раствора, г/дм ³	U, г/дм ³	V, см ³	U, г/дм ³	V, см ³	
HNO ₃	56,30	9,32	41,40	25,80	≈0,21	1,42
H ₂ SO ₄	25,90	8,80	38,00	29,50	1,6	12,36

Таблица 2. Результаты экстракции урана из азотнокислых и сернокислых урансодержащих растворов 5,5-диметил-2-(2,2,3,3,4,4,5,5-октафторпентокси)-1,3,2-диоксафосфоринаном

Table 2. Results of uranium extraction from uranium nitric and sulfuric solutions with 5,5-dimethyl-2-(2,2,3,3,4,4,5,5-octafluoropentoxy)-1,3,2-dioxaphosphorine

Маточник экстракции				Органическая фаза раствора		Извлечение урана из раствора, %
Раствор	Концентрация раствора, г/дм ³	U, г/дм ³	V, см ³	U, г/дм ³	V, см ³	
HNO ₃	55,80	8,91	24,50	21,10	≈2,3	15,22
H ₂ SO ₄	25,40	9,20	24,00	17,31	1,3	9,43

¹СТ НАК 04-2007. Метод определения урана в техно-логических растворах: стандарт АО «НАК «Казатомпром»; утв. и введен в действие приказом Президента АО «НАК «Казатомпром» № 112 от 13.06.2007 г. Алматы, 2007. 8 с.

В процессе экстракции урана фосфоринаном (6) на сернокислом растворе произошло расслоение фаз на органическую и водную. Тестируемый фосфоринан растворился на 43%. Содержание урана в маточнике экстракции – 9,20 г/м³, в органической фазе – 17,31 г/дм³ (см. табл. 2), извлечение урана составило 9,43%.

Результаты исследования показали, что из двух синтезированных фосфорсодержащих гетероциклических соединений более выраженные экстракционные свойства показал 5,5-диметил-2-(2,2,3,3,4,4,5,5-октафторпентокси)-1,3,2-диоксафосфоринан. Данный экстрагент не растворяется в азотнокислых растворах, способен экстрагировать уран как из азотнокислых, так из сернокислых урансодержащих растворов товарного десорбата. Перспективным в качестве нового экстрагента тяжелых металлов представляется 4,5-диметил-2-(2,2,2-трифторэтоксид)-1,3,2-диоксафосфоринан. В ходе исследований синтезированный диоксафосфоринан проявил экстракционные свойства по отношению к урану, но растворение этого соединения в кислых урансодержа-

щих растворах значительно снижает степень извлечения урана. Дальнейшее исследование по подбору оптимальных условий проведения экстракционного процесса, органического разбавителя, а также соотношения реагентов позволит повысить эффективность использования данных соединений в процессе экстракции урана.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Взаимодействием 2-хлор-4,5-диметил-1,3,2-диоксафосфолана с трифторэтанолом, а также реакцией замещения-циклизации 2,2,3,3,4,4,5,5-октафторпентилдихлорфосфита с 2,2-диметил-1,3-пропандиолом в мягких условиях и с хорошим выходом синтезированы 4,5-диметил-2-(2,2,2-трифторэтоксид)-1,3,2-диоксафосфоринан и 5,5-диметил-2-(2,2,3,3,4,4,5,5-октафторпентокси)-1,3,2-диоксафосфоринан. Применение полученных соединений в качестве экстрагентов в процессе экстракции урана позволяет извлекать уран из технологических азотнокислых или сернокислых урансодержащих растворов товарного десорбата до 12,4 и 15,2% соответственно.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Free M.L. Hydrometallurgy: fundamentals and applications. New York: John Wiley and Sons Limited, 2013. 444 p. <https://doi.org/10.1002/9781118732465>
2. Pradhan S., Swain N., Prusty S., Sahu R.K., Mishra S.R. Role of extractants and diluents in recovery of rare earths from waste materials // *Materials Today: Proceedings*. 2020. Vol. 30. Part 2. P. 239–245. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.01.288>
3. Chu D., Ma G., Li D. Solvent Extraction of Lanthanides and Yttrium from Nitrate Solutions with Cyanex 923 // *Solvent Extraction for the 21st Century*. Proceedings of ISEC'99; Ed.; Society of Chemical Industry: London, UK. 2001ю Vol. 2. P. 1109–1114.
4. Mishra B.B., Devi N. Solvent extraction and separation of europium (III) using a phosphoniumionic liquid and an organophosphorus extractant – A comparative study // *Journal of Molecular Liquids*. 2018. Vol. 271. P. 389–396. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.08.160>
5. Yudaev P.A., Kolpinskaya N.A., Chistyakov E.M. Organophosphorous extractants for metals // *Hydrometallurgy*. 2021. Vol. 201. 105558. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2021.105558>
6. Leybros A., Hung L., Hertz A., Hartmann D.C., Grandjean A., Boutin O. Supercritical CO₂ extraction of uranium from natural ore using organophosphorus extractants // *Chemical Engineering Journal*. 2017. Vol. 316. P. 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.01.101>
7. Gupta B., Singh I. Extraction and separation of platinum, palladium and rhodium using Cyanex 923 and their recovery from real samples // *Hydrometallurgy*. 2013. Vol. 134-135. P. 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2013.01.001>
8. Zhang P., Dong L., Dongxiang Z., Shi L., Yang H., Li J., et al. Efficient extraction of Nd(III) by calix[4]arene derivatives containing diethyl phosphite // *Hydrometallurgy*. 2017. Vol. 169. P. 47–58. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2016.12.005>
9. Annam S., Gopakumar G., Brahmmananda Rao C.V.S., Sivaraman N., Sivaramakrishna A., Vijayakrishna K. Extraction of actinides by Tri-*n*-butyl phosphate derivatives: Effect of substituents // *Inorganica Chimica Acta*. 2018. Vol. 469. P. 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2017.07.048>
10. Suresh A., Srinivasan T.G., Vasudeva Rao P.R. The effect of the structure of trialkyl phosphates on their physicochemical properties and extraction behavior // *Solvent Extraction and Ion Exchange*. 2009. Vol. 27. Issue 2. P. 258–294. <https://doi.org/10.1080/07366290802674481>
11. Chernyshov D.V., Krachkovskiy S.A., Kapylov A.V., Bolshakov I.A., Shin W.C.I., Ue M. Substituted dioxaphosphinane as an electrolyte additive for high voltage lithium-ion cells with overlithiated layered oxide // *Journal of the Electrochemical Society*. 2014. Vol. 161. Issue 4. P. A633–A642. <https://doi.org/10.1149/2.100404jes>
12. Su C.-C., He M., Peebles C., Zeng L., Tornheim A., Liao C., et al. Functionality selection principle for high voltage lithium-ion battery electrolyte additives // *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2017. Vol. 9. Issue 36. P. 30686–30695. <https://doi.org/10.1021/acami.7b08953>
13. Yoon J.-G., Doo S.-G., Hwang S.-S., Park K.-S., Gusarova N.K., Trofimov B.A. Organic electrolytic solution and lithium battery using the same. Patent of USA, no. 2007/0048622 A1, 2007.
14. Chernyshov D., Shin W.-C., Shatunov P.A., Tereshchenko A., Egorov V., Khasanov M., et al. Electrolyte additive and electrolyte including same and lith-

ium rechargeable battery including electrolyte. European Patent, no. 2746288 A1 20140625, 2014.

15. Chernyshov D., Shin W.-C., Egorov V., Shatunov P. Phosphorus containing compound, method of prepa-ring same, and electrolyte for rechargeable lithium battery and rechargeable lithium battery including the same. Patent of US, no. 2014/0220426 A1, 2014.

16. Yoon J.G., Doo S.G., Hwang S.S., Park K.S., Gusarova N.K., Trofimov B.A. *Organic electrolytic solution and lithium battery using the same*. Patent of US, no 20070048622 (A1), 2007.

17. Han S.-I., Shin W.Ch., Yu J.Y., Bae T.H., Lee M.H., Chernyshov D., et al. *Electrolyte for rechargeable lithium battery, and rechargeable lithium battery comprising sam*. Patent of US, 20120244445 (A1), 2012.

19. Чмутова М.К., Куляко Ю.М., Литвина М.Н., Маликов Д.А., Мясоедов Б.Ф. Экстракция актиноидов и лантаноидов дифенил [дибутилкарбамоил-метил] фосфиноксидом в отсутствие растворителя // Радиохимия. 1998. Т. 40. N 3. С. 241–247.

20. Troitskaya L.L., Ovseenko S.T., Slovokhotov Y.L., Neretin I.S., Sokolov V.I. Hydroxyferrocene as a prochiral analog of phenols: cyclopalladation of a mixed phosphite ester of hydroxyferrocene // Journal of Organometallic Chemistry. 2002. Vol. 642. Issue 1-2. P. 191–194. [https://doi.org/10.1016/S0022-328X\(01\)01228-1](https://doi.org/10.1016/S0022-328X(01)01228-1)

21. Fokin A.V., Kolomiets A.F., Komarov V.A., Rapkin A.I., Krolevets A.A., Pasevina K.I. Reaction of α , α , ω -trihydroperfluoroalkanols with phosphorus trichloride // Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR, Division of Chemical Science. 1979. Vol. 28. P. 148–152. <https://doi.org/10.1007/BF00925413>

22. Bentrude W.G., Tan H.V. Conformations of saturated phosphorus heterocycles. IV. Proton, carbon-13, and phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies of geometrical isomers of 2-Z-4-methyl- and 4-tert-butyl-1,3,2-dioxaphospholanes // Journal of the American Chemical Society. 1976. Vol. 98. Issue 7. P. 1850–1859. <https://doi.org/10.1021/ja00423a034>

23. Pouchoulin G., Llinas J.R., Buono G., Vincent E.J. Analyse RMN (^1H , ^{13}C , ^{31}P) de méthoxy-2 dioxaphospholanes-1,3,2 di- et tétraméthylés en position 4 et 5 // Organic Magnetic Resonance. 1976. Vol. 8. Issue 10. P. 518–521. <https://doi.org/10.1002/mrc.1270081007>

24. Нифантьев Э.Е., Сорокина С.Ф., Борисенко А.А. ЯМР исследование стереохимии 1,3,2,-диоксафосфор(III)ианов // Журнал органической химии. 1985. Т. 55 N 8. С. 1665–1684.

25. Bentrude W.G., Yee K.C., Bertrand R.D., Grant D.M. Conformations of six-membered ring phosphorus heterocycles. Preferred axial orientation of methyl on phosphorus in a six-membered ring tert-butyl-substituted methylphosphonite // Journal of the American Chemical Society. 1971. Vol. 93. Issue 3. P. 797–798. <https://doi.org/10.1021/ja00732a052>

REFERENCES

1. Free ML. *Hydrometallurgy: fundamentals and applications*. New York: John Wiley and Sons Limited; 2013. 444 p. <https://doi.org/10.1002/9781118732465>

2. Pradhan S, Swain N, Prusty S, Sahu RK, Mishra SR. Role of extractants and diluents in recovery of rare earths from waste materials. *Materials Today: Proceedings*. 2020;30(2):239–245. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.01.288>

3. Chu D, Ma G, Li D. *Solvent Extraction of Lanthanides and Yttrium from Nitrate Solutions with Cyanex 923. Solvent Extraction for the 21st Century. Proceedings of ISEC'99*; Ed.; Society of Chemical Industry: London, UK. 2001; 2:1109–1114.

4. Mishra BB, Devi N. Solvent extraction and separation of europium (III) using a phosphoniumionic liquid and an organophosphorus extractant – A comparative study. *Journal of Molecular Liquids*. 2018;271:389–396. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.08.160>

5. Yudaev PA, Kolpinskaya NA, Chistyakov EM. Organophosphorous extractants for metals. *Hydrometallurgy*. 2021;201:105558. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2021.105558>

6. Leybros A, Hung L, Hertz A, Hartmann DC, Grandjean A, Boutin O. Supercritical CO₂ extraction of uranium from natural ore using organophosphorus extractants. *Chemical Engineering Journal*. 2017;316: 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.01.101>

7. Gupta B, Singh I. Extraction and separation of platinum, palladium and rhodium using Cyanex 923

and their recovery from real samples. *Hydrometallurgy*. 2013;134-135:11–18. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2013.01.001>

8. Zhang P, Dong L, Dongxiang Z, Shi L, Yang H, Li J, et al. Efficient extraction of Nd(III) by calix[4]arene derivatives containing diethyl phosphite. *Hydrometallurgy*. 2017;169:47–58. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2016.12.005>

9. Annam S, Gopakumar G, Brahmmananda Rao CVS, Sivaraman N, Sivaramakrishna A, Vijayakrishna K. Extraction of actinides by Tri-*n*-butyl phosphate derivatives: Effect of substituents. *Inorganica Chimica Acta*. 2018;469:123–132. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2017.07.048>

10. Suresh A, Srinivasan TG, Vasudeva Rao PR. The effect of the structure of trialkyl phosphates on their physicochemical properties and extraction behavior. *Solvent Extraction and Ion Exchange*. 2009;27(2): 258–294. <https://doi.org/10.1080/07366290802674481>

11. Chernyshov DV, Krachkovskiy SA, Kapylou AV, Bolshakov IA, Shin WCI, Ue M. Substituted dioxaphosphinane as an electrolyte additive for high voltage lithium-ion cells with overlithiated layered oxide. *Journal of the Electrochemical Society*. 2014;161(4):A633–A642. <https://doi.org/10.1149/2.100404jes>

12. Su C-C, He M, Peebles C, Zeng L, Tornheim A, Liao C, et al. Functionality selection principle for high voltage lithium-ion battery electrolyte additives.

ACS Applied Materials & Interfaces. 2017;9(36):30686–30695. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b08953>

13. Yoon J-G, Doo S-G, Hwang S-S, Park K-S, Gusarova NK, Trofimov BA *Organic electrolytic solution and lithium battery using the same*. Patent of US, no. 2007/0048622 A1; 2007.

14. Chernyshov D, Shin W-C, Shatunov PA, Teshchenko A, Egorov V, Khasanov M, et al. *Electrolyte additive and electrolyte including same and lithium rechargeable battery including electrolyte*. European Patent, no. 2746288 A1 20140625; 2014.

15. Chernyshov D, Shin W-C, Egorov V, Shatunov P. *Phosphorus containing compound, method of preparing same, and electrolyte for rechargeable lithium battery and rechargeable lithium battery including the same*. Patent of US, no. 2014/0220426 A1; 2014.

16. Yoon JG, Doo SG, Hwang SS, Park KS, Gusarova NK, Trofimov BA. *Organic electrolytic solution and lithium battery using the same*. Patent of US, no 20070048622 (A1); 2007.

17. Han S-I, Shin WCh, Yu JY, Bae TH, Lee MH, Chernyshov D, et al. *Electrolyte for rechargeable lithium battery, and rechargeable lithium battery comprising sam*. Patent of US, 20120244445 (A1); 2012.

19. Chmutova MK, Kulyako YuM, Litvina MN, Malikov DA, Myasoedov BF. Extraction of actinoids and lanthanoids by diphenyl[dibutylcarboylmethyl] phosphine oxide freedom from solvent. *Radiokhimiya = Radiochemistry*. 1998;40(3):241–247. (In Russian)

20. Troitskaya LL, Ovseenko ST, Slovokhotov YL, Neretin IS, Sokolov VI. Hydroxyferrocene as a prochiral analog of phenols: cyclopalladation of a mixed phosphite ester of hydroxyferrocene. *Journal of Organometallic Chemistry*. 2002;642(1-2):191–194. [https://doi.org/10.1016/S0022-328X\(01\)01228-1](https://doi.org/10.1016/S0022-328X(01)01228-1)

21. Fokin AV, Kolomiets AF, Komarov VA, Rapkin AI, Krolevets AA, Pasevina KI. Reaction of α , α , ω -trihydroperfluoroalkanol with phosphorus trichloride. *Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR, Division of Chemical Science*. 1979; 28:148–152. <https://doi.org/10.1007/BF00925413>

22. Bentrude WG, Tan HV. Conformations of saturated phosphorus heterocycles. IV. Proton, carbon-13, and phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies of geometrical isomers of 2-Z-4-methyl- and 4-tert-butyl-1,3,2-dioxaphospholanes. *Journal of the American Chemical Society*. 1976;98(7):1850–1859. <https://doi.org/10.1021/ja00423a034>

23. Pouchoulin G, Llinas JR, Buono G, Vincent EJ. Analyse RMN (^1H , ^{13}C , ^{31}P) de méthoxy-2 dioxaphospholanes-1,3,2 di- et tétraméthylés en position 4 et 5. *Organic Magnetic Resonance*. 1976;8(10):518–521. <https://doi.org/10.1002/mrc.1270081007>

24. Nifant'ev EE, Sorokina SF, Borisenko AA. NMR study of stereochemistry of 1,3,2-dioxaphosphor(III)inans. *Zhurnal organicheskoi khimii = Russian Journal of Organic Chemistry*. 1985;55(8):1665–1684. (In Russian)

25. Bentrude WG, Yee KC, Bertrand RD, Grant DM. Conformations of six-membered ring phosphorus heterocycles. Preferred axial orientation of methyl on phosphorus in a six-membered ring tert-butyl-substituted methylphosphonite. *Journal of the American Chemical Society*. 1971;93(3):797–798. <https://doi.org/10.1021/ja00732a052>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

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

Налибаева Арайлым Муратовна,
научный сотрудник,
Институт топлива, катализа
и электрохимии им. Д.В. Сокольского,
050010, г. Алматы, ул. Д. Кунаева, 142,
Республика Казахстан,
✉ e-mail: aray77@mail.ru; a.nalibayeva@ifce.kz

Сайдуллаева Сабина Абдикаримовна,
начальник лаборатории исследований
и анализа материалов,
ТОО «Институт высоких технологий»,
050012, г. Алматы, ул. Богембай батыра, 168,
Республика Казахстан,
e-mail: ssabina81@mail.ru

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

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

Arailym M. Nalibayeva
Researcher,
D.V. Sokolskiy Institute of Fuel, Catalysis
and Electrochemistry,
142, Kunaeva St., Almaty, 050010,
Republic of Kazakhstan,
✉ e-mail: aray77@mail.ru; a.nalibayeva@ifce.kz

Sabina A. Saidullayeva,
Head of the Materials Research
and Analysis Laboratory
Institute of High Technologies,
168, Bogembay batyr St., Almaty, 050012,
Republic of Kazakhstan,
e-mail: ssabina81@mail.ru

Жанабаева Асем Калдыбеккызы,
младший научный сотрудник,
Институт топлива, катализа
и электрохимии им. Д.В. Сокольского,
050010, г. Алматы, ул. Д. Кунаева, 142,
Республика Казахстан;
e-mail: a.zhanabayeva@ifce.kz

Болд Амангуль,
научный сотрудник,
Институт топлива, катализа
и электрохимии им. Д.В. Сокольского,
050010, г. Алматы, ул. Д. Кунаева, 142,
Республика Казахстан,
e-mail: a.bold@ifce.kz

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

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 02.08.2021.
Одобрена после рецензирования 25.08.2021.
Принята к публикации 30.08.2021.*

Asem K. Zhanabaeva,
Junior Researcher,
D.V. Sokolskiy Institute of Fuel, Catalysis
and Electrochemistry,
142, Kunaev St., Almaty, 050010,
Republic of Kazakhstan,
e-mail: a.zhanabayeva@ifce.kz

Amangul Bold,
Researcher,
D.V. Sokolskiy Institute of Fuel, Catalysis
and Electrochemistry,
142, Kunaev St., Almaty, 050010,
Republic of Kazakhstan,
e-mail: a.bold@ifce.kz

Yerlan N. Abdikalykov,
Leading Engineer,
D.V. Sokolskiy Institute of Fuel, Catalysis
and Electrochemistry,
142, Kunaev St., Almaty, 050010,
Republic of Kazakhstan,
e-mail.ru: y.abdikalykov@ifce

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 02.08.2021.
Approved after reviewing 25.08.2021.
Accepted for publication 30.08.2021.*

Оригинальная статья / Original article

УДК 66.067.8.081.3+ 66.011

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-349-357>



Регрессионные модели адсорбции ионов никеля (II) углеродными сорбентами

© Н.В. Иринчинова *, В.И. Дударев*, Е.Г. Филатова*, В.С. Асламова**

*Иркутский национальный исследовательский технический университет,
г. Иркутск, Российская федерация

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

Резюме: Использование недорогих материалов в качестве сорбентов повышает конкурентные преимущества удаления ионов тяжелых металлов, в том числе ионов никеля (II), из водных растворов и сточных вод. К таковым материалам можно отнести активные угли – углеродные сорбенты. В качестве объекта исследования использовали окисленный углеродный сорбент АД-05-2 и его исходный аналог. Окисление углеродного сорбента АД-05-2 осуществляли раствором азотной кислоты и мочевины по известной методике. В результате окисления улучшены текстурные характеристики углеродного сорбента. Увеличен суммарный объем пор, в том числе и объем микропор, что положительно повлияло на сорбционные свойства полученного образца. В работе исследована адсорбция ионов никеля (II) окисленным углеродным сорбентом АД-05-2 и его исходным аналогом. Для обоих образцов время установления адсорбционного равновесия в системе адсорбат–адсорбент составило 4 ч, pH = 9,6, интервал исследуемых температур – 298–338 К. Полученные экспериментальные данные по адсорбции ионов никеля (II) обработаны в пакете программы Statgraphics Plus. Изотермы адсорбции описаны регрессионными моделями параболического типа, которые охватывают 98,86–99,99% экспериментальных данных. Адсорбция ионов никеля (II) повышается с увеличением температуры, о чем свидетельствует рост значения первой производной dA/dC_p , по-видимому, за счет роста скорости внешней диффузии. Особенно крутой подъем изотерм соответствует температуре 338 К, что свидетельствует о воздействии диффузии на процесс адсорбции. Даны оценки точности регрессионных моделей: среднеквадратическая σ и абсолютная Δ ошибки. По критерию Дарбина – Уотсона (DW) оценена автокорреляция опытных данных. Полученные модели регрессии могут быть использованы для расчета оптимальных параметров процесса адсорбции ионов никеля (II) из водных растворов и технологических сред с применением окисленного углеродного сорбента АД-05-2 и его исходного аналога.

Ключевые слова: ионы никеля (II), углеродный адсорбент АД-05-2, окисленный АД-05-2, регрессионные модели, адсорбция

Для цитирования: Иринчинова Н.В., Дударев В.И., Филатова Е.Г., Асламова В.С. Регрессионные модели адсорбции ионов никеля (II) углеродными сорбентами. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т. 11. N 3. С. 349–357. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-349-357>

Regression models of adsorbing nickel (II) ions by carbon sorbents

Nadejda V. Irinchinova, Vladimir I. Dudarev, Elena G. Filatova, Vera S. Aslamova

*Irkutsk National Research Technical University,
Irkutsk, Russian Federation

**Irkutsk State Transport University,
Irkutsk, Russian Federation

Abstract: The use of inexpensive materials such as sorbents increases the competitive advantages of removing heavy metal ions, including nickel (II) ions, from aqueous solutions and wastewater. Such materials include active carbons – carbon sorbents. The oxidized carbon sorbent AD-05-2 and its original analogue have been used as the object of this research. The oxidation of carbon sorbent AD-05-2 was conducted using a solution of nitric acid and urea following a conventional method. Oxidation resulted in improvement of the textural characteristics of the carbon sorbent. The total pore volume increased, including the volume of micropores, which had a positive effect on the sorption properties of the obtained sample. This article studies the adsorption of nickel (II) ions by the oxidized carbon sorbent AD-05-2 and its original analogue. For both

models, the total time of establishing adsorptive equilibrium in the system adsorbate–adsorbent was 4 hours, pH = 9,6, and the range of temperatures – 298–338 K. The obtained experimental data on the nickel (II) ion adsorption are processed in the software package Statgraphics Plus. Adsorption isotherms are described using parabolic regression models, which cover 98.86–99.99% of the experimental data. The adsorption of nickel (II) ions increases with temperature, as indicated by a higher value of the first derivative dA/dC_p , apparently, due to accelerated external diffusion. A significant steep rise of the isotherms corresponds to the temperature of 338 K, which indicates the diffusion effect on the adsorption process. The estimates of the accuracy of regression models are provided by the mean square σ and absolute Δ errors. Autocorrelation of experimental data is estimated using Durbin – Watson (DW) test. The obtained regression models can be applied for calculating the optimum parameters of nickel (II) ions' adsorption from aqueous solutions and process stream using the oxidized carbonic sorbent AD-05-2 and its original analog.

Keywords: nickel (II) ions, carbon adsorbent AD-05-2, oxidized AD-05-2, regression models, adsorption

For citation: Irinchinova NV, Dudarev VI, Filatova EG, Aslamova VS. Regression models of nickel (II) ion adsorption by carbon sorbent. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(3):349–357. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-349-357>

ВВЕДЕНИЕ

Одной из важнейших задач современного производства является очистка промышленных сточных вод и техногенных образований от соединений тяжелых металлов. Известно, что никель относится к числу канцерогенных элементов [1]. При этом свободные ионы никеля (II) вдвое токсичнее его комплексных соединений. Максимальное содержание ионов никеля (II) в отработанных растворах гальванического производства составляет 50 мг/дм³, в промывных водах – от 2 до 5 мг/дм³ [2], в то время как согласно ГОСТ 4465-2016 их предельно допустимая концентрация не должна превышать 0,01 мг/дм³.

Для удаления ионов никеля (II) из водных растворов в последнее время широко используют различные наноматериалы [3, 4], в том числе однослойные (SWCNTs) и многослойные (MWCNTs) нанотрубки [5, 6], показавшие наибольшую сорбционную емкость по отношению к ионам тяжелых металлов. Так, в работе [7] исследована сорбция ионов никеля (II) многослойными нанотрубками и гранулированным активированным углем (ГАС).

В статье [8] представлены экспериментальные данные по удалению ионов Cd(II), Ni(II), и Pb(II) с применением гидрофильных углеродных наночастиц (HNPs), нанесенных на гранулы диоксида кремния. Исследуемые сорбенты показали высокую эффективность удаления ионов Cd(II), Ni(II), и Pb(II) при нейтральном значении pH и низкой температуре (10 °C). Анализ изотерм адсорбции показал, что свободная энергия Гиббса взаимодействия между сорбентом и ионами Ni(II) и Pb(II) выше, чем у ионов Cd(II). Сорбенты демонстрируют заметную адсорбционную способность на грамм активной фазы, мг/г: 0,54 – для ионов Cd(II), 13,48 – для ионов Ni(II), 8,87 – для ионов Pb(II).

В работе [9] в качестве адсорбента для одно-временного отделения ультра-следовых количеств кадмия, свинца, меди и никеля использован наногель, состоящий из магнетита Fe₃O₄, диоксида кремния и поли-4-винилпиридина. Эффективность извлечения составила больше 98%.

Для отделения и предварительного концентрирования следовых количеств ионов кадмия, меди, никеля и свинца из пищевых и сельскохозяйственных продуктов получен сорбент путем функционализации нанопористого кремнезема SBA-15 дитионом [10]. Эффективность выделения указанных металлов превысила 97%. Адсорбционная емкость сорбента SBA-15 составила, мг/г: 189 – для кадмия; 102 – для меди; 91 – для никеля; 208 – для свинца.

Для удаления ионов никеля (II) широко используются отходы различных производств. Так, авторы работы [11] для удаления никеля и хрома из водных растворов в качестве адсорбента использовали сырой жмых (отходы сахарного производства) и летучую золу (отходы ТЭЦ). Сырой жмых перед применением обрабатывали 0,1 н NaOH, а затем 0,1 н CH₃COOH. Эффективность данных сорбентов по удалению хрома и никеля составила от 56,2 до 96,2% и от 83,6 до 100% соответственно.

В работе [12] в качестве сорбентов для удаления никеля из водных растворов использовали кальцинированный фосфат, красный и осветленный шлам (отходы сталелитейной промышленности). Адсорбционная емкость, рассчитанная на основе изотермы Ленгмюра, и полученные значения свободной энергии Гиббса показали, что кальцинированный фосфат обладает более высокой емкостью и способностью к извлечению никеля по сравнению с другими сорбентами.

Использование недорогих материалов в качестве сорбентов повышает конкурентные преимущества удаления ионов тяжелых металлов из водных растворов и сточных вод. К таким материалам можно отнести активные угли – углеродные сорбенты.

Целью настоящей работы явилось исследование и описание регрессионными моделями закономерностей адсорбции ионов никеля (II) углеродными сорбентами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве объекта исследования использовали углеродный сорбент АД-05-2. Для увеличения адсорбционной емкости исходного сорбента проведено его окисление раствором азотной кислоты и мочевины [13]. Окисленный уголь, полученный окислением в присутствии мочевины, устойчив в щелочных растворах и не выделяет в жидкую фазу побочные продукты. Мочевина в процессе окисления или модифицирования выступает как буфер: она предохраняет угольную матрицу от разрушения, уничтожает выделяющиеся в процессе окисления оксиды азота, тем самым затрудняет образование гуминовых соединений.

Для окисления использовали просеянный от пыли и мелких частиц углеродный сорбент АД-05-2 с размером частиц от 2 до 0,5 мм. Сорбент предварительно подвергли стадии обеззоливания раствором соляной кислоты в течение суток при умеренном перемешивании. Для ускорения выделения минеральных солей смесь подогрели до 65 °С, далее образец промыли водой до pH = 4.

Стадию окисления проводили в присутствии смеси азотной кислоты и мочевины при 80 °С в течение 3-х ч при периодическом перемешивании для предотвращения ее вспучивания от отходящих газов и удаления газовых карманов в слое смеси угля и кислоты. После окисления уголь промывали водой до pH = 4 и высушивали до постоянной массы при температуре 105 °С. Технические характеристики окисленного образца и его исходного аналога АД-05-2 приведены в табл. 1.

Из представленных в табл. 1 данных видно, что в результате окисления улучшены текстурные характеристики углеродного сорбента. Увеличен суммарный объем пор, в том числе и объем микропор, что положительно влияет на сорбционные свойства полученного образца, в частности, на сорбционную активность по йоду.

Определение ионов никеля (II) осуществляли спектрофотометрическим методом с селективным реагентом диметилглиоксимом в присутствии йода [14, 15] на спектрофотометре ПЭ-5400В.

Адсорбцию ионов никеля (II) проводили в статических условиях, используя метод неизменных концентраций (исходная концентрация $C_0 = 200 \text{ мг/дм}^3$) и переменных навесок 2; 1; 0,75; 0,5 и 0,25 г. Объем адсорбата составлял 0,1 дм³.

Величину адсорбции, A , ммоль/г, вычисляли по формуле:

$$A = ((C_0 - C_p)/m) \cdot V \quad (1)$$

где C_0 и C_p – исходная и равновесная концентрации иона металла в растворе соответственно, ммоль/дм³; V – объем раствора, дм³; m – масса сорбента, г.

Для каждого варианта исходных данных проводили 3–5 опытов, добиваясь воспроизводимости результатов с погрешностью не более 0,01. Точка на графиках – среднеарифметическое значение величины A .

Оптимальное значение pH среды устанавливали в диапазоне от 3 до 12 с помощью 0,2 М аммиачно-ацетатных буферных растворов. Выявлено, что сорбент АД-05-2 проявляет адсорбционную активность к ионам никеля (II) в слабо-щелочной и щелочной средах. Адсорбция резко возрастает при pH > 9,5, что может быть связано с изменением свойств поверхности сорбентов и изменением состояния сорбата в растворе. С увеличением pH и, следовательно, увеличением концентрации гидроксид-ионов происходит постепенное замещение молекул аммиака в координационной сфере никеля на гидроксид-ионы с образованием смешанной координационной сферы [16].

Обработку полученных данных по адсорбции ионов никеля (II) осуществляли в пакете программы Statgraphics Plus. По наибольшему значению коэффициента детерминации, R^2 , %, определили вид регрессионной модели. Значение R^2 выявляло, сколько процентов экспериментальных данных описывается найденным уравнением регрессии. Скорректированный коэффициент детерминации, R^2_c , %, использовали для оценки тесноты связи между независимой и зависимой переменными, а среднеквадратическую σ и абсолютную Δ ошибки – для оценки точности модели. По критерию Дарбина – Уотсона (DW) судили об отсутствии автокорреляции в опытных данных.

Таблица 1. Технические характеристики углеродных адсорбентов исходного и окисленного АД-05-2

Table 1. Technical characteristics of original and oxidized AD-05-2 carbon adsorbents

Параметр	Сорбент	
	АД-05-2	Окисленный АД-05-2
Гранулометрический состав, %, при размере частиц, мм:		
<0,5	≤6	≤6
0,5–2	≥88	≥88
>2	≥6	≥6
Удельная поверхность, м ² /г	550	580
Механическая прочность, %	82	85
Суммарный объем пор (по воде), см ³ /г	0,62	0,69
Объем микропор, см ³ /г	0,24	0,26
Объем мезопор, см ³ /г	0,12	0,14
Сорбционная активность по йоду, %	84	89
Насыпная плотность, г/дм ³	550	550

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследована адсорбция ионов никеля (II) окисленным сорбентом АД-05-2 и его исходным аналогом. Время установления адсорбционного равновесия в системе адсорбат–адсорбент составило 4 ч для обоих образцов. Полученные изотермы адсорбции в температурном интервале 298–338 К представлены на рис. 1.

Как видно из представленных на рис. 1 графиков, величина адсорбции ионов никеля (II) окисленным углеродным сорбентом АД-05-2 выше, чем у исходного аналога и углеродного сорбента ИПИ-Т [17, 18]. Начальный участок изотерм более выпуклый (рис. 1, b), что подтверждает участие в адсорбции большего объема микропор. Для обоих образцов адсорбция ионов никеля (II) увеличивается с повышением температуры, очевидно, имеет место активированная адсорбция.

Полученные результаты адсорбции ионов

$$T = 298 \text{ К} \quad A = 0,000053 + 0,059236 \cdot C_p - 0,006397 \cdot C_p^2 \quad (2)$$

$$T = 318 \text{ К} \quad A = 0,002991 + 0,130722 \cdot C_p - 0,002150 \cdot C_p^2 \quad (3)$$

$$T = 338 \text{ К} \quad A = 0,003997 + 0,195342 \cdot C_p - 0,036772 \cdot C_p^2 \quad (4)$$

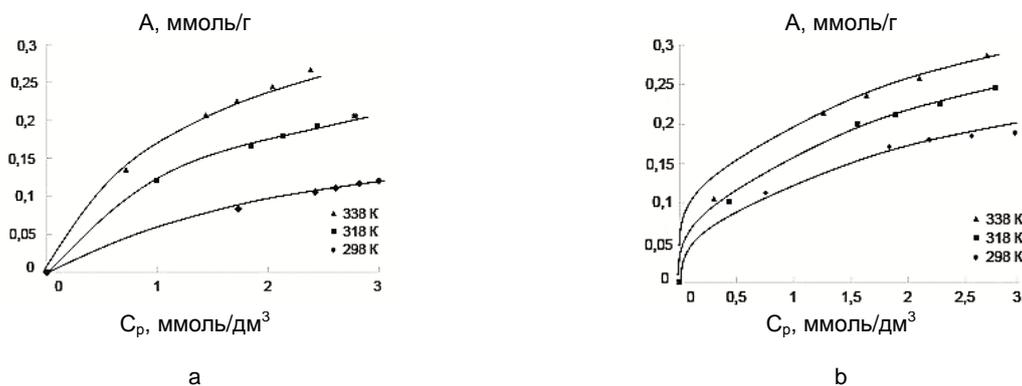


Рис. 1. Изотермы адсорбции ионов никеля (II):
 а – сорбентом АД-05-2; б – окисленным сорбентом АД-05-2

Fig. 1. Adsorption isotherm of nickel (II) ions:
 а – by the sorbent AD-05-2; б – by the oxidized sorbent AD-05-2

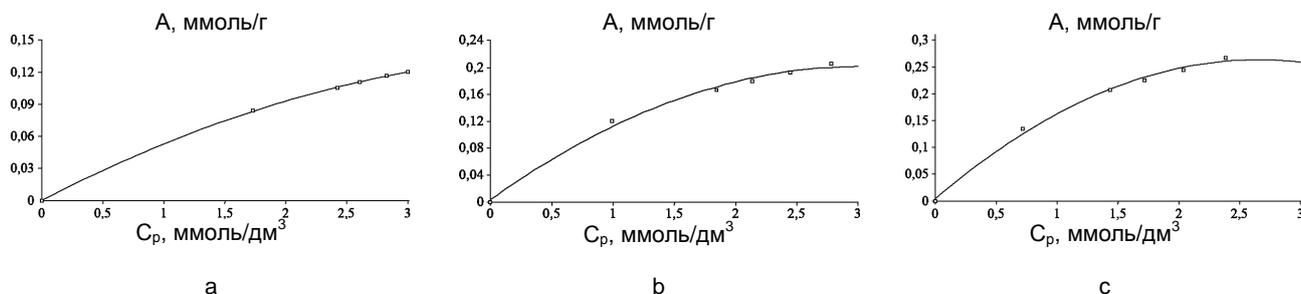


Рис. 2. Изотермы адсорбции ионов никеля (II) углеродным сорбентом АД-05-2 при температуре, К: а – 298; б – 318; с – 338

Fig. 2. Adsorption isotherm of nickel (II) ions by carbon sorbent AD-05-2 at temperature, К: а – 298, б – 318, с – 338

Таблица 2. Критерии адекватности регрессионных моделей

Table 2. Criteria for the adequacy of regression models

Номер модели	$R^2, \%$	$R^2_{cr}, \%$	DW	σ	Δ
(2)	99,99	99,99	2,30	0,0005	0,0003
(3)	99,42	99,03	2,39	0,0075	0,0048
(4)	99,59	99,03	2,21	0,0082	0,0052
(5)	98,86	98,10	2,52	0,0102	0,0065
(6)	98,19	96,99	2,38	0,0164	0,0098
(7)	97,52	95,86	2,35	0,0222	0,0132

Об адекватности найденных регрессий экспериментальным данным можно судить по зависимостям, представленным на рис. 3, отражающим результат сопоставления значений величины расчетной адсорбции A_p по моделям (2)–(4).

Как видно из представленных на рис. 3 данных, получена удовлетворительная сходимость экспериментальных и расчетных значений, критерий Дарбина – Уотсона (см. табл. 1) подтверждает отсутствие автокорреляции в опытных

данных. Точность регрессионных моделей оценена среднеквадратической σ и абсолютной Δ ошибками.

Изотермы адсорбции A , ммоль/г, ионов никеля (II) окисленным углеродным сорбентом АД-05-2 представлены на рис. 4 в интервале температур 298–338 К, адекватно описываемые параболой (5)–(7). Время адсорбции – 4 ч, pH = 9,6. Критерии адекватности см. в табл. 2.

$$T = 298 \text{ K} \quad A = 0,006175 + 0,146372 \cdot C_p - 0,029388 \cdot C_p^2 \quad (5)$$

$$T = 318 \text{ K} \quad A = 0,013751 + 0,168767 \cdot C_p - 0,031820 \cdot C_p^2 \quad (6)$$

$$T = 338 \text{ K} \quad A = 0,02130 + 0,199186 \cdot C_p - 0,038522 \cdot C_p^2 \quad (7)$$

Как видно из представленных на рис. 4 данных, адсорбция ионов никеля (II) окисленным углеродным сорбентом АД-05-2 так же, как и для исходного образца, растет с увеличением тем-

пературы. Особенно крутой подъем изотермы наблюдается при температуре 338 К, что свидетельствует о воздействии диффузии на процесс адсорбции.

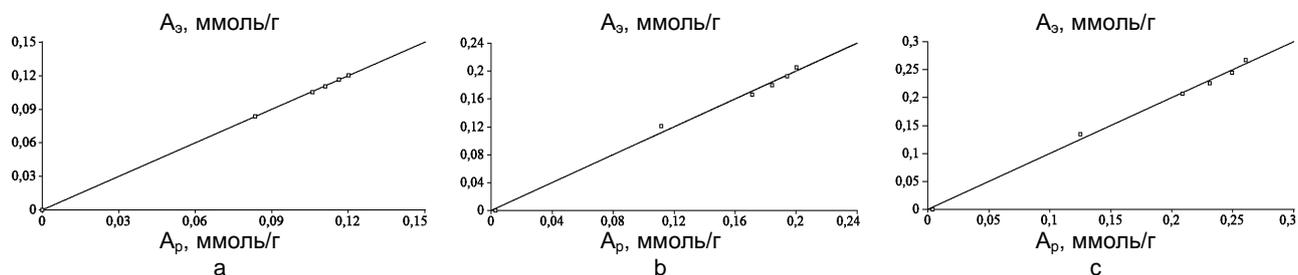


Рис. 3. Сравнение экспериментальных данных адсорбции $A_э$ ионов никеля (II) углеродным сорбентом АД-05-2 с расчетными значениями A_p по модели: (2) – при 298 К (а); (3) – при 318 К (б); (4) – при 338 К (с)

Fig. 3. Comparison of experimental $A_э$ adsorption data of nickel (II) ions by the carbon sorbent AD-05-2 with the calculated values of A_p according to the model: (2) – at 298 K (a); (3) – at 318 K (b); (4) – at 338 K (c)

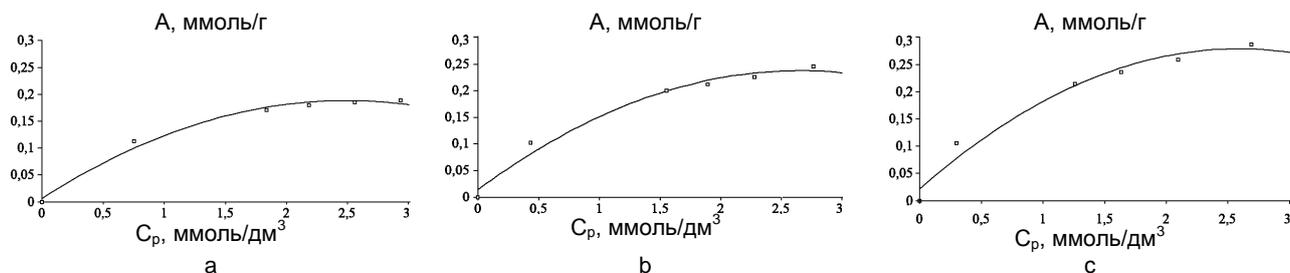


Рис. 4. Изотермы адсорбции ионов никеля (II) окисленным углеродным сорбентом АД-05-2 при температурах, К: а – 298; б – 318; с – 338

Fig. 4. Adsorption isotherm of nickel (II) ions by oxidized carbon sorbent AD-05-2 at temperatures, K: a – 298; b - 318; c - 338

Об адекватности найденных регрессий экспериментальным данным можно судить по зависимостям, представленным на рис. 5, отражающим результат сопоставления расчетных значений величины расчетной адсорбции A_p ионов никеля(II) окисленным углеродным сорбентом АД-05-2 по моделям (5)–(7).

Показана удовлетворительная сходимость экспериментальных и расчетных значений, критерий Дарбина – Уотсона (см. табл. 2) подтверждает отсутствие автокорреляции опытных данных. Полученные модели регрессии могут быть использованы для расчета оптимальных параметров процесса адсорбции ионов никеля (II).

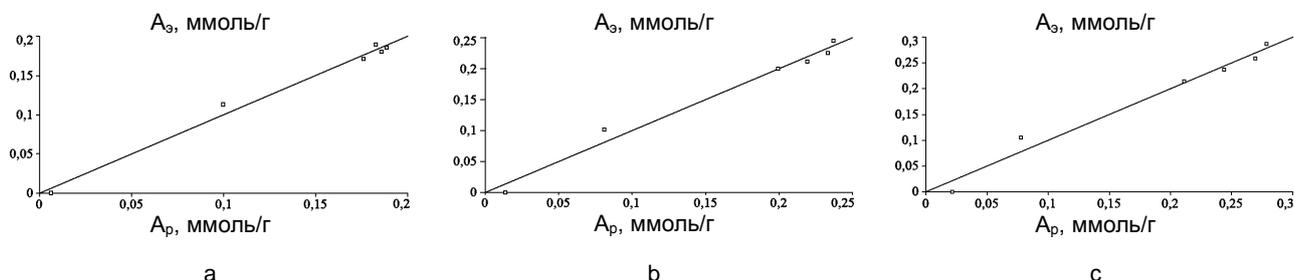


Рис. 5. Сравнение экспериментальных данных адсорбции A_e ионов никеля (II) окисленным углеродным сорбентом АД-05-2 с расчетными значениями A_p по модели: (5) – при 298 К (а); (6) – при 318 К (б); (7) – при 338 К (с)

Fig. 5. Comparison of experimental A_e adsorption data of nickel (II) ions by the oxidized carbon sorbent AD-05-2 with the calculated values of A_p according to the model: (5) – at 298 K (a); (6) – at 318 K (b); (7) – at 338 K (c)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследована адсорбция ионов никеля (II) окисленным углеродным сорбентом АД-05-2 и его исходным аналогом. Для обоих образцов время установления адсорбционного равновесия в системе адсорбат–адсорбент составило 4 ч, pH = 9,6, интервал исследуемых температур – 298–338 К.

Полученные экспериментальные данные по

адсорбции ионов никеля (II) обработаны в пакете программы Statgraphics Plus. Изотермы адсорбции описаны регрессионными моделями. Полученные модели регрессии могут быть использованы для расчета оптимальных параметров процесса адсорбции ионов никеля (II) из водных растворов и технологических сред с применением окисленного углеродного сорбента АД-05-2 и его исходного аналога.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nezamzadeh-Ejhieh A., Kabiri-Samani M. Effective removal of Ni (II) from aqueous solutions by modification of nano particles of clinoptilolite with dimethylglyoxime // *Journal of Hazardous Materials*. 2013. Vol. 260. P. 339–349. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.05.014>
2. Borba C.E., Guirardello R., Silva E.A., Veit M.T., Tavares C.R.G. Removal of nickel (II) ions from aqueous solution by biosorption in a fixed bed column: Experimental and theoretical breakthrough curves // *Biochemical Engineering Journal*. 2006. Vol. 30. Issue 2. P. 184–191. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.04.001>
3. Zawisza B., Sitko R., Malicka E., Talik E. Graphene oxide as a solid sorbent for the preconcentration of cobalt, nickel, copper, zinc and lead prior to determination by energy-dispersive X-ray fluorescence spectrometry // *Analytical Methods*. 2013. Vol. 5. Issue 22. P. 6425–6430. <https://doi.org/10.1039/c3ay41451e>
4. Zawisza B., Baranik A., Malicka E., Talik E., Sitko R. Preconcentration of Fe (III), Co (II), Ni (II), Cu (II), Zn (II) and Pb (II) with ethylenediamine-modified graphene oxide // *Microchimica Acta*. 2016. Vol. 183. Issue 1. P. 231–240. <https://doi.org/10.1007/s00604-015-1629-y>
5. Zhou Q., Xing A., Zhao K. Simultaneous determination of nickel, cobalt and mercury ions in water samples by solid phase extraction using multi-walled carbon nanotubes as adsorbent after chelating with sodium diethyldithiocarbamate prior to high performance liquid chromatography // *Journal of Chromatography A*. 2014. Vol. 1360. P. 76–81. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.07.084>
6. Amais R.S., Ribeiro J.S., Segatelli M.G., Yoshida I.V.P., Luccas P.O., Tarley C.R.T. Assessment of nanocomposite alumina supported on multi-wall carbon nanotubes as sorbent for on-line nickel preconcentration in water sample // *Separation and Purification Technology*. 2007. Vol. 58. Issue 1. P. 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2007.07.024>
7. Lu C., Liu C., Rao G.P. Comparisons of sorbent cost for the removal of Ni²⁺ from aqueous solution by carbon nanotubes and granular activated carbon // *Journal of Hazardous Materials*. 2008. Vol. 151. Issue 1. P. 239–246. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.05.078>
8. Di Natale F., Gargiulo V., Alfe M. Adsorption of

heavy metals on silica-supported hydrophilic carbonaceous nanoparticles (SHNPs) // *Journal of Hazardous Materials*. 2020. Vol. 393. Article number 122374. <https://doi.org/10.1016/j.hazmat.2020.122374>

9. Behbahani M., Bide Y., Bagheri S., Salarian M., Omidi F., Nabid M.R. A pH responsive nanogel composed of magnetite, silica and poly (4-vinylpyridine) for extraction of Cd (II), Cu (II), Ni (II) and Pb (II) // *Microchimica Acta*. 2016. Vol. 183. Issue 1. P. 111–121. <https://doi.org/10.1007/s00604-015-1603-8>

10. Behbahani M., Salarian M., Amini M.M., Sadeghi O., Bagheri A., Bagheri S. Application of a new functionalized nanoporous silica for simultaneous trace separation and determination of Cd (II), Cu (II), Ni (II), and Pb (II) in food and agricultural products // *Food Analytical Methods*. 2013. Vol. 6. Issue 5. P. 1320–1329. <https://doi.org/10.1007/s12161-012-9545-9>

11. Rao M., Parwate A.V., Bhole A.G. Removal of Cr (VI) and Ni (II) from aqueous solution using bagasse and fly ash // *Waste Management*. 2002. Vol. 22. Issue 7. P. 821–830. [https://doi.org/10.1016/S0956-053X\(02\)00011-9](https://doi.org/10.1016/S0956-053X(02)00011-9)

12. Hannachi Y., Shapovalov N.A., Hannachi A. Adsorption of nickel from aqueous solution by the use of low-cost adsorbents // *Korean Journal of Chemical Engineering*. 2010. Vol. 27. Issue 1. P. 152–158. <https://doi.org/10.1007/s11814-009-0303-7>

13. Тарковская И.А. Окисленный уголь. Киев: Наукова думка, 1981. 200 с.

14. Гурьева Р.Ф., Саввин С.Б. Спектрофотометрические методы определения благородных металлов // *Журнал аналитической химии*. 2002. Т. 57. N 11. С. 1158–1175.

15. Лурье Ю.Ю., Рыбникова А.И. Химический анализ производственных сточных вод. М: Химия. 1974. 336 с.

16. Дударева Г.Н., Иринчинова Н.В. Сорбционное извлечение никеля в хлораммонийной технологии переработки окисленных руд // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2016. Т. 6. N 2. С. 83–89. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2016-6-2-83-89>

17. Дударев В.И., Иринчинова Н.В., Филатова Е.Г. Адсорбция ионов никеля (II) из водных растворов углеродными адсорбентами // *Известия высших учебных заведений. Серия: Химия и химическая технология*. 2017. Т. 60. N 1. С. 75–80. <https://doi.org/10.6060/tcct.2017601.5455>

18. Dudareva G.N., Irinchinova N.V., Dudarev V.I., Petukhova G.A. Study of removal of nickel (II) from aqueous solutions by sorption // *Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces*. 2019. Vol. 55. Issue 5. P. 488–495. <https://doi.org/10.1134/S2070205119050071>

REFERENCES

1. Nezamzadeh-Ejehieh A, Kabiri-Samani M. Effective removal of Ni (II) from aqueous solutions by modification of nano particles of clinoptilolite with dimethylglyoxime. *Journal of Hazardous Materials*. 2013;260:339–349. <https://doi.org/10.1016/j.hazmat.2013.05.014>

2. Borba CE, Guirardello R, Silva EA, Veit MT, Tavares CRG. Removal of nickel (II) ions from aqueous solution by biosorption in a fixed bed column: Experimental and theoretical breakthrough curves. *Biochemical Engineering Journal*. 2006;30(2):184–191. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.04.001>

3. Zawisza B, Sitko R, Malicka E, Talik E. Graphene oxide as a solid sorbent for the preconcentration of cobalt, nickel, copper, zinc and lead prior to determination by energy-dispersive X-ray fluorescence spectrometry. *Analytical Methods*. 2013;5(22):6425–6430. <https://doi.org/10.1039/c3ay41451e>

4. Zawisza B, Baranik A, Malicka E, Talik E, Sitko R. Preconcentration of Fe (III), Co (II), Ni (II), Cu (II), Zn (II) and Pb (II) with ethylenediamine-modified graphene oxide. *Microchimica Acta*. 2016;183(1):231–240. <https://doi.org/10.1007/s00604-015-1629-y>

5. Zhou Q, Xing A, Zhao K. Simultaneous determination of nickel, cobalt and mercury ions in water samples by solid phase extraction using multiwalled carbon nanotubes as adsorbent after chelating with sodium diethyldithiocarbamate prior to high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2014;1360:76–81. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.07.084>

chroma2014.07.084

6. Amais RS, Ribeiro JS, Segatelli MG, Yoshida IVP, Luccas PO, Tarley CRT. Assessment of nanocomposite alumina supported on multi-wall carbon nanotubes as sorbent for on-line nickel preconcentration in water sample. *Separation and Purification Technology*. 2007;58(1):122–128. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2007.07.024>

7. Lu C, Liu C, Rao GP. Comparisons of sorbent cost for the removal of Ni²⁺ from aqueous solution by carbon nanotubes and granular activated carbon. *Journal of Hazardous Materials*. 2008;151(1):239–246. <https://doi.org/10.1016/j.hazmat.2007.05.078>

8. Di Natale F, Gargiulo V, Alfe M. Adsorption of heavy metals on silica-supported hydrophilic carbonaceous nanoparticles (SHNPs). *Journal of Hazardous Materials*. 2020;393. Article number 122374. <https://doi.org/10.1016/j.hazmat.2020.122374>

9. Behbahani M, Bide Y, Bagheri S, Salarian M, Omidi F, Nabid MR. A pH responsive nanogel composed of magnetite, silica and poly (4-vinylpyridine) for extraction of Cd (II), Cu (II), Ni (II) and Pb (II). *Microchimica Acta*. 2016;183(1):111–121. <https://doi.org/10.1007/s00604-015-1603-8>

10. Behbahani M, Salarian M, Amini MM, Sadeghi O, Bagheri A, Bagheri S. Application of a new functionalized nanoporous silica for simultaneous trace separation and determination of Cd (II), Cu (II), Ni (II), and Pb (II) in food and agricultural products. *Food Analytical Methods*. 2013;6(5):1320–

1329. <https://doi.org/10.1007/s12161-012-9545-9>

11. Rao M, Parwate AV, Bhole AG. Removal of Cr (VI) and Ni (II) from aqueous solution using bagasse and fly ash. *Waste Management*. 2002;22(7):821–830. [https://doi.org/10.1016/S0956-053X\(02\)00011-9](https://doi.org/10.1016/S0956-053X(02)00011-9)

12. Hannachi Y, Shapovalov NA, Hannachi A. Adsorption of nickel from aqueous solution by the use of low-cost adsorbents. *Korean Journal of Chemical Engineering*. 2010;27(1):152–158. <https://doi.org/10.1007/s11814-009-0303-7>

13. Tarkovskaya IA. *Oxidized coal*. Kiev: Naukova dumka; 1981. 200 p. (In Russian)

14. Gur'eva RF, Savvin SB. Spectrophotometric methods for the determination of noble metals. *Zhurnal analiticheskoi khimii = Journal of Analytical Chemistry*. 2002;57(11):1158–1175. (In Russian)

15. Lur'e YuYu, Rybnikova AI. *Chemical analysis of industrial wastewater*. Moscow: Khimiya; 1974. 336 p. (In Russian)

16. Dudareva GN, Irinchinova NV. Sorption extraction of nickel in chlorine-ammonium technology of oxidized ores processing. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2016(2):83–89. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2016-6-2-83-89>

17. Dudareva GN, Irinchinova NV. Adsorption of nickel (II) ions from aqueous solutions by carbon adsorbents. *Izvestiya vysshii uchebnykh zavedenii. Seriya: Khimiya i khimicheskaya tekhnologiya = Russian Journal of Chemistry and Chemical Technology*. 2017;60(1):75–80. (In Russian) <https://doi.org/10.6060/tcct.2017601.5455>

18. Dudareva GN, Irinchinova NV, Dudarev VI, Petukhova GA. Study of removal of nickel (II) from aqueous solutions by sorption. *Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces*. 2019;55(5):488–495. <https://doi.org/10.1134/S2070205119050071>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Иринчинова Надежда Владимировна,

аспирант,
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
e-mail: irnavl@mail.ru

Дударев Владимир Иванович,

д.т.н., профессор,
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
e-mail: vdudarev2@ex.istu.edu

Филатова Елена Геннадьевна,

к.т.н., доцент,
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
✉e-mail: efila@list.ru

Асламова Вера Сергеевна,

д.т.н., профессор,
Иркутский государственный университет
путей сообщения,
664074, г. Иркутск, ул. Чернышевского, 15,
Российская Федерация
e-mail: aslamovav@yandex.ru

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Nadejda V. Irinchinova,

Postgraduate Student,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
e-mail: irnavl@mail.ru

Vladimir I. Dudarev,

Dr Sci. (Engineering), Professor,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
e-mail: vdudarev2@ex.istu.edu

Elena G. Filatova,

Cand. Sci. (Engineering), Associate Professor,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
✉e-mail: efila@list.ru

Vera S. Aslamova,

Dr Sci. (Engineering), Professor,
Irkutsk State Transport University,
15, Chernyshevsky St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
e-mail: aslamovav@yandex.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.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

*Поступила в редакцию 03.12.2020.
Одобрена после рецензирования 30.01.2021.
Принята к публикации 30.08.2021.*

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 03.12.2020.
Approved after reviewing 30.01.2021.
Accepted for publication 30.08.2021.*

Обзорная статья / Review article

УДК 573.6; 581.6; 579.695

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-358-371>



Фототрофы в альтернативной энергетике

© М.С. Коновалов*, Е.Ю. Коновалова*, И.Н. Егорова**,
Г.О. Жданова*, Д.И. Стом*,****

*Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Российская Федерация

**Сибирский институт физиологии и биохимии растений, г. Иркутск, Российская Федерация

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

Резюме: В представленном обзоре рассматривается роль фототрофов в альтернативной энергетике, при этом основной упор сделан на одноклеточные водоросли. Особое внимание уделено применению фототрофов для генерации электроэнергии с использованием биотопливных элементов (обсуждаются растительные и ферментные биотопливные элементы). Главное место отведено микробным топливным элементам (МТЭ), которые наряду с электроэнергией позволяют получать биотопливо и биоводород. Рассматриваются факторы, ограничивающие мощность МТЭ, а также пути их преодоления. Так, например, для снижения убыли мощности МТЭ из-за перенапряжения представляется перспективной разработка различных фотобиореакторов. Использование микрофототрофов в МТЭ привело к разработке фотосинтетических МТЭ (или ФотоМТЭ) посредством конструирования автотрофных фотобиореакторов с принудительным освещением. Они дают возможность генерировать кислород за счет фотосинтеза как *in situ*, так и *ex situ*, рециркулируя кислород из фотобиореактора в катодную камеру. Здесь могут быть использованы искусственные редокс-медиаторы, переносящие электроны непосредственно с некаталитического катода на O_2 , образующийся в результате фотосинтезирующей активности водорослей. Показано, что биологически катализируемые катоды генерируют меньшую мощность по сравнению с химическими катализаторами. Отмечено, что установки МТЭ с микроводородными позволяют утилизировать широкий круг различных соединений – компонентов сточных вод и отходов: органические кислоты, сахара, спирты, жиры и другие субстраты. Особый раздел представляет использование фототрофов для производства биотоплива. Из микроводорослей можно получить несколько различных видов возобновляемого биотоплива, производство которого может быть объединено с очисткой сточных вод, улавливанием CO_2 , производством различных соединений.

Ключевые слова: фототрофы, микроводоросли, биоводород, биотопливные элементы, биотехнология, генерирование электрического тока

Благодарности: Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-18-50330 «Фототрофы в альтернативной энергетике».

Для цитирования: Коновалов М.С., Коновалова Е.Ю., Егорова И.Н., Жданова Г.О., Стом Д.И. Фототрофы в альтернативной энергетике. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2021. Т. 11. N 3. С. 358–371. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-358-371>

Phototrophs in alternative energy

Mikhail S. Konovalov*, Elena Yu. Konovalova*, Irina N. Egorova**,
Galina O. Zhdanova*, Devard I. Stom*,****

* Irkutsk State University, Irkutsk, Russian Federation

** Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Irkutsk, Russian Federation

*** Baikal Museum ISC, Listvyanka, Russian Federation

Abstract: The role of phototrophs is examined in alternative energy, with the main emphasis on unicellular algae. Particular attention is paid to the use of phototrophs for generating electricity using biofuel cells (plant and enzymatic biofuel cells are discussed). This study focuses on microbial fuel cells (MFC), which, along with electric power, allow obtaining biofuels and biohydrogen. This article explains the factors limiting the MFC power, and ways of overcoming them. For example, it seems promising to develop various photobioreactors in order to reduce the loss of MFC power due to overvoltage. The use of microphototrophs in MFC has led to the development of photosynthetic MFC (or PhotoMFC) through the design of autotrophic photobioreactors with forced illumination. They allow generating oxygen through photosynthesis, both *in situ* and *ex situ*, by recirculating oxygen from the photobioreactor to the cathode chamber. Artificial redox mediators

can be used here, transferring electrons directly from the non-catalytic cathode to O_2 , formed as a result of the photosynthetic activity of algae. Biologically catalyzed cathodes have been proven to generate less power than chemical catalysts. It is noted, that the MFC installations with the micro-algae allow utilizing a wider circle of different connections – the components of effluents and withdrawals: organic acids, sugar, alcohols, fats and other substrata. The use of phototrophs for the production of biofuels is of special interest. Several different types of renewable biofuels can be produced from microalgae, the production of which can be combined with wastewater treatment, CO_2 capture and production of various compounds.

Keywords: phototrophs, microalgae, biohydrogen, biofuel cells, biotechnology, electric current generation

Acknowledgement: The work was financially supported by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 20-18-50330 “Phototrophs in alternative energetics”).

For citation: Konovalov MS, Konovalova EYu, Egorova IN, Zhdanova GO, Stom DI. Phototrophs in alternative energy. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(3):358–371. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-358-371>

ВВЕДЕНИЕ

Человечество сегодня сталкивается со многими экологическими проблемами: загрязнение окружающей среды; глобальное потепление из-за накопления CO_2 в атмосфере; истощение природных источников энергии, таких как уголь и нефть, и растущая потребность в устойчивых источниках энергии. В последние годы особое внимание уделяется исследованиям в области возобновляемых источников энергии, в частности, биоэнергетики. Исследуются пути получения различных типов биотоплива (биодизель, биоводород), а также производство энергии организмами в специальных установках. Одним из перспективных источников энергии являются фототрофные организмы.

Микроводоросли – один из самых эффективных источников возобновляемой энергии. В них содержится до 50–70% белка, 30% липидов, более 40% глицерина, до 14% каротина и довольно высокая концентрация витаминов В1, В2, В3, В6, В12, Е, К, D и т. д. в сравнении с другими растениями или животными [1, 2]. В то же время водоросли способны усваивать атмосферный углекислый газ, что косвенно может привести к ослаблению проблемы глобального потепления. Микроводоросли являются важным сырьем для получения аминокислот, витаминов и ценных побочных продуктов. Содержание липидов в них находится в диапазоне 20–50%, что выше, чем у других культур. Из таких липидов производят биодизельное топливо, которое легко разлагается [3]. Микроводоросли способны расти с большой скоростью, достигающей показателей в 50 раз больше, чем у проса, которое является одной из самых быстрорастущих наземных культур. Также у них более высокая эффективность преобразования фотонов, что составляет примерно 3–8% против 0,5% для наземных растений. Микроводоросли являются отличным альтернативным топливным сырьем. В качестве среды для их культивирования возможно использовать сточные воды. Затраты на выращивание водорослей и их сбор для производства

биотоплива в таком случае покрываются функцией очистки сточных вод [4]. Как альтернативный, надежный и возобновляемый источник энергии важен биоводород, производимый микроводорослями, включая цианобактерии. Фотосинтетическое производство водорода может быть интересным и многообещающим вариантом получения чистой энергии. Достижения в технологии водородных топливных элементов свидетельствуют об экологически безопасном способе производства биотоплива, поскольку при использовании водорода для выработки электроэнергии в качестве побочного продукта выделяется только вода. Прогресс в генетической / метаболической инженерии значительно увеличивает фотобиологическое производство водорода из микроводорослей. Более того, биологическое производство водорода возможно при низких эксплуатационных расходах. Для крупномасштабного производства биомассы микроводорослей и водорода было разработано несколько фотобиореакторов [5]. Целью настоящего обзора является обобщение сведений об использовании фототрофов в альтернативной энергетике.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФОТОТРОФОВ ДЛЯ ГЕНЕРАЦИИ ЭЛЕКТРОЭНЕРГИИ

В области альтернативной энергетики проводятся исследования, направленные на использование способности микроводорослей превращать поглощенный CO_2 в потенциальную биомассу наряду с выработкой газообразного кислорода и интегрировать их в биотопливные элементы. Это устройства, в которых осуществляется превращение химической энергии различных веществ-субстратов (спиртов, углеводов и т.д.) в электрическую энергию за счет биологической трансформации.

Разработано множество видов биотопливных элементов – растительные, ферментные, микробные. Микробный топливный элемент (МТЭ) – это биологическая система, в которой отрыв электронов и их акцептирование пространственно

разделены. Соответственно МТЭ чаще всего имеет два блока: аэробный и анаэробный. Аэробная камера имеет положительно заряженный электрод и барботируется кислородом. В анаэробной камере нет кислорода, что позволяет отрицательно заряженному электроду действовать как рецептор электронов. В качестве субстрата или источника углерода в МТЭ используют сточную воду, различные углеводы (глюкоза, сахароза, крахмал), ацетат, аминокислоты, ароматические соединения (бензоат, толуол), масла, спирты, растворы минеральных солей и др. Схема работы классического варианта МТЭ приведена на рисунке.

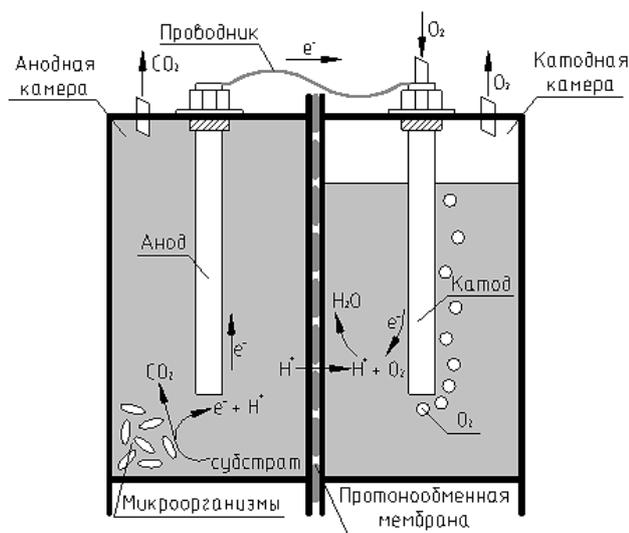


Схема работы микробного топливного элемента
Microbial fuel cell operation diagram

Мощность МТЭ зависит от многих факторов и ограничена, прежде всего, высоким внутренним (омическим) сопротивлением. Увеличения мощности можно достичь за счет добавления катализаторов. Этой же цели служит подбор оптимального расстояния между электродами, а также применение электродов из различных материалов. В работе Н. Liu показано, что при ионной силе раствора, равной 400 мМ, удельная мощность достигает величины 1330 мВт/м². В ячейках авторы использовали электроды из углеродного волокна с добавлением платины. Оптимальное расстояние между такими электродами составило 2 см [6]. Размер электродов также влияет на уровень производимой электроэнергии [7]. Улучшения в архитектуре МТЭ, вероятно, могут привести к увеличению выработки электроэнергии. Микроорганизмы, используемые в МТЭ, демонстрируют большое разнообразие. Т.Н. Pham с соавторами определяют такие микроорганизмы как «экзоэлектрогены» [8].

Использование микрофототрофов в МТЭ привело к разработке фотосинтетических микробных топливных элементов или ФотоМТЭ [9].

Основным недостатком применения микрофототрофов является необходимость создания автотрофных фотобиореакторов с принудительным освещением [5]. Гетеротрофный режим роста помогает устранить этот недостаток. Отметим, что некоторые водоросли в гетеротрофном режиме имеют более высокие темпы роста, биомассу, выработку АТФ, содержание азота и липидов, чем в автотрофном режиме. Однако только ограниченное число видов водорослей, используемых в биотехнологии, способны к гетеротрофному росту. Кроме того, энергетические затраты увеличиваются за счет дополнения органического субстрата, тем самым увеличивая шансы на ингибирование роста избыточным органическим субстратом и неспособностью производить метаболиты. Гетеротрофный режим культивирования более подвержен загрязнению и конкуренции со стороны других микроорганизмов.

D.F. Juang с соавторами в своем исследовании показали, что электрическая энергия может вырабатываться водорослями, растущими на катоде в МТЭ, где кислород продуцируется в процессе фотосинтеза [10]. Их идея нашла применение в МТЭ с использованием водорослевого биокатода, который действует как биологический акцептор электронов, одновременно поглощая CO₂ [11, 12]. Авторы сконструировали двухкамерный МТЭ. В катодную и анодную камеры инокулировали зеленую водоросль *Chlorella vulgaris*. В катодной камере водоросли выступали в основном как продуценты кислорода. Авторами показано, что микроводоросли в катодной камере в световую фазу поглощали CO₂, наращивая биомассу, а в темновую фазу потребляли кислород, получая энергию путем окисления ранее произведенного органического вещества. Выявлено, что производство электроэнергии не было постоянным, а зависело от концентрации кислорода и продолжительности освещения [11]. И наоборот, некоторые фотосинтетические цианобактерии могут работать как биоанодный катализатор, образование биопленки в котором поддерживает электрохимический потенциал. Так, например, в работе С.-С. Fu с соавторами упоминается, что *Spirulina platensis* может быть использована в качестве биоанодного катализатора. Она не нуждается в привнесенных в среду медиаторах для акцептирования генерируемого электрона [13].

В рассматриваемых исследованиях использовались в основном фотосинтезирующие виды цианобактерий, такие как представители рода *Anabaena* [14]. Виды *Synechocystis* и некоторые другие микроводоросли использовались в МТЭ с открытыми биореакторами [15]. Фотосинтезирующие водоросли *Chlorella* использовались с гетеротрофными бактериями в синергетической реакции при производстве электроэнергии [16]. Микроводоросли также были исследованы в ка-

честве биокатализатора для выработки энергии в микробных топливных элементах с такими медиаторами, как HNQ (гидроксид 1,4-нафтохинон) в качестве искусственного окислительно-восстановительного медиатора, перемещающего электрон от микроорганизма к аноду [17]. Точно так же выработка энергии была достигнута путем выращивания дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* для окисления глюкозы и микроводорослей *Spirulina platensis* и *Chlorella vulgaris* для генерации электронов в МТЭ [18]. В большинстве упомянутых исследований наблюдалось увеличение выработки электроэнергии в темное время суток. Однако производство водородными кислородами ограничивало выработку ими энергии во время светлых фаз.

В последнее время развивается технология фотосинтетического водородослевого микробного топливного элемента, инокулятом в котором выступают микроводоросли и электрохимически активные бактерии в открытой системе без добавления токсичных медиаторов, что является важным шагом [19]. Произведенная в биореакторе биомасса микроводорослей, образованная в результате фотосинтетического роста, может подаваться в МТЭ в качестве субстрата для выработки электроэнергии. Водоросли использовались в качестве анолита в МТЭ для производства электронов. Разработанные ФотоМТЭ требуют отдельного фотобиореактора для оптимального роста водорослей и менее сложной системы затемненного МТЭ, производящей электроэнергию. Однако существуют ограничения на утилизацию сложного органического вещества смешанным гетеротрофным бактериальным сообществом в МТЭ из-за низкой кулоновской эффективности. Поэтому разработка фотобиореактора с иммобилизованными цианобактериями для последовательного генерирования и разложения продуктов метаболизма с темным МТЭ для повышения кулоновской эффективности выглядит перспективной. Так, М. Otadi с соавторами продемонстрировали перспективность ФотоМТЭ для выработки электроэнергии [20]. S.B. Velasquez-Orta с соавторами разработали МТЭ, соединенный с фотобиореактором. Такой МТЭ показал производство постоянного тока на выходе 539 mA/m^2 за все время работы, равное 150 дням [21].

Производительность фотосинтетического МТЭ с использованием микро- и макроводорослей, таких как *Chlorella vulgaris* и *Ulva lactuca*, была оценена S. Mahesh с соавторами. Получена разница в рекуперации энергии на аноде МТЭ. *Ch. vulgaris* производит больше энергии с удельной мощностью (277 Вт/м^3), чем *U. lactuca* (215 Вт/м^3) [22]. Некоторые исследователи приложили значительные усилия для улучшения характеристик катодной системы путем увеличения уровня производства кислорода цианобакте-

риями, иммобилизованными в виде шариков [23] или без иммобилизации [10], а также прямого выращивания *Chlorella* на катоде [11, 12].

Возможность генерировать кислород посредством фотосинтеза как *in situ*, так и *ex situ*, рециркулируя раствор из фотобиореактора в катодную камеру ФотоМТЭ, показали В.Е. Logan с соавторами [24]. Целью этого являлось обеспечение терминального акцептора электронов кислородом без азрации. Эта концепция была выдвинута еще на очень ранней стадии развития биоэлектрохимических систем (БЭС). В ходе исследования ФотоМТЭ обеспечивался кислородом, продуцируемым водорослями, инокулированными в катодную камеру. В более поздних исследованиях водоросль *Chlorella vulgaris* выращивали на катоде и добавляли искусственный медиатор. Авторы работы [25] считают, что кислород играет очень важную роль в процессе переноса электронов. Используемый искусственный редокс-медиатор мог переносить электроны непосредственно с некаталитического катода на O_2 , образующийся в результате фотосинтезирующей активности водорослей. В другом исследовании *in situ* генерация O_2 в ФотоМТЭ с использованием смешанной культуры водорослей и бактерий была использована для реверса анода и катода в темновой и световой фазах соответственно. Вероятно, было бы целесообразно иметь небольшое количество O_2 в аноде, так как это обеспечило бы выгодные энергетические профили в микроаэробных условиях. Кроме того, как упоминалось ранее, фотосинтетический кислород, генерируемый бактериями на катоде поверх анаэробного осадка в течение световой фазы, может быть полезным в отношении текущей генерации в ФотоМТЭ осадочного типа [19]. Н.-М. Jiang с соавторами разработали безмембранный МТЭ. В предложенной ими конфигурации МТЭ соединялся с фотобиореактором, в котором культивировали микроводоросли. Перспективность установки состоит в том, что она может быть использована как для очистки сточных вод, так и для выработки электрической энергии и одновременной культивации микроводорослей. В МТЭ в сточных водах снижается ХПК, содержание фосфора и азота с одновременным производством электроэнергии. Затем сточные воды, выходящие из катодной камеры, поступают в фотобиореактор для уменьшения остатков фосфора и азота за счет их поглощения микроводорослями. Максимальная плотность мощности, полученная в этом случае, составила 481 МВт/м^2 , а удаления ХПК – 78%. Конфигурация с мембраной была способна производить электроэнергию с максимальной плотностью мощности 110 МВт/м^2 [26].

S. Pandit с соавторами в своей работе продемонстрировали снижение мощности МТЭ при использовании биологических катализаторов в

катодной камере против химических. В целом биологически катализируемые катоды генерируют меньшую мощность по сравнению с химическими катализаторами. Еще одной проблемой двухкамерных МТЭ, выявленной авторами, является защелачивание катодной камеры после длительной работы, в результате чего рабочее напряжение падает. Авторами высказана идея, что при должном регулировании подачи CO_2 , освещения и поступления питательных веществ к микроводорослям возможно повысить эффективность МТЭ [27]. Водоросли несут отрицательный заряд на своей поверхности и, следовательно, являются потенциальным адсорбентом поливалентных катионов, присутствующих в среде. Адсорбция поливалентных катионов на поверхности водорослей вызывает морфологические изменения или может заменить (заблокировать) простетические атомы металлов в активных центрах соответствующих ферментов, приводя, в частности, к ингибированию фотосинтеза. Интенсивность света на глубине плотной взвеси водорослей значительно снижается из-за поглощения и рассеяния света. Ослабление интенсивности света зависит от длины его волны, глубины проникновения, от концентрации клеток и геометрии фотокатода [28].

В последние годы исследователи обращают внимание на фиксацию CO_2 с помощью фотосинтеза в сочетании с гетеротрофным производством электроэнергии. В соленых и пресноводных отложениях про- и эукариотические водоросли и некоторые бактерии, такие как цианобактерии, способны поставлять органическое вещество (например, выделяемые полисахариды) гетеротрофным бактериям посредством фотосинтеза. Подобным образом поддерживаются синергетические сообщества в таких экосистемах, как микробные маты [29]. Известно множество разработок, включающих ФотоМТЭ либо микробные фотоэлектрические солнечные элементы, либо фотосинтетические микробные топливные элементы, либо фотосинтетическую электрохимическую ячейку и др. [30]. Предполагается, что в МТЭ с использованием солнечного излучения вырабатывается больше электроэнергии, чем без него. Среди фоточувствительных материалов одним из первых в фотокатодных МТЭ был использован диоксид титана (TiO_2 , рутил). Свойство диоксида титана поглощать УФ-свет широко используется в солнцезащитных продуктах. При использовании в МТЭ графитового электрода, покрытого диоксидом титана, мощность элемента увеличилась в 1,57 раза, а выработка достигла $12,03 \text{ Вт/м}^3$ [31]. В двухкамерном МТЭ с водорослевым фотокатодом и мембраной Nafion электрическая мощность ($0,108 \text{ мВт/см}^2$) была относительно близкой к мощности, генерируемой Pt/C-электродом в тем-

ноте ($0,123 \text{ мВт/см}^2$) [32]. То, что можно производить более высокую электрическую мощность, было также показано при использовании ФотоМТЭ для очистки сточных вод с комбинацией анодов из TiO_2 , которая обеспечивала $1284 \pm 20 \text{ мВт/м}^2$ [33].

Авторами работы [34] в ФотоМТЭ осадочного типа (пресноводный осадок) был исследован синергетический комплекс водорослей и бактерий для выработки электроэнергии. ФотоМТЭ при содержании микробного сообщества под освещением вырабатывал ток непрерывно. Подобно ранним исследованиям, выработка электроэнергии в этом случае также показала обратную связь с освещением: величина тока увеличивалась при отсутствии света и уменьшалась при его наличии. Авторами показано, что производство тока уменьшается при непрерывном освещении вследствие накопления кислорода. Исследования также проводились с использованием в ФотоМТЭ осадочного типа морской микробиоты, микробного анода и катода [34]. Фотосинтезирующие микроорганизмы в таком МТЭ вырабатывают O_2 для восстановления катодом и органическое вещество, которое используется в качестве источника углерода в аноде в анаэробном осадке. За счет этого образуется самоподдерживающаяся синергетическая биоэлектрохимическая система, потребляющая свет и производящая электричество. В данном исследовании наблюдалась светозависимая генерация тока, поскольку система зависела от производства O_2 .

Так как кислород является универсальным акцептором электронов, в процессе фотосинтеза водорослей он может поглощать электроны во время метаболизма, тем самым снижая эффективность МТЭ [35]. J. Lobato с соавторами использовали фотосинтез водорослей в качестве источника кислорода в катодной камере двухкамерного ФотоМТЭ [36]. В исследовании M.A. Rodrigo с соавторами МТЭ состоял из двух камер, разделенных ионообменной мембраной. Инокулятом для анодного отсека выступал активный ил станции очистки сточных вод. Анодный отсек во время работы укрывался светонепроницаемым материалом, чтобы исключить свет и тем самым избежать роста водорослей [37]. В то же время катодный отсек содержал культуру микроводорослей, которая освещалась в течение 12 ч. Анодофильные бактерии производили CO_2 , который переносился в катодный отсек и мог быть использован микроводорослями в процессе фотосинтеза для производства биомассы. Перенос осуществлялся через вентиляционное отверстие в верхней части каждой камеры, соединенное трубкой с воронкообразным газосборником, расположенным со стороны анода для упрощения передачи газа в катодную камеру [38].

В МТЭ используются представители различных родов водорослей – *Chlorella*, *Synechocystis*,

Microcystis и др. Так, например, в исследовании K.S. Aiyer с соавторами в катодной камере присутствовала зеленая водоросль *Chlorella vulgaris*, в анодной – гетеротрофные бактерии *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*. При этом удалось достичь удельной мощности 248 мВт/м^2 , тогда как МТЭ только с культурами *E. coli* и *P. aeruginosa* выработал $190,44 \text{ мВт/м}^2$ [16]. Фотосинтетическая биопленка, состоящая из зеленых водорослей и гетеротрофных бактерий, также использовалась в МТЭ для производства энергии [39]. Y. Zou с соавторами использовали в МТЭ биопленку, полученную путем культивирования водорослей из донных осадков пресноводного водоема. Для сравнения использовали ячейку, в анодную камеру которой поместили биопленку из чистой культуры пресноводной цианобактерии *Synechocystis*. Первый МТЭ достиг максимума в производстве электроэнергии (до $1,5 \text{ мВт/м}^2$) через 20–30 мин после начала освещения биопленки. При этом МТЭ с чистой культурой *Synechocystis* достиг меньшего показателя мощности – $1,47 \text{ мВт/м}^2$. В своем исследовании авторы сконструировали однокамерный МТЭ. Анодная камера представляла собой сосуд с нанесенными на дно четыремя слоями углеродной краски или одним слоем углеродной ткани. Катод состоял из углеродной ткани с платиновым катализатором и располагался над анодной камерой [40]. По мнению I. Gajda с соавторами, фотосинтезирующие микроорганизмы работают аналогичным образом, как и бактерии во время генерации электроэнергии в МТЭ, отдавая электроны на электрод. В разработанном двухкамерном МТЭ учеными вместо барботажа, медиаторов, буферов, питательной среды и платинового катализатора были использованы биокаталитические свойства естественных фотосинтетических консорциумов, что сводило эксплуатационные расходы к минимуму. Инокулятом для катодной камеры и источником образования фототрофной биопленки служила предварительно подготовленная вода из пресноводного водоема. Культивация культуры водорослей проводилась не в отдельном биореакторе, а непосредственно в катодной камере МТЭ. В анодную камеру инокулировали анаэробный активный ил. Материал электродов – углеродная ткань. Максимальный результат, которого удалось достичь, – 7 мВт/м^2 . Авторы предполагают, что биокатод также действовал как сборщик фотосинтетического углекислого газа, поскольку во время темной фазы генерация электроэнергии подавляется и дыхание происходит за счет активности фотосинтезирующих организмов и гетеротрофных бактерий [41]. Известна работа, в которой авторы сосредоточились на модификации анода в ФотоМТЭ [42]. Ячейки состояли из цилиндрической камеры, в которую помещали анод из керамики с покрытием оксидом олова, легированного

фтором, стекла с покрытием оксидом олова, углеродной ткани или углеродного войлока. Биопленка *Chlorella vulgaris* культивировалась непосредственно в порах керамического электрода. Сравнение МТЭ с различными типами электродов показало, что удельная мощность на керамическом аноде была в 16 раз выше, чем на аноде из углеродного волокна, составив в максимуме $3,4 \text{ мВт/см}^2$

R. Lakshmidēvi с соавторами провели исследование возможности производства электроэнергии и биологически активных соединений в МТЭ. В качестве инокулята в анодной камере использовали бактериальный штамм *Enterobacter aerogenes*. Субстратом в аноде выступали сточные воды от молочного производства. В катодную камеру инокулировали цианобактерию *Nostoc sp.* в объеме 5% от общего объема синтетической среды. Электродами выступали углеродные пластины. Анодную камеру обернули алюминиевой фольгой для защиты от проникновения света и создания условий для брожения в темноте. Отвод углекислого газа от процесса брожения в катодную камеру осуществили с помощью силиконовой трубки. Максимальный результат МТЭ по выработке энергии составил $168 \pm 3,5 \text{ мВт/м}^2$. При этом продуктивность ячейки в образовании биомассы *Nostoc sp.* была в пределах 95 мг/л в сутки. Из биомассы водорослей получали экстракт, который проверяли на антимикробные свойства. Выявлено, что экстракт подавляет развитие патогенных бактерий *Escherichia coli*, *Streptococcus iniae*, *Citrobacter freundii*, *Vibrio alginolyticus*. Наибольший антимикробный эффект наблюдался в культуре *Citrobacter freundii* [43].

Сульфат натрия – самая распространенная соль сульфата, оказывающая благоприятное действие на содержание хлорофилла в пресноводных микроводорослях, кинетику их роста, плотность клеток, тем самым активно поддерживая некоторые биологические процессы. Однако высокие концентрации (более 1 г/л) сульфата натрия будут оказывать неблагоприятное воздействие не только на рост водорослей, но и на процесс фотосинтеза за счет снижения уровня хлорофилла в клетках. Так, было показано, что при внесении в анолит МТЭ сульфата натрия происходит снижение концентрации кислорода в анодной камере [21, 35, 44]. Согласно работе Z. Не с соавторами [45], существует мутуалистическая связь между микроводорослями и гетеротрофными бактериями. В процессе выработки электроэнергии, учитывая значительное расстояние между анодом и фотосинтезирующими организмами, бактерии могут производить электричество из органических соединений. Эти сложные микробные сообщества также могут препятствовать процессу выработки электроэнергии. Показано, что при увеличении интенсивности освещения фотосинтезирующих мик-

роорганизмов не происходит ожидаемого увеличения напряжения тока. A.G. del Campo с соавторами [11] создали топливный элемент из микроводорослей, используя *C. vulgaris* в катодной камере и сточные воды от производства фруктовых соков – в анодной камере. Генерацию энергии изучали в присутствии и в отсутствие света. В исследовании было показано, что высокая плотность энергии наблюдалась даже в отсутствие света. Факторами, которые могут изменять мощность ячейки МТЭ, могут быть электрическое сопротивление электролита и его проводимость [46].

Комбинация технологии МТЭ с фотобиореактором на основе водоросли рода *Chlorella* может снизить выбросы парниковых газов от очистных сооружений, улавливая CO₂, выбрасываемый промышленными объектами, или непосредственно из атмосферы. Производство микроводорослей может улучшить восстановление ресурсов, содержащихся в сточных водах. Показана эффективность систем МТЭ–фотобиореактор с использованием как модельных, так и агропромышленных сточных вод в качестве субстрата. Система, оснащенная биокатодом микроводорослей, доказала свою способность эффективно очищать реальные сточные воды [47].

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФОТОТРОФОВ ДЛЯ ПРОДУЦИРОВАНИЯ БИОВОДОРОДА

Важным направлением исследований в области альтернативной энергетики является разработка способов получения биоводорода. Наиболее распространенные микроводоросли, способные производить в процессе своего метаболизма водород, – это *Scenedesmus*, *Chlamydomonas*, *Anabaena*, *Synechococcus*. Среди бактерий это представители родов *Rhodobacter*, *Rubrivivax*, *Rhodovulum*, а также многие другие. Азотфиксирующая цианобактерия *Anabaena cylindrica* одновременно производит водород и кислород в атмосфере аргона в течение нескольких часов. Производство водорода происходит при нормальных атмосферных условиях, но гораздо медленнее, чем азотфиксация. Производство водорода можно увеличить путем снижения содержания в среде азота. *Scenedesmus* производит водород при воздействии света после содержания в темноте в анаэробных условиях. Эта зеленая водоросль выполняет биофототрофиз с использованием гидрогеназы для восстановления воды до водорода [48, 49].

Общая идея использования генерирующих водород фотосинтетических бактерий наряду с загруженным катализатором анодом заключается в производстве биоводорода такими бактериями с последующим окислением водорода *in situ* на электрокаталитической поверхности анода [50]. В исследовании с участием зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* было обнаружено, что удаление водорода *in situ* (поддерж-

ние парциального давления водорода очень низким) полезно для увеличения производства водорода. Установлено, что депривация водорода в среде с *C. reinhardtii* стимулирует получение водорода путем биофототрофиза на свету с использованием фотосинтетического пути [51]. В культуре водоросли *Chlorella*, где депривация серы не применима из-за богатого сульфатами субстрата, был оценен эффект дефицита фосфора. Депривация фосфора смогла установить анаэробный метаболизм с устойчивой фотопродукцией водорода [52]. Также были протестированы менее распространенные элементы, такие как магний. Клетки *Chlamydomonas reinhardtii*, лишенные магния, демонстрировали производство водорода в течение более длительного времени, чем те же клетки в случае лишения серы. Этот эффект может зависеть от меньшей значимости магния для клеточной активности по сравнению с серой [53].

Было замечено, что производство водорода может быть увеличено до 60% по сравнению с системами, основанными на монокультуре *Chlamydomonas reinhardtii*, за счет использования систем совместного культивирования с бактерией *Escherichia coli*. Питательные среды, богатые глюкозой, используются бактериями, производящими уксусную кислоту, которая может быть использована в метаболизме водорослей [54]. Синергетически различные фотобиологические и ферментативные микробные метаболизмы могут взаимодействовать, увеличивая выход водорода [55]. В работе S.A. Markov с соавторами для генерации водорода использовался фотобиореактор на основе полых волокон. На поверхность волокон помещали культуру цианобактерии *Anabaena variabilis*. Производительность такого фотобиореактора составила 57 мл H₂ в час на 1 л раствора [56].

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФОТОТРОФОВ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА БИОТОПЛИВА

Из микроводорослей можно получить несколько различных видов возобновляемого биотоплива. К ним относятся биодизель из липидов микроводорослей и фотобиологически произведенный биоводород. Производство такого биотоплива может быть объединено с очисткой сточных вод, улавливанием CO₂, производством различных химикатов и выработкой электрической энергии [57]. В большинстве исследований для производства биодизеля используют зеленые микроводоросли. Вероятно, это связано не с более высоким содержанием липидов в зеленых водорослях, чем в других таксонах водорослей, а скорее с тем, что многие зеленые водоросли легко изолируются из различных мест обитания и растут быстрее, чем виды из других таксономических групп. В отличие от высших растений водоросли демонстрируют большие различия в

составе жирных кислот, что тоже влияет на выбор оптимального таксона [58]. Например, F. Ahmad с соавторами для производства биодизеля использовали смешанную культуру – *Chlorella vulgaris* и *Rhizoclonium hieroglyphicum* [59]. Эти водоросли были выбраны авторами по причине высокого содержания липидов. Некоторые основные представители фототрофных организмов, применяемые в производстве биотоплива, приведены в таблице.

Выращивание микроводорослей для последующей переработки в биотопливо осуществля-

ется в специализированных прудах, фотобиореакторах и ферментерах [64]. Выгода использования микроводорослей для производства биодизеля очевидна: после извлечения липидов биомассу водорослей можно применять в качестве органического удобрения, так как в ней высоко содержание калия и азота. В зависимости от вида микроводорослей из биомассы могут быть получены полиненасыщенные жирные кислоты, сахара, пигменты, каротиноиды, биологически активные соединения [65].

Некоторые представители фототрофов, используемые при получении биодизеля и биоводорода

Some representatives of phototrophs used in biodiesel and biohydrogen production

Организм	Субстрат	Вид топлива	Страна	Источник
<i>Chlorella protothecoides</i>	Среда, обогащенная железом	Биодизель	Португалия, Иран	[57, 60]
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Среда, обогащенная железом	Биодизель	Португалия	[57]
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	Среда с глюкозой, дрожжевым экстрактом и морской солью	Биодизель	Португалия	[57]
<i>Euglena gracilis</i>	Минеральная питательная среда	Биодизель	Португалия	[57]
<i>Chlorella vulgaris</i>	Сточные воды	Биодизель	Пакистан, Иран, Словакия	[59, 60, 61]
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Среда, обогащенная ацетатом	Биоводород	Россия, Алжир, Италия	[50, 51, 62]
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Среда, обогащенная ацетатом	Биоводород	Алжир	[62]
<i>Anabaena azollae</i>	Среда с нитрогеназой	Биоводород	Россия	[63]

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Все большее место в биотехнологических исследованиях занимают фототрофы, в частности, микроводоросли. Перспективы их использования достаточно широки в биотехнологическом плане (производство витаминов, биотоплива и многое др.). В то же время показана эффективность использования различных представителей микроводорослей для выработки электроэнергии непосредственно в МТЭ или же опосредованно при совмещении МТЭ и фотобиореактора. При этом установки МТЭ с микроводорослями позволяют утилизировать широкий круг различных соединений – компонентов сточных вод и отхо-

дов: органические кислоты, сахара, спирты, жиры и другие субстраты. Однако существуют и ограничения по применению микроводорослей в МТЭ: в процессе фотосинтеза микроводоросли производят значительное количество кислорода, что может снижать эффективность выработки электроэнергии или метаболитов, например, водорода. Исследования в области применения микроводорослей в МТЭ и фотобиореакторах необходимо продолжать, так как глобальные проблемы истощения невозобновляемых топливно-энергетических ресурсов и загрязнения окружающей среды становятся все острее.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Skjånes K., Rebours C., Lindblad P. Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process // *Critical Reviews in Biotechnology*. 2013. Vol. 33. Issue 2. P. 172–215. <https://doi.org/10.3109/07388551.2012.681625>
2. Vershinin A. Biological functions of carotenoids-diversity and evolution // *Biofactors*. 1999. Vol. 10. Issue 2-3. P. 99–104. <https://doi.org/10.1002/biof.5520100203>
3. Chisti Y. Biodiesel from microalgae // *Biotechnology Advances*. 2007. Vol. 25. Issue 3. P. 294–306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>
4. Ullah K., Ahmad M., Sharma V.K., Lu P., Harvey A., Zafar M., et al. Algal biomass as a global source of transport fuels: Overview and development perspectives // *Progress in Natural Science: Materials International*. 2014. Vol. 24. Issue 4. P. 329–339. <https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2014.06.008>
5. Olivieri G., Salatino P., Marzocchella A. Advances in photobioreactors for intensive microalgal production: Configurations, operating strategies and applications // *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2013. Vol. 89. Issue 2. P. 178–195. <https://doi.org/10.1002/jctb.4218>
6. Liu H., Cheng S., Logan B.E. Power generation in fed-batch microbial fuel cells as a function of ionic strength, temperature, and reactor configuration // *Environmental Science & Technology*. 2005. Vol. 39. Issue 14. P. 5488–5493. <https://doi.org/10.1021/es050316c>

7. Oh S.E., Min B., Logan B.E. Cathode performance as a factor in electricity generation in microbial fuel cells // *Environmental Science & Technology*. 2004. Vol. 38. Issue 18. P. 4900–4904. <https://doi.org/10.1021/es049422p>
8. Pham T.H., Jang J.K., Chang I.S., Kim B.H. Improvement of cathode reaction of a mediator-less microbial fuel cell // *Journal of Microbial Biotechnology*. 2004. Vol. 14. Issue 2. P. 324–329.
9. Yagishita T., Sawayama S., Tsukahara K.-I., Ogi T. Effects of intensity of incident light and concentrations of *Synechococcus* sp. and 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone on the current output of photosynthetic electrochemical cell // *Solar Energy*. 1997. Vol. 61. Issue 5. P. 347–353. [https://doi.org/10.1016/S0038-092X\(97\)00069-8](https://doi.org/10.1016/S0038-092X(97)00069-8)
10. Juang D.F., Lee C.H., Hsueh S.C. Comparison of electrogenic capabilities of microbial fuel cell with different light power on algae grown cathode // *Bioresource Technology*. 2012. Vol. 123. P. 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.041>
11. Del Campo A.G., Cañizares P., Rodrigo M.A., Fernández F.J., Lobato J. Microbial fuel cell with an algae-assisted cathode: A preliminary assessment // *Journal of Power Sources*. 2013. Vol. 242. P. 638–645. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2013.05.110>
12. Singh S.P., Singh P. Effect of CO₂ concentration on algal growth: A review // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2014. Vol. 38. P. 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.05.043>
13. Fu C.-C., Hung T.-C., Wu W.-T., Wen T.-C., Su C.-H. Current and voltage responses in instant photosynthetic microbial cells with *Spirulina platensis* // *Biochemical Engineering Journal*. 2010. Vol. 52. Issues 2–3. P. 175–180. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.08.004>
14. Meirong M., Xiaoju Sh., Limin C., Zongwu D. The operation of photosynthetic microbial fuel cells powered by *Anabaena variabilis*. In: *Proceedings of 2013 International Conference on Materials for Renewable Energy and Environment*. 2013. P. 968–972. <https://doi.org/10.1109/ICMREE.2013.6893833>
15. Cao Y., Mu H., Liu W., Zhang R., Guo J., Xian M., Liu H. Electricigens in the anode of microbial fuel cells: pure cultures versus mixed communities // *Microbial Cell Factories*. 2019. Vol. 18. Issue 1. Article number 39. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1087-z>
16. Aiyer K.S. Synergistic effects in a microbial fuel cell between co-cultures and a photosynthetic alga *Chlorella vulgaris* improve performance // *Heliyon*. 2021. Vol. 7. Issue 1. e05935. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e05935>
17. Mao L., Verwoerd W.S. Genome-scale stoichiometry analysis to elucidate the innate capability of the cyanobacterium *Synechocystis* for electricity generation // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2013. Vol. 40. Issue 10. P. 1161–1180. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1308-0>
18. Hadiyanto H., Christwardana M., Minasheila T., Wijaya Y.H. Effects of Yeast Concentration and Microalgal Species on Improving the Performance of Microalgal-Microbial Fuel Cells (MMFCs) // *International Energy Journal*. 2020. Vol. 20. Issue 3. P. 337–344. <http://www.ericjournal.ait.ac.th/index.php/eric/article/view/2337>
19. Strik D.P.B.T.B., Hamelers H.V.M., Buisman C.J.N. Solar energy powered microbial fuel cell with a reversible bioelectrode // *Environmental Science & Technology*. 2010. Vol. 44. Issue 1. P. 532–537. <https://doi.org/10.1021/es902435v>
20. Otadi M., Poormohamadian S., Zabihi F., Goharrokhi M. Microbial fuel cell production with alga // *World Applied Sciences Journal*. 2011. Vol. 14. P. 91–95.
21. Velasquez-Orta S.B., Curtis T.P., Logan B.E. Energy from algae using microbial fuel cells // *Biotechnology and Bioengineering*. 2009. Vol. 103. Issue 6. P. 1068–1076. <https://doi.org/10.1002/bit.22346>
22. Mahesh S., Tadesse D., Melkamu A. Evaluation of photosynthetic microbial fuel cell for bioelectricity production // *Indian Journal of Energy*. 2013. Vol. 2. Issue 4. P. 116–120.
23. Yadav A.K., Panda P., Rout P., Behara S., Patra A.K., Nayak S.K., et al. Entrapment of algae for waste water treatment and bioelectricity generation in microbial fuel cell. In: *Proceedings of XVIIth International Conference on Bioencapsulation*. 2009. P. 24–26.
24. Logan B.E. *Microbial Fuel Cells*. Wiley, 2008. 216 p. <https://doi.org/10.1002/9780470258590>
25. Powell E.E., Mapiour M.L., Evitts R.W., Hill G.A. Growth kinetics of *Chlorella vulgaris* and its use as a cathodic half-cell // *Bioresource Technology*. 2009. Vol. 100. Issue 1. P. 269–274. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.032>
26. Jiang H.-M., Luo S.-Ju., Shi X.-S., Dai M., Guo R.-B. A system combining microbial fuel cell with photobioreactor for continuous domestic wastewater treatment and bioelectricity generation // *Journal of Central South University*. 2013. Vol. 20. Issue 2. P. 488–494. <https://doi.org/10.1007/s11771-013-1510-2>
27. Pandit S., Ghosh S., Ghangrekar M., Das D. Performance of an anion exchange membrane in association with cathodic parameters in a dual chamber microbial fuel cell // *International Journal of Hydrogen Energy*. 2012. Vol. 37. Issue 11. P. 9383–9392. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.03.011>
28. Lan J.C.-W., Raman K., Huang Ch.-M., Chang Ch.-M. The impact of monochromatic blue and red LED light upon performance of photo microbial fuel cells (PMFCs) using *Chlamydomonas reinhardtii* transformation F5 as biocatalyst // *Biochemical Engineering Journal*. 2013. Vol. 78. P. 39–43. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.02.007>
29. Strik D.P.B.T.B., Hamelers (Bert) H.V.M., Snel J.F.H., Buisman C.J.N. Green electricity production with living plants and bacteria in a fuel cell // *International Journal of Energy Research*. 2008. Vol. 32. Issue 9. P. 870–876. <https://doi.org/10.1002/er.1397>
30. Greenman J., Gajda I., Ieropoulos I. Microbial fuel cells (MFC) and microalgae; photo microbial fuel cell (PMFC) as complete recycling machines // *Sustainable Energy & Fuels*. 2019. Vol. 3. Issue 10. P. 2546–2560. <https://doi.org/10.1039/C9SE00354A>

31. Lu A., Li Y., Jin S., Ding H., Zeng C., Wang X., et al. Microbial fuel cell Equipped with a photocatalytic rutile-coated cathode // *Energy & Fuels*. 2010. Vol. 24. Issue 2. P. 1184–1190. <https://doi.org/10.1021/ef901053j>
32. Wang S., Yang X., Zhu Yi., Sua Yu., Li C. Solar-assisted dual chamber microbial fuel cell with a CuInS_2 photocathode. // *RSC Advances*. 2014. Vol. 4. Issue 45. P. 23790–23796. <https://doi.org/10.1039/C4RA02488e>
33. Kim H.-W., Lee K.-S., Razzaq A., Lee S.H., Grimes C.A., In S.-I. Photocoupled bioanode: A new approach for Improved microbial fuel cell performance // *Energy Technology*. 2017. Vol. 6. Issue 2. P. 257–262. <https://doi.org/10.1002/ente.201700465>
34. Kaku N., Yonezawa N., Kodama Yu., Watanabe K. Plant/microbe cooperation for electricity generation in a rice paddy field // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008. Vol. 79. Issue 1. P. 43–49. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1410-9>
35. Lee D.-J., Chang J.-S., Lai J.-Y. Microalgae-microbial fuel cell: A mini review // *Bioresource Technology*. 2015. Vol. 198. P. 891–895. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.061>
36. Lobato J., del Campo A.G., Fernández F.J., Cañizares P., Rodrigo M.A. Lagooning microbial fuel cells: A first approach by coupling electricity-producing microorganisms and algae // *Applied Energy*. 2013. Vol. 110. P. 220–226. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.04.010>
37. Rodrigo M.A., Cañizares P., García H., Linares J.J., Lobato J. Study of the acclimation stage and of the effect of the biodegradability on the performance of a microbial fuel cell // *Bioresource Technology*. 2009. Vol. 100. Issue 20. P. 4704–4710. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.04.073>
38. Wang X., Feng Yu., Liu J., Lee H., Li C., Li N., et al. Sequestration of CO_2 discharged from anode by algal cathode in microbial carbon capture cells (MCCs) // *Biosensors and Bioelectronics*. 2010. Vol. 25. Issue 12. P. 2639–2643. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.04.036>
39. Nishio K., Hashimoto K., Watanabe K. Light/electricity conversion by a self-organized photosynthetic biofilm in a single-chamber reactor // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010. Vol. 86. Issue 3. P. 957–964. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2400-2>
40. Zou Y., Pisciotta J., Billymyre R.B., Baskakov I.V. Photosynthetic microbial fuel cells with positive light response // *Biotechnology and Bioengineering*. 2009. Vol. 104. Issue 5. P. 939–946. <https://doi.org/10.1002/bit.22466>
41. Gajda I., Greenman J., Melhuish C., Ieropoulos I. Photosynthetic cathodes for Microbial Fuel Cells // *International Journal of Hydrogen Energy*. 2013. Vol. 38. Issue 26. P. 11559–11564. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.02.111>
42. Thorne R., Hu H., Schneider K., Bombelli P., Fisher A., Peter L.M., et al. Porous ceramic anode materials for photo-microbial fuel cells // *Journal of Materials Chemistry*. 2011. Vol. 21. Issue 44. P. 18055–18060. <https://doi.org/10.1039/C1JM13058G>
43. Lakshmidevi R., Gandhi N.N., Muthukumar K. Bioelectricity and bioactive compound production in an algal-assisted microbial fuel cell with immobilized bioanode // *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2020. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00916-6>
44. Kondaveeti S., Mohanakrishna G., Lee J.-K., Kalia V.C. Methane as a substrate for energy generation using microbial fuel cells // *Indian Journal of Microbiology*. 2019. Vol. 59. Issue 1. P. 121–124. <https://doi.org/10.1007/s12088-018-0765-6>
45. He Z., Kan J., Mansfeld F., Angenent L.T., Neals K.H. Self-sustained phototrophic microbial fuel cells based on the synergistic cooperation between photosynthetic microorganisms and heterotrophic bacteria // *Environmental Science & Technology*. 2009. Vol. 43. Issue 5. P. 1648–1654. <https://doi.org/10.1021/es803084a>
46. Xu C., Poon K., Choi M.M.F., Wang R. Using live algae at the anode of a microbial fuel cell to generate electricity // *Environmental Science and Pollution Research*. 2015. Vol. 22. Issue 20. P. 15621–15635. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4744-8>
47. Bolognesi S., Ceconet D., Callegari A., Capodaglio A.G. Combined microalgal photobioreactor/microbial fuel cell system: Performance analysis under different process conditions // *Environmental Research*. 2021. Vol. 12. Issue 7. P. 110263. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110263>
48. Dasgupta C.N., Gilbert J.J., Lindblad P., Heidorn T., Borgvang S.A., Skjånes K., et al. Recent trends on the development of photobiological processes and photobioreactors for the improvement of hydrogen production // *International Journal of Hydrogen Energy*. 2010. Vol. 35. Issue 19. P. 10218–10238. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.06.029>
49. Dubini A., Ghirardi M.L. Engineering photosynthetic organisms for the production of biohydrogen // *Photosynthesis Research*. 2015. Vol. 123. Issue 3. P. 241–253. <https://doi.org/10.1007/s11120-014-9991-x>
50. Limongi A.R., Viviano E., de Luca M., Radice R.P., Bianco G., Martelli G. Biohydrogen from microalgae: production and applications // *Applied Sciences*. 2021. Vol. 11. Issue 4. P. 1616. <https://doi.org/10.3390/app11041616>
51. Philipps G., Happe T., Hemschemeier A. Nitrogen deprivation results in photosynthetic hydrogen production in *Chlamydomonas reinhardtii* // *Planta*. 2012. Vol. 235. Issue 4. P. 729–745. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1537-2>
52. Batyrova K., Gavrisheva A., Ivanova E., Liu J., Tsygankov A. Sustainable hydrogen photoproduction by phosphorus-deprived marine green microalgae *Chlorella* sp. // *International Journal of Molecular Sciences*. 2015. Vol. 16. Issue 2. P. 2705–2716. <https://doi.org/10.3390/ijms16022705>
53. Volgusheva A.A., Jokel M., Allahverdiyeva Y., Kukarskikh G.P., Lukashev E.P., Lambrev M.D., et al. Comparative analyses of H_2 photoproduction in magnesium- and sulfur-starved *Chlamydomonas reinhardtii* cultures // *Physiologia Plantarum*. 2017. Vol. 161. Issue 1. P. 124–137. <https://doi.org/10.1111/ppl.12576>

54. Fakhimi N., Dubini A., Tavakoli O., González-Ballester D. Acetic acid is key for synergetic hydrogen production in *Chlamydomonas*-bacteria co-cultures // *Bioresource Technology*. 2019. Vol. 289. 121648. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121648>

55. Fakhimi N., Gonzalez-Ballester D., Fernández E., Galván A., Dubini A. Algae-Bacteria Consortia as a Strategy to Enhance H₂ Production // *Cells*. 2020. Vol. 9. Issue 6. 1353. <https://doi.org/10.3390/cells9061353>

56. Markov S.A., Protasov E.S., Bybin V.A., Eivazova E.R., Stom D.I. Using immobilized cyanobacteria and culture medium contaminated with ammonium for H₂ production in a hollow-fiber photobioreactor // *International Journal of Hydrogen Energy*. 2015. Vol. 40. Issue 14. P. 4752–4757. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.02.053>

57. Mata T.M., Martins A.A., Caetano N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2010. Vol.14. Issue 1. P. 217–232. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>

58. Avagyan A.B., Singh B. Biodiesel from Algae. In: *Biodiesel: Feedstocks, Technologies, Economics and Barriers*. Springer, 2019. P.77–112.

59. Farooq A., Khan A.U., Yasar A. Transesterification of oil extracted from different species of algae for biodiesel production // *African Journal of Environmental Science and Technology*. 2013. Vol. 7. Issue 6. P. 358–364. <https://doi.org/10.5897/AJEST12.167>

60. Mohammadi M., Azizollahi-Aliabadi M. Biodiesel production from microalgae // *Journal of Biology*

and Today's World. 2013. Vol. 2 Issue 2. P. 38–42. <https://doi.org/10.15412/J.JBTW.01020204>

61. Blinová L., Bartošová A., Gerulová K. Cultivation of microalgae (*Chlorella vulgaris*) for biodiesel production // *Research Papers Faculty of Materials Science and Technology Slovak University of Technology*. 2015. Vol. 23. Issue 36. P. 87–95. <https://doi.org/10.1515/rput-2015-0010>

62. Chader S, Hacene H., Agathos S.N. Study of hydrogen production by three strains of *Chlorella* isolated from the soil in the Algerian Sahara // *International Journal of Hydrogen Energy*. 2009. Vol. 34. Issue 11. P. 4941–4946. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.10.058>

63. Tsygankov A.A., Hall D.O., Liu J., Rao K.K. An automated helical photo bioreactor incorporating cyanobacteria for continuous hydrogen production. In: *Zaborsky O.R. (ed.) Biohydrogen*. London: Plenum Press, 1998. P. 431–440. https://doi.org/10.1007/978-0-585-35132-2_52

64. Barros A.I., Gonçalves A.L., Simões M., Pires J.C.M. Harvesting techniques applied to microalgae: A review // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2015. Vol. 41. P. 1489–1500. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.09.037>

65. Atabani A.E., Silitonga A.S., Badruddin I.A., Mahlia T.M.I., Masjuki H.H., Mekhilef S. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2012. Vol. 16. Issue 4. P. 2070–2093. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.01.003>

REFERENCES

1. Skjånes K, Rebours C, Lindblad P. Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2013;33(2): 172–215. <https://doi.org/10.3109/07388551.2012.681625>

2. Vershinin A. Biological functions of carotenoids-diversity and evolution. *Biofactors*. 1999;10(2-3):99–104. <https://doi.org/10.1002/biof.5520100203>

3. Chisti Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. 2007;25(3):294–306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>

4. Ullah K, Ahmad M, Sharma VK, Lu P, Harvey A, Zafar M, et al. Algal biomass as a global source of transport fuels: Overview and development perspectives. *Progress in Natural Science: Materials International*. 2014;24(4):329–339. <https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2014.06.008>

5. Olivieri G, Salatino P, Marzocchella A. Advances in photobioreactors for intensive microalgal production: Configurations, operating strategies and applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2013;89(2):178–195. <https://doi.org/10.1002/jctb.4218>

6. Liu H, Cheng S, Logan BE. Power generation in fed-batch microbial fuel cells as a function of ionic strength, temperature, and reactor configuration. *Environmental Science & Technology*. 2005;39(14):5488–5493. <https://doi.org/10.1021/es050316c>

7. Oh SE, Min B, Logan BE. Cathode performance as a factor in electricity generation in microbial fuel cells. *Environmental Science & Technology*. 2004;38(18):4900–4904. <https://doi.org/10.1021/es049422p>

8. Pham TH, Jang JK, Chang IS, Kim BH. Improvement of cathode reaction of a mediator-less microbial fuel cell. *Journal of Microbial Biotechnology*. 2004;14(2):324–329.

9. Yagishita T, Sawayama S, Tsukahara K-I, Ogi T. Effects of intensity of incident light and concentrations of *Synechococcus* sp. and 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone on the current output of photosynthetic electrochemical cell. *Solar Energy*. 1997;61(5):347–353. [https://doi.org/10.1016/S0038-092X\(97\)00069-8](https://doi.org/10.1016/S0038-092X(97)00069-8)

10. Juang DF, Lee CH, Hsueh SC. Comparison of electrogenic capabilities of microbial fuel cell with different light power on algae grown cathode. *Bioresource Technology*. 2012;123:23–29. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.041>

11. Del Campo AG, Cañizares P, Rodrigo MA, Fernández FJ, Lobato J. Microbial fuel cell with an algae-assisted cathode: A preliminary assessment. *Journal of Power Sources*. 2013;242:638–645. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2013.05.110>

12. Singh SP, Singh P. Effect of CO₂ concentration on algal growth: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2014;38:172–179. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.05.043>

13. Fu C-C, Hung T-C, Wu W-T, Wen T-C, Su C-H. Current and voltage responses in instant photosynthetic microbial cells with *Spirulina platensis*. *Biochemical Engineering Journal*. 2010;52(2-3):175–180. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.08.004>
14. Meirong M, Xiaoju Sh, Limin C, Zongwu D. The operation of photosynthetic microbial fuel cells powered by *Anabaena variabilis*. In: *Proceedings of 2013 International Conference on Materials for Renewable Energy and Environment*. 2013, p. 968–972. <https://doi.org/10.1109/ICMREE.2013.6893833>
15. Cao Y, Mu H, Liu W, Zhang R, Guo J, Xian M, Liu H. Electricigens in the anode of microbial fuel cells: pure cultures versus mixed communities. *Microbial Cell Factories*. 2019;18(1). Article number 39. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1087-z>
16. Aiyer KS. Synergistic effects in a microbial fuel cell between co-cultures and a photosynthetic alga *Chlorella vulgaris* improve performance. *Heliyon*. 2021;7(1):e05935. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e05935>
17. Mao L, Verwoerd WS. Genome-scale stoichiometry analysis to elucidate the innate capability of the cyanobacterium *Synechocystis* for electricity generation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2013;40(10):1161–1180. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1308-0>
18. Hadiyanto H, Christwardana M, Minasheila T, Wijaya YH. Effects of Yeast Concentration and Microalgal Species on Improving the Performance of Microalgal-Microbial Fuel Cells (MMFCs). *International Energy Journal*. 2020;20(3):337–344. <http://www.reric-journal.ait.ac.th/index.php/reric/article/view/2337>
19. Strik DPBTB, Hamelers HVM, Buisman CJN. Solar energy powered microbial fuel cell with a reversible bioelectrode. *Environmental Science & Technology*. 2010;44(1):532–537. <https://doi.org/10.1021/es902435v>
20. Otadi M, Poormohamadian S, Zabihi F, Goharrokhi M. Microbial fuel cell production with alga. *World Applied Sciences Journal*. 2011;14:91–95.
21. Velasquez-Orta SB, Curtis TP, Logan BE. Energy from algae using microbial fuel cells. *Biotechnology and Bioengineering*. 2009;103(6):1068–1076. <https://doi.org/10.1002/bit.22346>
22. Mahesh S, Tadesse D, Melkamu A. Evaluation of photosynthetic microbial fuel cell for bioelectricity production. *Indian Journal of Energy*. 2013;2(4):116–120.
23. Yadav AK, Panda P, Rout P, Behara S, Patra AK, Nayak SK, et al. Entrapment of algae for waste water treatment and bioelectricity generation in microbial fuel cell. In: *Proceedings of XVIIth International Conference on Bioencapsulation*. 2009, p. 24–26.
24. Logan BE. *Microbial Fuel Cells*. John Wiley & Sons; 2008. 216 p. <https://doi.org/10.1002/9780470258590>
25. Powell EE, Mapiour ML, Evitts RW, Hill GA. Growth kinetics of *Chlorella vulgaris* and its use as a cathodic half-cell. *Bioresource Technology*. 2009;100(1):269–274. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.032>
26. Jiang H-M, Luo S-Ju, Shi X-S, Dai M, Guo R-B. A system combining microbial fuel cell with photobioreactor for continuous domestic wastewater treatment and bioelectricity generation. *Journal of Central South University*. 2013;20(2):488–494. <https://doi.org/10.1007/s11771-013-1510-2>
27. Pandit S, Ghosh S, Ghangrekar M, Das D. Performance of an anion exchange membrane in association with cathodic parameters in a dual chamber microbial fuel cell. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2012;37(11):9383–9392. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.03.011>
28. Lan JC-W, Raman K, Huang Ch-M, Chang Ch-M. The impact of monochromatic blue and red LED light upon performance of photo microbial fuel cells (PMFCs) using *Chlamydomonas reinhardtii* transformation F5 as biocatalyst. *Biochemical Engineering Journal*. 2013;78:39–43. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.02.007>
29. Strik DPBTB, Hamelers (Bert) HVM, Snel JFH, Buisman CJN. Green electricity production with living plants and bacteria in a fuel cell. *International Journal of Energy Research*. 2008;32(9):870–876. <https://doi.org/10.1002/er.1397>
30. Greenman J, Gajda I, Ieropoulos I. Microbial Fuel Cells (MFC) and microalgae; Photo Microbial Fuel Cell (PMFC) as complete recycling machines. *Sustainable Energy & Fuels*. 2019;3(10):2546–2560. <https://doi.org/10.1039/C9SE00354A>
31. Lu A, Li Y, Jin S, Ding H, Zeng C, Wang X, et al. Microbial fuel cell equipped with a photocatalytic rutile-coated cathode. *Energy & Fuels*. 2010;24(2):1184–1190. <https://doi.org/10.1021/ef901053j>
32. Wang S, Yang X, Zhu Yi, Sua Yu, Li C. Solar-assisted dual chamber microbial fuel cell with a CuInS_2 photocathode. *RSC Advances*. 2014;4(45):23790–23796. <https://doi.org/10.1039/C4RA02488e>
33. Kim H-W, Lee K-S, Razzaq A, Lee SH, Grimes CA, In S-I. Photocoupled bioanode: A new approach for improved microbial fuel cell performance. *Energy Technology*. 2017;6(2):57–262. <https://doi.org/10.1002/ente.201700465>
34. Kaku N, Yonezawa N, Kodama Yu, Watanabe K. Plant/microbe cooperation for electricity generation in a rice paddy field. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008;79(1):43–49. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1410-9>
35. Lee D-J, Chang J-S, Lai J-Y. Microalgae-microbial fuel cell: A mini review. *Bioresource Technology*. 2015;198:891–895. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.061>
36. Lobato J, del Campo AG, Fernández FJ, Cañizares P, Rodrigo MA. Lagooning microbial fuel cells: A first approach by coupling electricity-producing microorganisms and algae. *Applied Energy*. 2013;110:220–226. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.04.010>
37. Rodrigo MA, Cañizares P, García H, Linares JJ, Lobato J. Study of the acclimation stage and of the effect of the biodegradability on the performance of a microbial fuel cell. *Bioresource Technology*. 2009;100(20):4704–4710. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.04.073>
38. Wang X, Feng Yu, Liu J, Lee H, Li C, Li N, et al. Sequestration of CO_2 discharged from anode by algal

- cathode in microbial carbon capture cells (MCCs). *Biosensors and Bioelectronics*. 2010;25(12):2639–2643. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.04.036>
39. Nishio K, Hashimoto K, Watanabe K. Light/electricity conversion by a self-organized photosynthetic biofilm in a single-chamber reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010;86(3):957–964. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2400-2>
40. Zou Y, Pisciotta J, Billmyre RB, Baskakov IV. Photosynthetic microbial fuel cells with positive light response. *Biotechnology and Bioengineering*. 2009;104(5):939–946. <https://doi.org/10.1002/bit.22466>
41. Gajda I, Greenman J, Melhuish C, Ieropoulos I. Photosynthetic cathodes for Microbial Fuel Cells. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2013;38(26):11559–11564. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.02.111>
42. Thorne R, Hu H, Schneider K, Bombelli P, Fisher A, Peter LM, et al. Porous ceramic anode materials for photo-microbial fuel cells. *Journal of Materials Chemistry*. 2011;21(44):18055–18060. <https://doi.org/10.1039/C1JM13058G>
43. Lakshmi Devi R, Gandhi NN, Muthukumar K. Bioelectricity and bioactive compound production in an algal-assisted microbial fuel cell with immobilized bioanode. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2020. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00916-6>
44. Kondaveeti S, Mohanakrishna G, Lee J-K, Kalva VC. Methane as a substrate for energy generation using microbial fuel cells. *Indian Journal of Microbiology*. 2019;59(1):121–124. <https://doi.org/10.1007/s12088-018-0765-6>
45. He Z, Kan J, Mansfeld F, Angenent LT, Nealson KH. Self-sustained phototrophic microbial fuel cells based on the synergistic cooperation between photosynthetic microorganisms and heterotrophic bacteria. *Environmental Science & Technology*. 2009;43(5):1648–1654. <https://doi.org/10.1021/es803084a>
46. Xu C, Poon K, Choi MMF, Wang R. Using live algae at the anode of a microbial fuel cell to generate electricity. *Environmental Science and Pollution Research*. 2015;22(20):15621–15635. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4744-8>
47. Bolognesi S, Cecconet D, Callegari A, Capodaglio AG. Combined microalgal photobioreactor/microbial fuel cell system: Performance analysis under different process conditions. *Environmental Research*. 2021;12(7): 110263. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110263>
48. Dasgupta CN, Gilbert JJ, Lindblad P, Heidom T, Borgvang SA, Skjånes K, et al. Recent trends on the development of photobiological processes and photobioreactors for the improvement of hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2010;35(19):10218–10238. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.06.029>
49. Dubini A, Ghirardi ML. Engineering photosynthetic organisms for the production of biohydrogen. *Photosynthesis Research*. 2015;123(3):241–253. <https://doi.org/10.1007/s11120-014-9991-x>
50. Limongi AR, Viviano E, de Luca M, Radice RP, Bianco G, Martelli G. Biohydrogen from microalgae: production and applications. *Applied Sciences*. 2021;11(4):1616. <https://doi.org/10.3390/app11041616>
51. Philipps G, Happe T, Hemschemeier A. Nitrogen deprivation results in photosynthetic hydrogen production in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta*. 2012;235(4):729–745. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1537-2>
52. Batyrova K, Gavrisheva A, Ivanova E, Liu J, Tsygankov A. Sustainable hydrogen photoproduction by phosphorus-deprived marine green microalgae *Chlorella* sp. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(2):2705–2716. <https://doi.org/10.3390/ijms16022705>
53. Volgusheva AA, Jokel M, Allahverdiyeva Y, Kukarskikh GP, Lukashev EP, Lambreva MD, et al. Comparative analyses of H₂ photoproduction in magnesium- and sulfur-starved *Chlamydomonas reinhardtii* cultures. *Physiologia Plantarum*. 2017;161(1):124–137. <https://doi.org/10.1111/pp1.12576>
54. Fakhimi N, Dubini A, Tavakoli O, González-Ballester D. Acetic acid is key for synergetic hydrogen production in *Chlamydomonas*-bacteria co-cultures. *Bioresource Technology*. 2019;289: 121648. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121648>
55. Fakhimi N, Gonzalez-Ballester D, Fernández E, Galván A, Dubini A. Algae-Bacteria Consortia as a Strategy to Enhance H₂ Production. *Cells*. 2020;9(6):1353. <https://doi.org/10.3390/cells9061353>
56. Markov SA, Protasov ES, Bybin VA, Eivazova ER, Stom DI. Using immobilized cyanobacteria and culture medium contaminated with ammonium for H₂ production in a hollow-fiber photobioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2015;40(14):4752–4757. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.02.053>
57. Mata TM, Martins AA, Caetano NS. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2010;14(1):217–232. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>
58. Avagyan AB, Singh B. Biodiesel from Algae. In: *Biodiesel: Feedstocks, Technologies, Economics and Barriers*. Springer; 2019, p.77–112.
59. Farooq A, Khan AU, Yasar A. Transesterification of oil extracted from different species of algae for biodiesel production. *African Journal of Environmental Science and Technology*. 2013;7(6):358–364. <https://doi.org/10.5897/AJEST12.167>
60. Mohammadi M, Azizollahi-Aliabadi M. Biodiesel production from microalgae. *Journal of Biology and Today's World*. 2013;2(2):38–42. <https://doi.org/10.15412/J.JBTW.01020204>
61. Blinová L, Bartošová A, Gerulová K. Cultivation of microalgae (*Chlorella vulgaris*) for biodiesel production. *Research Papers Faculty of Materials Science and Technology Slovak University of Technology*. 2015;23(36):87–95. <https://doi.org/10.1515/rput-2015-0010>
62. Samira C, Hacene H, Agathos SN. Study of hydrogen production by three strains of *Chlorella* isolated from the soil in the Algerian Sahara. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2009;34(11):4941–4946. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.10.058>
63. Tsygankov AA, Hall DO, Liu J, Rao KK. An au-

tomated helical photo bioreactor incorporating cyanobacteria for continuous hydrogen production. In: Zaborovsky OR (ed.) *Biohydrogen*. London: Plenum Press; 1998, p. 431–440. https://doi.org/10.1007/978-0-585-35132-2_52

64. Barros AI, Gonçalves AL, Simões M, Pires JCM. Harvesting techniques applied to microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2015;41:1489–1500. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.09.037>

2015;41:1489–1500. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.09.037>

65. Atabani AE, Silitonga AS, Badruddin IA, Mahlia TMI, Masjuki HH, Mekhilef S. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2012;16(4):2070–2093. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.01.003>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Коновалов Михаил Сергеевич,
научный сотрудник,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
✉ e-mail: mikkonovalev@yandex.ru

Коновалова Елена Юрьевна,
научный сотрудник,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
e-mail: elenka_kvasya@list.ru

Егорова Ирина Николаевна,
к.б.н., старший научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии и биохимии
растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
e-mail: egorova@sifibr.irk.ru

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

Стом Дэвард Иосифович,
д.б.н., профессор,
заведующий лабораторией водной
токсикологии,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация;
главный научный сотрудник,
Байкальский музей Иркутского научного центра,
664520, п. Листвянка, ул. Академическая, 1,
Российская Федерация,
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 09.03.2021.
Одобрена после рецензирования 15.08.2021.
Принята к публикации 30.08.2021.*

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Mikhail S. Konovalev,
Researcher,
Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
✉ e-mail: mikkonovalev@yandex.ru

Elena Yu. Konovalova,
Researcher,
Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
e-mail: elenka_kvasya@list.ru

Irina N. Egorova,
Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
e-mail: egorova@sifibr.irk.ru

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

Devard I. Stom,
Dr. Sci. (Biology), Professor,
Head of the laboratory of Aquatic Toxicology
Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
Chief Researcher,
Baikal Museum ISC,
1, Academicheskaya St., Listvyanka, 664520,
Russian Federation,
e-mail: stomd@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 ap-
proved by all the co-authors.*

*The article was submitted 09.03.2021.
Approved after reviewing 15.08.2021.
Accepted for publication 30.08.2021.*

Обзорная статья / Review article

УДК 502.55:622.276.5 + 575.112:004

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-372-383>



Возможности использования информационных ресурсов в биоремедиации

© Э.В. Бабынин^{*,**}, И.А. Дегтярева^{*,***}

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

**Татарский научно-исследовательский институт агрохимии и почвоведения,
г. Казань, Российская Федерация

***Казанский национальный исследовательский технологический университет,
г. Казань, Российская Федерация

Резюме: Биоремедиация с использованием микроорганизмов имеет ряд преимуществ по сравнению с физико-химическими методами очистки вод, грунтов и атмосферы. Микроорганизмы обладают широким спектром метаболических возможностей, благодаря которым они способны преобразовывать, модифицировать и утилизировать токсичные загрязнители для получения энергии и производства биомассы. Показано их участие в разложении различных промышленных отходов, таких как красители, углеводороды, хлорированные ароматические соединения, пестициды и другие. Хотя использование микроорганизмов является экологически чистым и перспективным способом решения экологических угроз, на эффективность биоремедиации влияют многие факторы, такие как химическая природа загрязнителей, их доступность для микроорганизмов, физико-химические характеристики окружающей среды, а также взаимодействие самих организмов-деструкторов друг с другом. Сегодня очень важен поиск новых эффективных штаммов или создание супердеструкторов методами геномной и белковой инженерии. Эта задача может быть решена путем привлечения таких «инструментов», как геномика, протеомика, транскриптомика, метаболомика. Эти технологии требуют интеграции огромного количества данных, что невозможно обеспечить без использования биоинформатики. Биоинформатика применяется в микробной биоремедиации разными способами: анализ данных секвенирования генома, идентификация кодирующих белки генов, сравнительный анализ для идентификации функции неизвестных генов, автоматическая реконструкция и сравнение метаболических путей, а также исследование белок-белок и белок-ДНК взаимодействий для понимания регуляторных механизмов. Данный обзор направлен на освещение различных ресурсов, хранящих информацию о возможных путях микробного метаболизма, участвующих в биодеградациии нефтепродуктов. Использование подобных информационных ресурсов может стать отправной точкой для многих исследований в биоремедиации.

Ключевые слова: микроорганизмы-деструкторы, углеводороды, метаболизм, биоремедиация, биоинформатика, базы данных

Для цитирования: Бабынин Э.В., Дегтярева И.А. Возможности использования информационных ресурсов в биоремедиации. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т. 11. N 3. С. 372–383. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-372-383>

Possibilities of using information resources In bioremediation

Edward V. Babynin^{*,**}, Irina A. Degtyareva^{*,***}

*Kazan Federal University, Kazan, Russian Federation;

** Tatar Research Institute of Agrochemistry and Soil Science,
Kazan, Russian Federation

***Kazan National Research Technological University,
Kazan, Russian Federation

Abstract: Bioremediation using microorganisms has a number of advantages over physical and chemical methods of water, soil and atmosphere purification. Microorganisms have a wide range of metabolic capabilities that enable them to convert, modify and utilize toxic pollutants for energy and biomass production. This article shows their participation in the decomposition of various industrial wastes, such as dyes, hydrocarbons, chlorinated aromatic compounds and pesticides, among others. Although the use of microorganisms is an environmentally friendly and promising way of solving environmental threats, many factors affect the ef-

fectiveness of bioremediation, such as the chemical nature of pollutants, their accessibility to microorganisms, the physical and chemical characteristics of the environment, as well as the interaction of the destructive organisms with each other. The search for new effective strains or the creation of superdestructors using genetic and protein engineering methods proves to be crucial under current circumstances. This task can be solved using such "tools" as genomics, proteomics, transcriptomics and metabolomics. These technologies require the integration of a huge amount of data, which cannot be achieved without the use of bioinformatics. Bioinformatics is used in microbial bioremediation in different ways: analysis of genome sequencing data, identification of protein-coding genes, comparative analysis to identify the function of unknown genes, automatic reconstruction and comparison of metabolic pathways, and study of protein–protein and protein–DNA interactions to understand regulatory mechanisms. This review aims to highlight various resources that store information about possible pathways of microbial metabolism involved in the biodegradation of petroleum products. The use of such information resources can become a starting point for many studies in bioremediation.

Keywords: *microorganisms-destructors, hydrocarbons, metabolism, bioremediation, bioinformatics, databases*

For citation: Babynin EV, Degtyareva IA. Possibilities of using information resources in bioremediation. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2021;11(3):372–383. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-372-383>

ВВЕДЕНИЕ

Сокращение природных ресурсов, увеличение загрязнений, выбросов углерода и другие проблемы, связанные с результатами индустриализации, являются катастрофическими для всех регионов мира. Миллионы токсичных химических веществ ежедневно синтезируются для использования в различных отраслях промышленности и, так или иначе, попадают в окружающую среду, создавая серьезные проблемы живым организмам [1–4]. Большинство из этих веществ, являясь мутагенными и канцерогенными, медленно разрушаются и накапливаются в почве, воде в течение длительного времени [5–7]. По этим причинам разработка методов удаления токсичных химических веществ из загрязненных районов с каждым годом приобретает все большее значение [8, 9].

Лучшими кандидатами для устранения большей части загрязняющих веществ из окружающей среды для включения элементов разложения в естественный биогеохимический цикл считаются микроорганизмы [10, 11]. Они выработали широкий спектр аэробных и анаэробных катаболических стратегий для деградации огромного количества органических соединений, присутствующих в экосистемах, которые колонизируют [12, 13]. Биоремедиация с использованием микроорганизмов имеет ряд преимуществ (безопасность, экологичность и др.) перед физико-химическими методами ремедиации, однако, не всегда оказывается успешной [14]. Причинами неудач можно считать отсутствие полной информации о процессах метаболической деградации ксенобиотиков каждым конкретным микроорганизмом, интерференцию между эндогенными метаболическими путями, а также стресс-ответы и изменения в общей физиологии клеток-хозяев по-

сле воздействия токсичных субстратов и их промежуточных метаболитов [15, 16].

В последние десятилетия для изучения процессов биodeградации все активнее применяются подходы, основанные на омиксных технологиях, а именно, геномику, протеомику, транскриптомику и метаболомику, которые дают четкую и более достоверную картину процессов, происходящих в организме [17, 18] (рис. 1). Методы секвенирования следующего поколения можно использовать для эффективного сравнения биоразнообразия загрязненных углеводородами почв, а также указать организмы, которые могут играть важную роль в биоремедиации [19, 20].

С накоплением огромного количества данных, полученных в результате подобных исследований, возникает проблема их обработки, систематизации и сохранения. Биоинформационные технологии способствуют сбору исчерпывающих биологических данных о микроорганизмах, имеющих значение в биоремедиации, и их клеточных метаболических путях [21–23]. Поэтому биоинформатика стала незаменимым инструментом в современных исследованиях, предлагая алгоритмы и статистические методы для классификации, интерпретации и понимания наборов биологических данных.

Подходы *in silico* применяются во многих областях – от создания новых лекарств до геной инженерии, филогеномики и белковой инженерии [24–27]. Биоинформационные инструменты – это программы, предназначенные для извлечения значимой информации из множества баз данных молекулярной биологии и анализа последовательностей ДНК или структур белка. Существуют как стандартные, так и специализированные продукты, отвечающие требованиям конкретных проектов.

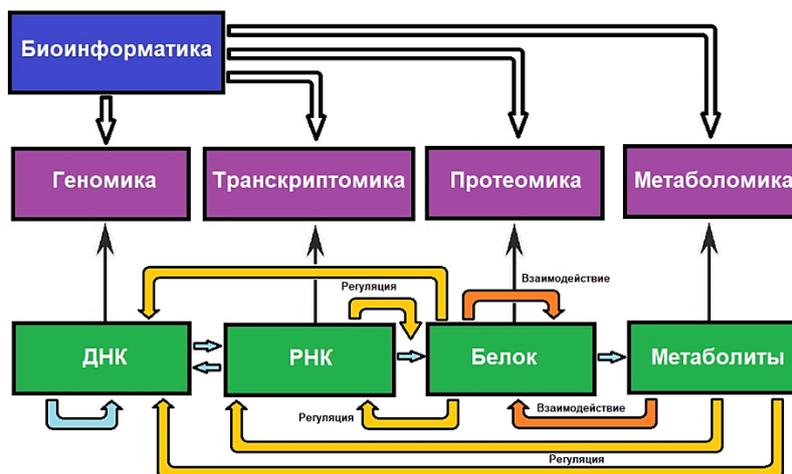


Рис. 1. Связь биологических «-омик» с биоинформатикой

Fig. 1. Relationship between the biological "-omics" and bioinformatics

Также биоинформатика предлагает ряд инструментов для решения вопросов, касающихся участия молекулярных механизмов в путях биодegradации загрязняющих веществ микроорганизмами, и помогает понять биохимические изменения, происходящие внутри микроорганизма в процессе биоремедиации. К ним относятся, например, базы данных [28], системы прогнозирования химической токсичности [29] и системы прогнозирования путей биодegradации [30–33]. В настоящей работе мы знакомим читателя с различными биоинформационными ресурсами, которые могут быть использованы в биоремедиации.

Интернет-ресурсы для реконструкции метаболических путей. Реконструкция метаболических путей требует идентификации всех компонентов, участвующих в метаболизме организма, связывая метаболические и геномные данные [34, 35]. Поэтому анализ и аннотирование геномных последовательностей, хранение и извлечение информации о метаболической сети и представление сетевых данных являются клю-

чевыми задачами, связанными с реконструкцией метаболической сети. Масштаб сетевых реконструкций может варьировать от отдельных путей до целых геномов. Размер сети и качество информации аннотации являются важными факторами, которые влияют на тщательность реконструкции.

Существует несколько доступных баз данных, которые предоставляют информацию о метаболических путях микроорганизмов (таблица). Компьютерные средства могут предоставить пользователю соответствующую информацию о физико-химических свойствах целевого соединения и основных строительных блоках катаболического пути – ферментов и метаболитов [36]. Метаболическая модель в масштабе генома может использоваться для автоматической реконструкции метаболических сетей для процессов биоремедиации [37–39]. Биоинформационное моделирование помогает даже в прогнозировании микробных фенотипов по их генотипам [40].

Интернет-ресурсы, используемые для реконструкции метаболических путей микроорганизмов, имеющих значение в биоремедиации

Internet resources used for reconstruction of metabolic pathways of microorganisms those are important in bioremediation

База данных	Интернет-ресурс
Киотская энциклопедия генов и геномов (KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)	https://www.genome.jp/kegg/
Базы данных путей и геномов BioCyc	http://biocyc.org/
Метаболическая энциклопедия MetaCyc	http://metacyc.org
База данных Университета Миннесоты по биокатализу/биодegradации	http://eawag-bbd.ethz.ch/
База данных по генам биодegradации и синтеза биосурфактантов BioSurfDB	http://www.biosurfdb.org
База данных прогнозирования путей биоразложения химических соединений MetaRouter	http://pdg.cnb.uam.es/biodeg_net/MetaRouter
База путей биотрансформации загрязнителей окружающей среды envPath	https://envipath.org
От метаболита к метаболиту	http://fmm.mbc.nctu.edu.tw

Ксенобиотики включаются в метаболические процессы, выступая в качестве основного источника углерода и энергии для микробной клетки, либо превращаются в промежуточные метаболиты, влияющие на другие процессы обмена веществ. Для обеспечения информации о химических веществах и их биодegradации разработано несколько специализированных баз данных, которые хранят информацию о бактериях, способных к деградации ксенобиотиков, метаболических путях деградации токсичных химических веществ, а также информацию о ферментах и генах, участвующих в этом процессе.

Достижения в области геномики и метаболомики привели к созданию информационных ресурсов, которые сделали существующие модели реконструкции метаболических сетей легкодоступными для исследователей. Наиболее обширными коллекциями метаболических сетей большого количества организмов являются такие базы данных, как Киотская энциклопедия генов и геномов [41], а также базы данных ферментов и путей BioCyc и MetaCyc [42], которые используют список ферментов для построения метаболических путей. Коллекции ферментов в этих базах формируются из экспериментальной литературы и связаны с базами данных генов по EC номерам. EC номер (Enzyme Commission number) представляет собой схему числовой классификации ферментов, основанную на химических реакциях, которые они катализируют [43]. Строго говоря, EC номер указывают не на ферменты, а на реакции, катализируемые ферментами.

Киотская энциклопедия генов и геномов (KEGG) – это справочная база данных, предоставляющая информацию о генах и белках, биохимических соединениях и реакциях, а также о метаболических путях [41]. Данные KEGG сгруппированы в три основные категории [44]:

– *системная база* отображает метаболические сети в виде карты реакций, которая описывает взаимодействия между ферментами и субстратами: KEGG PATHWAY (карты путей), KEGG BRITE (функциональные иерархии и файлы таблиц) и KEGG MODULE (модули Pathway, структурный комплекс, функциональные наборы). Эти базы данных создаются вручную с использованием опубликованной литературы. KEGG Pathway содержит сети, которые представляют собой эталонный метаболический путь, а не сеть, уникальную для конкретного организма, но на схеме отмечаются гены, принадлежащие конкретному организму (рис. 2, А);

– *геномная база* предлагает информацию о генах и белках, полученных в рамках проектов секвенирования генома (рис. 2, Б). Категория геномной информации содержит информацию коллекций организмов с полными геномами и каталоги их генов, которые в основном взяты из баз данных RefSeq (прокариоты, эукариоты,

плазмиды и вирусы), GenBank (прокариоты) и PubMed (приложение: коллекция созданных вручную записей белковых последовательностей). В настоящее время KEGG хранит последовательности более 4000 полных геномов. База данных ортологичных генов (KEGG Orthology – KO), содержащая генные группы со сходными молекулярными функциями, является центром для связывания геномной информации с системной информацией через процедуру картирования KEGG, а также с химической информацией через двойной аспект метаболической сети;

– *химическая база* предлагает информацию о химических соединениях и реакциях, имеющих отношение к клеточным процессам. Она включает более 17000 соединений, более 9800 реакций и более 6500 ферментов: KEGG COMPOUND (метаболиты и другие малые молекулы), KEGG GLYCAN (гликаны), KEGG REACTION (биохимические реакции), KEGG RPAIR (пары реагентов), KEGG RCLASS (класс реакции) и KEGG ENZYME (номенклатура ферментов). KEGG RPAIR представляет собой набор моделей трансформации биохимических структур (образцы RDM) для пар субстрат-продукт (пары реагентов) в KEGG REACTION. Все эти данные объединены в базу данных LIGAND.

Базы данных путей и геномов BioCyc – это коллекция из более чем 17043 баз данных о геномах эукариотических и прокариотических видов, чьи геномы уже секвенированы, которая фокусируется на метаболических путях, первоначально сформированных исследовательской группой по биоинформатике SRI International. Данные в BioCyc создаются программным обеспечением, которое идентифицирует метаболические пути целых видов, а также предсказывает опероны и кодирующие гены для отсутствующих ферментов в метаболических путях. BioCyc включает информацию о генных онтологиях и свойствах белка из других баз данных биоинформатики, таких как UniProt. Сайт BioCyc предлагает набор инструментов для изучения и визуализации данных сравнительной геномики.

BioCyc включает базу данных MetaCyc (или «Метаболическую энциклопедию») – самую большую коллекцию метаболических путей и ферментов, доступных в настоящее время. Эта база хранит информацию о более чем 2600 метаболических путях первичного и вторичного метаболизма с указанием соответствующих соединений, ферментов и генов [28]. Эта база данных поддерживается группой Питера Карпа в Стэнфордском исследовательском институте с 1999 г. и свободно доступна по адресу <http://metacyc.org/>. Как и в случае с KEGG, большинство запросов MetaCyc или операций просмотра дают богатую и красочную коллекцию гиперссылок фигур, путей, химических структур, реакций, названий ферментов, ссылок и данных последовательности белков и генов.

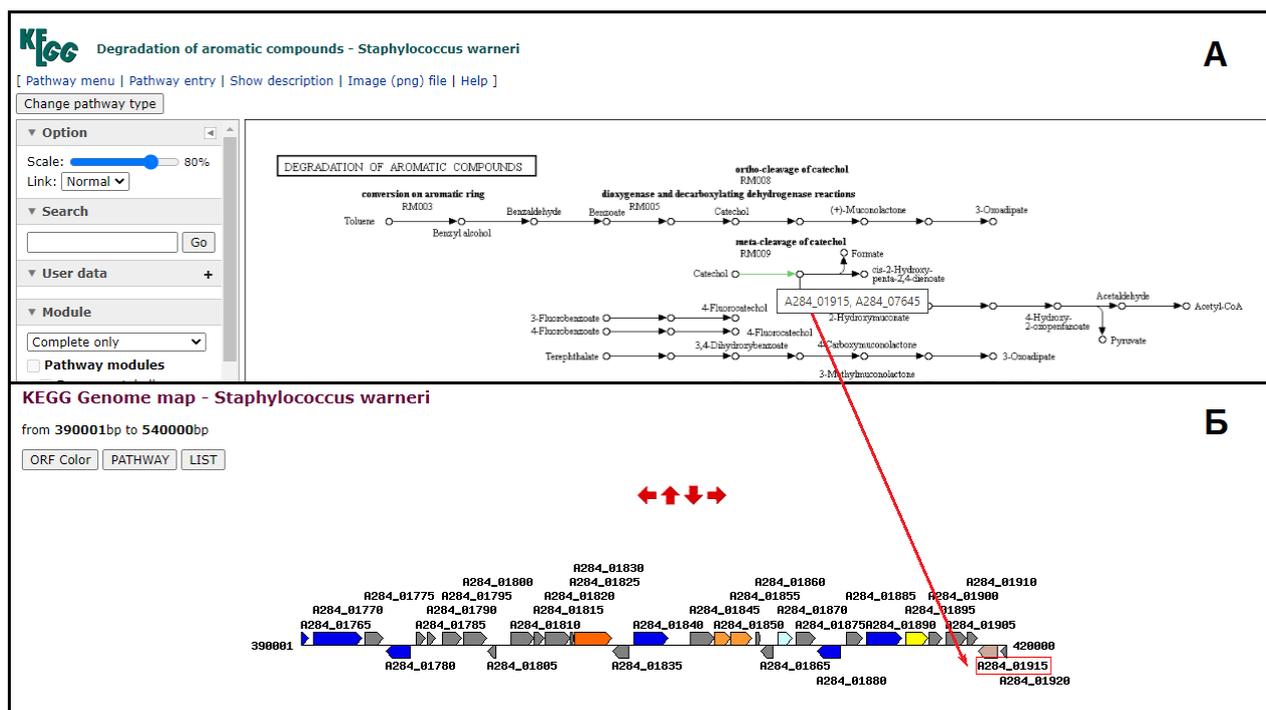


Рис. 2. Анализ путей метаболизма ароматических соединений в KEGG (А) и расположение соответствующих генов в геноме *Staphylococcus warneri* (Б)

Fig. 2. Analysis of the metabolic pathway of aromatic compounds in KEGG (A) and the corresponding genes location in *Staphylococcus warneri* (B) genome

MetaCyc отображает информацию о метаболических путях с разной степенью разрешения, что позволяет пользователям в интерактивном режиме увеличивать диаграмму реакции для более детального просмотра и более подробных аннотаций путей.

В отличие от большинства других баз данных метаболических путей MetaCyc предоставляет более подробную информацию о ферментах, включая данные о специфичности субстрата, кинетических свойствах, активаторах, ингибиторах, требованиях к кофактору и ссылки на базы данных о последовательности и структуре белков. Охватывая метаболические данные для очень многих организмов, база данных MetaCyc поддерживает специфичные для организма запросы и отображает эту таксономическую информацию в своих проиллюстрированных путях через имена генов и ферментов. MetaCyc может использоваться для нескольких научных целей: предоставлять справочные данные для компьютерного прогнозирования метаболических путей организмов из их секвенированных геномов, поддерживать метаболическую инженерию, облегчать сравнение биохимических сетей и служить в качестве энциклопедии метаболизма.

Базы данных KEGG или BioCyc являются общими, предоставляя данные из очень разных источников и различных областей исследований. Большой спектр доступных данных делает их обработку более трудоемкой и обуславливает необходимость в постоянных процедурах филь-

трации. Существенный прогресс в биоремедиации могла бы обеспечить разработка специализированных информационных систем, которая включала данные об организмах, несущих гены биodeградации либо продуцирующих биосурфактанты, а также результаты экспериментов по биоремедиации с конкретными показателями эффективности обработки загрязнителей данными организмами.

Базы данных, специализированные для использования в биоремедиации. В последние десятилетия разработано несколько биоинформационных инструментов, нацеленных на использование их в области биodeградации. Одним из ярких примеров таких проектов стала «База данных Университета Миннесоты по биокатализа/биodeградации (University of Minnesota Biocatalysis/ Biodegradation Database, UM-BBD)». В 2014 г. права UM-BBD перешли к Eawag, Швейцарскому федеральному институту водных наук и технологий, и у базы данных появилось новое название – «База данных биокатализа/биodeградации EAWAG-BBD». Эта база является основным источником информации о микробных биокаталитических реакциях и способах биodeградации ксенобиотических соединений [3]. Каждая реакция или метаболический путь в этой базе представлены в виде информации о стартовых и промежуточных соединениях, организмах, которые трансформируют соединения, гены и ферменты, вовлеченные в процесс. Эта база данных связана с несколькими другими, включая

ExPASy, BRENDA, Enzyme и NCBI, для предоставления информации, описывающей гены и ферменты, которые участвуют в деградации ксенобиотических соединений.

База данных *BioSurfDB* (www.biosurfdb.org) построена как ответ на вышеупомянутые проблемы [45]. Она не только содержит важные данные в поддержку исследований биосурфактантов и/или биодegradации, но также сочетает в себе набор специализированных инструментов, позволяющих эффективным образом проводить конкретный метагеномный анализ. Основная цель этого инструмента состоит в том, чтобы поддержать выявление закономерностей таксономического и функционального разнообразия микробных сообществ, а также новых генов, участвующих в деградации производства углеводов и поверхностно-активных веществ, которые имеют потенциал для развития стратегии биоремедиации.

Базы данных для прогнозирования метаболических путей деградации углеводов. Метаболические модели в масштабе генома могут использоваться не только для понимания путей деградации ксенобиотиков, но также позволяют прогнозировать фенотип организма по последовательности его генома, предсказывать реакции микроорганизмов на различные генетические или экологические стрессоры. Реконструкция метаболических путей *de novo* основана на сравнении аннотированных генов с известными у родственных микроорганизмов, а также с помощью уже известных правил химического превращения [46, 47]. Эти инструменты учитывают множество факторов, включая специфичность субстрата, сайты связывания или механизмы реакции ферментов, структурные изменения в парах субстрат–продукт и длину пути от субстрата к продукту [46].

Несколько систем прогнозирования метаболических путей были разработаны также для предсказания путей биодegradации ксенобиотических соединений в почве [48]. Большинство систем прогнозирования является платным, но некоторые веб-серверы, такие как *enviPath* и *PathPred*, доступны [32, 33].

Система прогнозирования пути *enviPath* («Пути биотрансформации загрязнителей окружающей среды», <https://envipath.org/>) предсказывает маршруты биодegradации, основанные на доступных правилах биотрансформации, полученных из реакций, накопленных в базе данных EAWAG-BBD или в каких-либо публикациях [например, 3, 49]. При обязательной регистрации *enviPath* можно использовать для разработки конкретных биохимических маршрутов и персональных баз данных с данными биотрансформации, а также для прогнозирования новых катаболических путей. Ресурс может выделить инициирующие типы реакций, возникающих в аэробных средах, которые в некоторых случаях приводят к

полной минерализации загрязняющего вещества, хотя он не определяет термодинамическую осуществимость предлагаемых путей или специфических ферментов, которые катализируют предлагаемые реакции.

Система прогнозирования *PathPred* (<http://www.genome.jp/tools/pathpred/>) использует данные, полученные из Киотской энциклопедии генов и геномов (KEGG) [32]. Сервер *PathPred* обеспечивает прогноз новых и альтернативных реакций независимо от того, известны ли ферменты для этих реакций или нет. Если фермент неизвестен, пользователи могут применить инструмент *E-zyyme* (<http://www.genome.jp/tools/e-zyyme/>), чтобы назначить возможный номер EC (вплоть до подкласса EC). После присвоения номеров EC можно также искать предполагаемые гены в геноме на основе сходства последовательностей известных генов с одним и тем же подклассом EC [32]. *PathPred* предсказывает вероятные катализируемые ферментами пути метаболизма ксенобиотика, выбранного в качестве запроса, и отображает все последовательно проходящие реакции в виде дерева.

Существует несколько удобных для пользователя методов подачи запроса: химическое соединение может быть введено либо в формате файла MDL mol, либо в формате SMILES, либо с помощью идентификатора соединения KEGG. Пользователи могут выбрать один из эталонных путей в соответствии с их назначением. В случае эталонного пути биодegradации ксенобиотиков пользователь должен употребить в качестве запроса соединение для биодegradации, тогда как в случае эталонного пути биосинтеза вторичных метаболитов запрос должен быть конечным продуктом биосинтеза. *PathPred* содержит эталонные пути не только для микробной биодegradации соединений, но и для биосинтеза вторичных метаболитов растений.

MetaRouter – система для поддержки разнообразной информации, связанной с биоремедиацией, в рамках которой можно выполнять запросы, администрирование и анализ (применение методов для извлечения новых знаний) [50]. *MetaRouter* – это приложение, предназначенное для лабораторий, работающих в области биодegradации и биовосстановления, которым необходимо вести и просматривать публичные и частные данные, связанные внутри и с внешними базами данных, и извлекать из них новую информацию. В число функций сбора данных входит программа определения путей биологического разложения химических соединений в соответствии с заданным набором ограничений и требований. На веб-сайте *MetaRouter* (http://pdg.cnb.ua.m.es/biodeg_net/MetaRouter) доступны примеры путей биоразложения, документация системы с полным описанием ее возможностей и информация о том, как получить доступ к системе. Они предоставляют информацию о химических

структурах в визуализированном формате (PBD, SMILE, физико-химические свойства молекулярной массы).

Веб-сервис «От метаболита к метаболиту» (<http://fmm.mbc.nctu.edu.tw/>) – удобная для пользователя система идентификации метаболических путей, находящаяся в свободном доступе, с помощью которой можно искать возможные пути между известными входными и выходными соединениями [30]. Данный веб-сервис получает информацию о реакциях и ферментах на основе баз данных KEGG/LIGAND и KEGG/PATHWAY для формирования интегрированной карты метаболического пути. Выявленные пути обычно встречаются не только на одной карте, но и сложным образом на нескольких картах. Выбираются, как правило, карты маршрутов, содержащие большое число путей, а карты маршрутов, имеющие только одну реакцию, исключаются. Сервис идентифицирует соответствующие гены, организмы и информацию о названии генов, номерах ферментов и видоспецифичности ферментов. Информацию можно получить из баз данных таксономии UniprotKB/Swiss-prot и NCBI. Недостатком этой системы является то, что она ограничена путями, которые присутствуют в структуре KEGG, и для целей биоремедиации можно искать метаболические пути только тех ксенобиотических соединений, информация о которых доступна в базе данных KEGG.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Имеющиеся сегодня базы данных секвенированных геномов все активнее используются для вынесения экспертных заключений, что способствует не только прогрессу в биоремедиации, но и генерации новых идей для проведения биоремедиационных мероприятий. С каждым годом мы видим значительный прогресс в разработке различных биоинформационных ресурсов баз, программного обеспечения и вычислительных моделей для изучения микробных про-

цессов. Однако методы *in silico* еще недостаточно используются для решения проблем, связанных с биоремедиацией. Одна из причин этого – отсутствие единой удобной для пользователя специализированной платформы, которая предоставляла бы все инструменты и базы данных в области биоинформатики для анализа данных и моделей реконструкции метаболических путей, непосредственно связанных с исследованиями в биоремедиации. Это задача требует координации со стороны ученых, работающих в различных лабораториях, обмена данными, а также обновления самих баз данных. При разработке инструментов, программного обеспечения и программ для биоинформатики необходимо иметь в виду, что конечный пользователь (биолог) может плохо разбираться в программном обеспечении. Кроме того, эти программные инструменты должны быть доступны через Интернет, учитывая глобальное распространение научно-исследовательского сообщества.

Будущее развитие биоинформационных ресурсов, нацеленных на биоремедиацию, может быть сосредоточено на следующих направлениях:

- 1) расширение текущих данных дополнительной информацией о путях (механизмах) биоремедиации;
- 2) стандартизация протоколов для сбора, анализа, объединения и передачи данных;
- 3) интеграция данных, полученных с помощью омиксных подходов (данные метагеномики (функциональные), транскриптомики, протеомики и метаболомики), что позволит исследователям получить более четкое и полное понимание путей биоремедиации;
- 4) наличие автоматической проверки точности и правильности данных;
- 5) создание платформы для анализа метаболических сетей, состоящих из нескольких микроорганизмов, входящих в заданный бактериальный консорциум.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ellis L.B.M., Roe D., Wackett L.P. Biodegradation Database: the first decade // *Nucleic Acids Research*. 2006. Vol. 34. P. D517–D521. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj076>
2. Arora P.K., Shi W. Tools of bioinformatics in biodegradation // *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. 2010. Vol. 9. P. 211–213. <https://doi.org/10.1007/s11157-010-9211-x>
3. Gao J., Ellis L.B.M., Wackett L.P. The university of Minnesota biocatalysis/biodegradation database: improving public access // *Nucleic Acids Research*. 2010. Vol. 38. P. D488–D491. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp771>
4. Дегтярева И.А., Яппаров И.А., Яппаров А.Х., Ежкова А.М., Давлетшина А.Я., Шайдуллина И.А. Создание и применение биоудобрения на основе эффективного консорциума микроорганизмов-деструкторов углеводов для рекультивации нефтезагрязненных почв Республики Татарстан // *Нефтяное хозяйство*. 2017. N 5. С.100–103. <https://doi.org/10.24887/0028-2448-2017-5-100-103>
5. Costa A.S., Romão L.P.C., Araújo B.R., Lucas S.C.O., Maciel S.T.A., Wisniewski A. Jr., et al. Environmental strategies to remove volatile aromatic fractions (BTEX) from petroleum industry wastewater using biomass // *Bioresource Technology*. 2012. Vol. 105. P. 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.096>
6. Chandra S., Sharma R., Singh K., Sharma A. Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon // *Annals of Microbiology*. 2013. Vol. 63. Issue 2. P. 417–431. <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0543-3>

7. Souza E.C., Vessoni-Penna T.C., de Souza Oliveira R.P. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: an overview // *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2014. Vol. 89. P. 88–94. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.01.007>
8. Шайдуллина И.А., Яппаров А.Х., Дегтярева И.А., Латыпова В.З., Гадиева Э.Ш. Рекультивация нефтезагрязненных почв на примере выщелоченных черноземов Татарстана // *Нефтяное хозяйство*. 2015. N 3. С. 102–105.
9. Дегтярева И.А., Бабынин Э.В., Мотина Т.Ю., Султанов М.И. Полногеномное секвенирование штамма *Staphylococcus warneri*, изолированного из загрязненной нефтью почвы // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*, 2020. Т. 10. N 1. С. 48–55.
10. Abatenh E., Gizaw B., Tsegaye Z., Wassie M. The role of microorganisms in bioremediation // *Open Journal of Environmental Biology*. 2017. Vol. 1. Issue 1. P. 038–046. <https://doi.org/10.17352/ojeb.000007>
11. Bhandari S., Poudel D.K., Marahatha R., Dawadi S., Khadayat K., Phuyal S., et al. Microbial enzymes used in bioremediation // *Journal of Chemistry*. 2021. Vol. 2021. Issue 4. Article ID 8849512. 17 p. <https://doi.org/10.1155/2021/8849512>
12. Abou Seeda M.A., Yassen A.A., Abou El-Nour E.Z.A.A. Microorganism as a tool of bioremediation technology for cleaning waste and industrial water // *Bioscience Research*. 2017. Vol. 14. Issue 3. P. 633–644.
13. Dave S., Das J. Role of microbial enzymes for biodegradation and bioremediation of environmental pollutants: challenges and future prospects. In: *Bioremediation for Environmental Sustainability*. Saxena G., Kumar V., Shah M.P. (eds.) Elsevier, 2021. P. 325–346. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820524-2.00013-4>
14. Singh P., Jain R., Srivastava N., Borthakur A., Pal D.B., Singh R., et al. Current and emerging trends in bioremediation of petrochemical waste: a review // *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 2017. Vol. 47. Issue 3. P. 155–201. <https://doi.org/10.1080/10643389.2017.1318616>
15. Ghaly A.E., Yusran A., Dave D. Effects of biostimulation and bioaugmentation on the degradation of pyrene in soil // *Journal of Bioremediation & Biodegradation*. 2013. S7:005. 13 p. <https://doi.org/10.4172/2155-6199.S7-005>
16. Koshlaf E., Ball A.S. Soil bioremediation approaches for petroleum hydrocarbon polluted environments // *AIMS Microbiology*. 2017. Vol. 3. Issue 1. P. 25–49. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.1.25>
17. Dvořák P., Nikel P.I., Damborský J., de Lorenzo V. Bioremediation 3.0: engineering pollutant-removing bacteria in the times of systemic biology // *Biotechnology Advances*. 2017. Vol. 35. Issue 7. P. 845–866. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.08.001>
18. Chandran H., Meena M., Sharma K. Microbial biodiversity and bioremediation assessment through omics approaches // *Frontiers Environmental Chemistry*. 2020. Vol. 1. P. 570326. <https://doi.org/10.3389/fenvc.2020.570326>
19. Jesmok E.M., Hopkins J.M., Foran D.R. Next-generation sequencing of the bacterial 16S rRNA gene for forensic soil comparison: a feasibility study // *Journal Forensic Sciences*. 2016. Vol. 61. Issue 3. P. 607–617. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.13049>
20. Rahmeh R., Akbar A., Kumar V., Al-Mansour H., Kishk M., Ahmed N., et al. Insights into bacterial community involved in bioremediation of aged oil-contaminated soil in arid environment // *Evolutionary Bioinformatics Online*. 2021. Vol. 17. 13 p. <https://doi.org/10.1177/11769343211016887>
21. Misra B.B., Langefeld C.D., Olivier M., Cox L.A. Integrated omics: tools, advances, and future approaches // *Journal of Molecular Endocrinology*. 2018. Vol. 62. Issue 1. P. R21–R45. <https://doi.org/10.1530/JME-18-0055>
22. Pandey A., Tripathi P.H., Tripathi A.H., Pandey S.C., Gangola S. Omics technology to study bioremediation and respective enzymes. In: *Smart bioremediation technologies. Microbial enzymes*. Bhatt P. (ed.). New Delhi: Academic Press, 2019. P. 23–43. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818307-6.00002-0>
23. Singh A.K., Bilal M., Iqbal H.M.N., Raj A. Trends in predictive biodegradation for sustainable mitigation of environmental pollutants: recent progress and future outlook // *Science of The Total Environment*. 2021. Vol. 770. P. 144561. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144561>
24. Goh H.-H. Integrative multi-omics through bioinformatics. // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2018. Vol. 1102. P. 69–80. https://doi.org/10.1007/978-3-319-98758-3_5
25. Ejigu G.F., Jung J. Review on the computational genome annotation of sequences obtained by next-generation sequencing // *Biology*. 2020. Vol. 9. Issue 9. P. 295. <https://doi.org/10.3390/biology9090295>
26. Zhang P., Berardini T.Z., Ebert D., Li Q., Mi H., Muruganujan A., et al. PhyloGenes: An online phylogenetics and functional genomics resource for plant gene function inference // *Plant Direct*. 2020. Vol. 4. Issue 12. P. e00293. <https://doi.org/10.1002/pld3.293>
27. Tong H., Phan N.V.T., Nguyen T.T., Nguyen D.V., Vo N.S., Le L. Review on databases and bioinformatic approaches on pharmacogenomics of adverse drug reactions // *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*. 2021. Vol. 14. P. 61–75. <https://doi.org/10.2147/PGPM.S290781>
28. Caspi R., Altman T., Billington R., Dreher K., Foerster H., Fulcher C.A., et al. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases // *Nucleic Acids Research*. 2012. Vol. 42 (Database issue). P. D459–D471. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1103>
29. Mohan C.G., Gandhi T., Garg D., Shinde R. Computer-assisted methods in chemical toxicity prediction // *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2007. Vol. 7. Issue 5. P. 499–507. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144561>

2174/138955707780619554

30. Chou C.H., Chang W.C., Chiu C.C., Huang C.C., Huang H.D. FMM: a web server for metabolic pathway reconstruction and comparative analysis // *Nucleic Acids Research*. 2009. Vol. 37. P. W129–W134. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp264>

31. Finley S.D., Broadbelt L.J., Hatzimanikatis V. Computational framework for predictive biodegradation // *Biotechnology and Bioengineering*. 2009. Vol. 104. Issue 6. P. 1086–1097. <https://doi.org/10.1002/bit.22489>

32. Moriya Y., Shigemizu D., Hattori M., Tokimatsu T., Kotera M., Goto S., et al. PathPred: an enzyme-catalyzed metabolic pathway prediction server // *Nucleic Acids Research*. 2010. Vol. 38. P. W138–W143. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq318>

33. Gao J., Ellis L.B.M., Wackett L.P. The University of Minnesota pathway prediction system: multi-level prediction and visualization // *Nucleic Acids Research*. 2011. Vol. 39. (Web Server issue). P. W406–W411. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr200>

34. Kotera M., Goto S. Metabolic pathway reconstruction strategies for central metabolism and natural product biosynthesis // *Biophysics & Physiology*. 2016. Vol. 13. P. 195–205. https://doi.org/10.2142/biophysico.13.0_195

35. Shah H.A., Liu J., Yang Z., Feng J. Review of machine learning methods for the prediction and reconstruction of metabolic pathways // *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2021. Vol. 8. P. 634141. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.634141>

36. Wang L., Dash S., Ng C.Y., Maranas C.D. A review of computational tools for design and reconstruction of metabolic pathways // *Synthetic and Systems Biotechnology*. 2017. Vol. 2. Issue 4. P. 243–252. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2017.11.002>

37. Wackett L.P. The Metabolic Pathways of Biodegradation. In: *The prokaryotes*. Applied Bacteriology and Biotechnology. 4th edition. Rosenberg E. (editor-in-chief); DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (eds.). Springer, Berlin, Heidelberg. 2013. P. 383–393. https://doi.org/10.1007/978-3-642-31331-8_76

38. Dombrowski N., Donaho J.A., Gutierrez T., Seitz K.W., Teske A.P., Baker B.J. Reconstructing metabolic pathways of hydrocarbon-degrading bacteria from the Deepwater Horizon oil spill // *Nature Microbiology*. 2016. Vol. 1. Issue 7. Article number 16057. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.57>

39. Jaiswal S., Shukla P. Alternative strategies for microbial remediation of pollutants via synthetic biology // *Frontiers in Microbiology*. 2020. Vol. 11. P. 808. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00808>

40. Henry C.S., DeJongh M., Best A.A., Frybarger P.M., Linsay B., Steven R.L. High-throughput generation, optimization and analysis of

genome-scale metabolic models // *Nature Biotechnology*. 2010. Vol. 28. P. 977–982. <https://doi.org/10.1038/nbt.1672>

41. Kanehisa M., Furumichi M., Tanabe M., Sato Y., Morishima K. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs // *Nucleic Acids Research*. 2017. Vol. 45. Issue D1. P. D353–D361. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1092>

42. Caspi R., Billington R., Ferrer L., Foerster H., Fulcher C.A., Keseler I.M., et al. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases // *Nucleic Acids Research*. 2016. Vol. 44. Issue D1. P. D471–D480. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1164>

43. Rentzsch R., Orengo C.A. Protein function prediction – the power of multiplicity // *Trends in Biotechnology*. 2009. Vol. 27. Issue 4. P. 210–219. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.01.002>

44. Calderón-González K.G., Hernández-Monge J., Herrera-Aguirre M.E., Luna-Arias J.P. Bioinformatics tools for proteomics data interpretation // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2016. Vol. 919. P. 3281–341. https://doi.org/10.1007/978-3-319-41448-5_16

45. Oliveira J.S., Araújo W., Lopes Sales A.I., de Brito Guerra A., da Silva Araújo S.C., de Vasconcelos A.T.R., et al. BioSurfDB: knowledge and algorithms to support biosurfactants and biodegradation studies. // *Database. The Journal of Biology Databases and Curation*. 2015. Vol. 2015. bav 033. <https://doi.org/10.1093/database/bav033>

46. Medema M.H., van Raaphorst R., Takano E., Breitling R. Computational tools for the synthetic design of biochemical pathways // *Nature Reviews Microbiology*. 2012. Vol. 10. Issue 3. P. 191–202. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2717>

47. Hadadi N., Hatzimanikatis V. Design of computational retrobiosynthesis tools for the design of *de novo* synthetic pathways // *Current Opinion in Chemical Biology*. 2015. Vol. 28. P. 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.06.025>

48. Langowski J., Long A. Computer systems for the prediction of xenobiotic metabolism // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2002. Vol. 54. Issue 3. P. 407–415. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(02\)00011-x](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(02)00011-x)

49. Wicker J., Lorsbach T., Gütlein M., Schmid E., Latino D., Kramer S., et al. EnvPath – the environmental contaminant biotransformation pathway resource // *Nucleic Acids Research*. 2016. Vol. 44. Issue D1. P. D502–D508. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1229>

50. Pazos F., Guijas D., Valencia A., de Lorenzo V. MetaRouter: bioinformatics for bioremediation // *Nucleic Acids Research*. 2005. Vol. 33. P. D588–D592. <https://doi.org/10.1093/nar/gki068>

REFERENCES

1. Ellis LBM, Roe D, Wackett LP. Biodegradation Database: the first decade. *Nucleic Acids Research*. 2006;34:D517–D521. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj076>

2. Arora PK, Shi W. Tools of bioinformatics in biodegradation. *Reviews in Environmental Science*

and *Biotechnology*. 2010;9:211–213. <https://doi.org/10.1007/s11157-010-9211-x>

3. Gao J, Ellis LBM, Wackett LP. The university of Minnesota biocatalysis/biodegradation database: improving public access. *Nucleic Acids Research*. 2010;38:D488–D491. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp771>

4. Degtyareva IA, Yapparov IA, Yapparov AKh, Ezhkova AM, Davletshina AY, Shaydullina IA. Creation and application of biofertilizers based on the effective consortium destructor microorganisms for remediation of contaminated soils of the Republic of Tatarstan. *Neftyanoe khozyaystvo*. 2017;5:100–103. (In Russian) <https://doi.org/10.24887/0028-2448-2017-5-100-103>

5. Costa AS, Romão LPC, Araújo BR, Lucas SCO, Maciel STA, Wisniewski A Jr., et al. Environmental strategies to remove volatile aromatic fractions (BTEX) from petroleum industry wastewater using biomass. *Bioresource Technology*. 2012;105:31–39. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.096>

6. Chandra S, Sharma R, Singh K, Sharma A. Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon. *Annals of Microbiology*. 2013;63(2):417–431. <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0543-3>

7. Souza EC, Vessoni-Penna TC, de Souza Oliveira RP. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: an overview. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2014;89:88–94. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.01.007>

8. Shaidullina IA, Yapparov AKh, Degtyareva IA, Latypova VZ, Gadieva ESh. Recultivation of oil-contaminated lands by example of leached black humus earth of Tatarstan. *Neftyanoe khozyaystvo = Oil industry*. 2015;3:102–105. (In Russian)

9. Degtyareva IA, Babynin EV, Motina TYu, Sultanov MI. Full-genome sequencing of the *Staphylococcus warneri* strain isolated from oil-contaminated soil. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(1):48–55. (In English) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-1-48-55>

10. Abatenh E, Gizaw B, Tsegaye Z, Wassie M. The role of microorganisms in bioremediation. *Open Journal of Environmental Biology*. 2017;1(1):038–046. <https://doi.org/10.17352/ojeb.000007>

11. Bhandari S, Poudel DK, Marahatha R, Dawadi S, Khadayat K, Phuyal S, et al. Microbial enzymes used in bioremediation. *Journal of Chemistry*. 2021;2021(4). Article ID 8849512. 17 p. <https://doi.org/10.1155/2021/8849512>

12. Abou Seeda MA, Yassen AA, Abou El-Nour EZAA. Microorganism as a tool of bioremediation technology for cleaning waste and industrial water. *Bioscience Research*. 2017;14(3):633–644.

13. Dave S, Das J. Role of microbial enzymes for biodegradation and bioremediation of environmental pollutants: challenges and future prospects. In: *Bioremediation for Environmental Sustainability*. Saxena G, Kumar V, Shah MP. (eds.) Elsevier;

2021, p. 325–346. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820524-2.00013-4>

14. Singh P, Jain R, Srivastava N, Borthakur A, Pal DB, Singh R, et al. Current and emerging trends in bioremediation of petrochemical waste: a review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 2017;47(3):155–201. <https://doi.org/10.1080/10643389.2017.1318616>

15. Ghaly AE, Yusran A, Dave D. Effects of biostimulation and bioaugmentation on the degradation of pyrene in soil. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*. 2013. S7:005. 13 p. <https://doi.org/10.4172/2155-6199.S7-005>

16. Koshlaf E, Ball AS. Soil bioremediation approaches for petroleum hydrocarbon polluted environments. *AIMS Microbiology*. 2017;3(1):25–49. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.1.25>

17. Dvořák P, Nikel PI, Damborský J, de Lorenzo V. Bioremediation 3.0: engineering pollutant-removing bacteria in the times of systemic biology. *Biotechnology Advances*. 2017;35(7):845–866. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.08.001>

18. Chandran H, Meena M, Sharma K. Microbial biodiversity and bioremediation assessment through omics approaches. *Frontiers Environmental Chemistry*. 2020;1:570326. <https://doi.org/10.3389/fenvc.2020.570326>

19. Jesmok EM, Hopkins JM, Foran DR. Next-generation sequencing of the bacterial 16S rRNA gene for forensic soil comparison: a feasibility study. *Journal Forensic Sciences*. 2016;61(3):607–617. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.13049>

20. Rahmeh R, Akbar A, Kumar V, Al-Mansour H, Kishk M, Ahmed N, et al. Insights into bacterial community involved in bioremediation of aged oil-contaminated soil in arid environment. *Evolutionary Bioinformatics Online*. 2021;17. 13 p.

21. Misra BB, Langefeld CD, Olivier M, Cox LA. Integrated omics: tools, advances, and future approaches. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2018;62(1):R21–R45. <https://doi.org/10.1530/JME-18-0055>

22. Pandey A, Tripathi PH, Tripathi AH, Pandey SC, Gangola S. Omics technology to study bioremediation and respective enzymes. In: *Smart bioremediation technologies. Microbial enzymes*. Bhatt P. (ed.). New Delhi: Academic Press; 2019, p. 23–43. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818307-6.00002-0>

23. Singh AK, Bilal M, Iqbal HMN, Raj A. Trends in predictive biodegradation for sustainable mitigation of environmental pollutants: recent progress and future outlook. *Science of The Total Environment*. 2021;770:144561. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144561>

24. Goh H-H. Integrative multi-omics through bioinformatics. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2018;1102:69–80. https://doi.org/10.1007/978-3-319-98758-3_5

25. Ejigu GF, Jung J. Review on the computational genome annotation of sequences obtained by next-generation sequencing. *Biology*. 2020;9(9):295. <https://doi.org/10.3390/biology9090295>

26. Zhang P, Berardini TZ, Ebert D, Li Q, Mi H, Muruganujan A, et al. PhyloGenes: An online phylogenetics and functional genomics resource for plant gene function inference. *Plant Direct*. 2020;4(12): e00293. <https://doi.org/10.1002/pld3.293>
27. Tong H, Phan NVT, Nguyen TT, Nguyen DV, Vo NS, Le L. Review on databases and bioinformatic approaches on pharmacogenomics of adverse drug reactions. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*. 2021;14:61–75. <https://doi.org/10.2147/PGPM.S290781>
28. Caspi R, Altman T, Billington R, Dreher K, Foerster H, Fulcher CA, et al. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. *Nucleic Acids Research*. 2012;42:D459–D471. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1103>
29. Mohan C.G., Gandhi T., Garg D., Shinde R. Computer-assisted methods in chemical toxicity prediction // Mini-Reviews in Medicinal Chemistry. 2007. Vol. 7. Issue 5. P. 499–507. <https://doi.org/10.2174/138955707780619554>
29. Mohan CG, Gandhi T, Garg D, Shinde R. Computer-assisted methods in chemical toxicity prediction. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2007;7(5):499–507. <https://doi.org/10.2174/138955707780619554>
30. Chou CH, Chang WC, Chiu CC, Huang CC, Huang HD. FMM: a web server for metabolic pathway reconstruction and comparative analysis. *Nucleic Acids Research*. 2009;37:W129–W134. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp264>
31. Finley SD, Broadbelt LJ, Hatzimanikatis V. Computational framework for predictive biodegradation. *Biotechnology and Bioengineering*. 2009;104(6):1086–1097. <https://doi.org/10.1002/bit.22489>
32. Moriya Y, Shigemizu D, Hattori M, Tokimatsu T, Kotera M, Goto S, et al. PathPred: an enzyme-catalyzed metabolic pathway prediction server. *Nucleic Acids Research*. 2010;38:W138–W143. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq318>
33. Gao J, Ellis LBM, Wackett LP. The University of Minnesota pathway prediction system: multi-level prediction and visualization. *Nucleic Acids Research*. 2011;39(Web Server issue):W406–W411. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr200>
34. Kotera M, Goto S. Metabolic pathway reconstruction strategies for central metabolism and natural product biosynthesis. *Biophysics & Physicobiology*. 2016;13:195–205. https://doi.org/10.2142/biophysico.13.0_195
35. Shah HA, Liu J, Yang Z, Feng J. Review of machine learning methods for the prediction and reconstruction of metabolic pathways. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2021;8:634141. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.634141>
36. Wang L, Dash S, Ng CY, Maranas CD. A review of computational tools for design and reconstruction of metabolic pathways. *Synthetic and Systems Biotechnology*. 2017;2(4):243–252. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2017.11.002>
37. Wackett L.P. The Metabolic Pathways of Biodegradation. In: *The prokaryotes*. *Applied Bacteriology and Biotechnology*. 4th ed. Rosenberg E. (editor-in-chief); DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F. (eds.). Springer, Berlin, Heidelberg; 2013, p. 383–393. https://doi.org/10.1007/978-3-642-31331-8_76
38. Dombrowski N, Donaho JA, Gutierrez T, Seitz KW, Teske AP, Baker BJ. Reconstructing metabolic pathways of hydrocarbon-degrading bacteria from the Deepwater Horizon oil spill. *Nature Microbiology*. 2016;1(7). Article number 16057. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.57>
39. Jaiswal S, Shukla P. Alternative strategies for microbial remediation of pollutants via synthetic biology. *Frontiers in Microbiology*. 2020;11:808. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00808>
40. Henry CS, DeJongh M, Best AA, Frybarger PM, Linsay B, Steven RL. High-throughput generation, optimization and analysis of genome-scale metabolic models. *Nature Biotechnology*. 2010;28:977–982. <https://doi.org/10.1038/nbt.1672>
41. Kanehisa M, Furumichi M, Tanabe M, Sato Y, Morishima K. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Research*. 2017;45(D1):D353–D361. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1092>
42. Caspi R, Billington R, Ferrer L, Foerster H, Fulcher CA, Keseler IM, et al. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. *Nucleic Acids Research*. 2016;44(D1):D471–D480. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1164>
43. Rentzsch R, Orengo C.A. Protein function prediction – the power of multiplicity. *Trends in Biotechnology*. 2009;27(4):210–219. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.01.002>
44. Calderón-González KG, Hernández-Monge J, Herrera-Aguirre ME, Luna-Arias JP. Bioinformatics Tools for Proteomics Data Interpretation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2016;919:281–341. https://doi.org/10.1007/978-3-319-41448-5_16
45. Oliveira JS, Araújo W, Lopes Sales AI, de Brito Guerra A, da Silva Araújo SC, de Vasconcelos ATR, et al. BioSurfDB: knowledge and algorithms to support biosurfactants and biodegradation studies. Database. *The Journal of Biology Databases and Curation*. 2015:2015: bav 033. <https://doi.org/10.1093/database/bav033>
46. Medema MH, van Raaphorst R, Takano E, Breitling R. Computational tools for the synthetic design of biochemical pathways. *Nature Reviews Microbiology*. 2012;10(3):191–202. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2717>
47. Hadadi N, Hatzimanikatis V. Design of computational retrobiosynthesis tools for the design of *de novo* synthetic pathways. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2015;28:99–104. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.06.025>
48. Langowski J, Long A. Computer systems for the prediction of xenobiotic metabolism. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2002;54(3):407–415. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(02\)00011-x](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(02)00011-x)
49. Wicker J, Lorschach T, Gütlein M, Schmid E,

Latino D, Kramer S, et al. EnviPath – the environmental contaminant biotransformation pathway resource. *Nucleic Acids Research*. 2016;44(D1):D502–D508. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1229>

50. Pazos F, Guijas D, Valencia A, de Lorenzo V. MetaRouter: bioinformatics for bioremediation. *Nucleic Acids Research*. 2005;33:D588–D592. <https://doi.org/10.1093/nar/gki068>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Бабынин Эдуард Викторович,
к.б.н., доцент, старший научный сотрудник,
Институт фундаментальной медицины
и биологии,
Казанский (Приволжский) федеральный
университет;
420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18,
Российская Федерация;
старший научный сотрудник,
Татарский НИИ агрохимии и почвоведения,
420059, г. Казань, Оренбургский тракт, 20а,
Российская Федерация,
✉ e-mail: edward.b67@mail.ru

Дегтярева Ирина Александровна,
д.б.н., доцент, главный научный сотрудник,
Татарский НИИ агрохимии и почвоведения,
420059, г. Казань, Оренбургский тракт, 20а,
Российская Федерация;
профессор,
Казанский национальный исследовательский
технологический университет,
420015, г. Казань, ул. Карла Маркса, 68,
Российская Федерация,
e-mail: peace-1963@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 02.04.2021.
Одобрена после рецензирования 03.08.2021.
Принята к публикации 30.08.2021.*

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Edward V. Babynin,
Cand. Sci. (Biology), Associate Professor,
Senior Researcher,
Institute of Fundamental Medicine and Biology,
Kazan Federal University,
18, Kremlevskaya St., Kazan, 420008,
Russian Federation;
Senior Scientist,
Tatar Research Institute of Agricultural Chemistry
and Soil Science RAS,
20a, Orenburgskii trakt, Kazan, 420059,
Russian Federation,
✉ e-mail: edward.b67@mail.ru

Irina A. Degtyareva,
Dr. Sci. (Biology), Associate Professor,
Chief Researcher,
Tatar Research Institute of Agricultural Chemistry
and Soil Science RAS,
20a, Orenburgskii trakt, Kazan, 420059,
Russian Federation;
Professor,
Kazan National Research Technological
University,
68, Karl Marx St., Kazan, 420015,
Russian Federation,
e-mail: peace-1963@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 02.04.2021.
Approved after reviewing 03.08.2021.
Accepted for publication 30.08.2021.*

Оригинальная статья / Original article

УДК 577.151:663.531

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-384-392>



Подбор мультиэнзимной композиции и условий подготовки концентрированного зернового сусла

© Е.М. Серба, Л.В. Римарева, М.Б. Оверченко, Н.И. Игнатова,
М.Э. Медриш, А.А. Павлова, Е.Н. Соколова

Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии –
филиал ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»,
Москва, Российская Федерация

Резюме: В целях создания ресурсосберегающих биотехнологий глубокой переработки зернового сырья актуальным является поиск эффективного способа получения концентрированного зернового сусла для спиртового производства. Чтобы обеспечить качественные показатели биохимического состава и реологических свойств концентрированного сусла, необходим подбор оптимальных ферментных систем и условий глубокой конверсии высокомолекулярных полимеров зерна. Проведенными ранее исследованиями доказана эффективность применения карбогидраз для обработки зернового сырья. Однако практически отсутствуют данные, касающиеся изучения каталитического действия фитазы, в том числе в комплексе с другими гидролитическими ферментами, на степень гидролиза полимеров зернового сырья при приготовлении концентрированного сусла. В настоящей работе показано влияние протеаз и фитаз в составе мультиэнзимной композиции, а также условий ферментативной обработки сырья, на реологические и биохимические показатели концентрированного зернового сусла. В качестве объектов исследования были пшеница, рожь и кукуруза. Установлено, что синергизм совместного действия исследованных гидролаз, в том числе фитолитических и протеолитических ферментов, способствовал повышению степени конверсии полимеров данного зернового сырья и увеличению концентрации растворимых сухих веществ сусла в 1,5 раза. Использование в составе мультиэнзимного комплекса протеаз и фитаз позволило увеличить в сусле концентрацию: глюкозы – в 1,2–1,3 раза; аминокислот – в 1,5–2,2 раза; ионов фосфора – в 1,4–4,3 раза. При этом в опытных вариантах сусла содержание аминокислот в свободной форме увеличилось более чем в 4 раза. Показано, что подготовка зернового сырья при температуре 80–90 °С в течение 6 ч и продолжительности осахаривания в течение 1–2 ч с использованием полного комплекса ферментов, содержащего α -амилазу, глюкоамилазу, ксиланазу, протеазу и фитазу, позволяет получить концентрированное зерновое сусло с содержанием сухих веществ более 30%. При этом отмечено существенное снижение вязкости (особенно ржаного сусла – в 1,3–1,9 раза). Результаты исследований подтвердили важную роль ферментов, проявляющих субстратную специфичность по отношению к белковым и фитиновым полимерам зернового сырья.

Ключевые слова: протеазы, фитазы, зерновое сусло, углеводы, фосфаты, аминокислоты, мультиэнзимная композиция

Благодарности: Исследования проведены за счет средств субсидии на выполнение государственного задания в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук.

Для цитирования: Серба Е.М., Римарева Л.В., Оверченко М.Б., Игнатова Н.И., Медриш М.Э., Павлова А.А., Соколова Е.Н. Подбор мультиэнзимной композиции и условий подготовки концентрированного зернового сусла. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2021. Т. 11. N 3. С. 384–392. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-384-392>

Selecting multi-enzyme composition and preparation conditions for strong wort

Elena M. Serba, Luybov V. Rimareva, Marina B. Overchenko, Nadezda I. Ignatova,
Marina E. Medrish, Anzhelika A. Pavlova, Elena N. Sokolova

Russian Research Institute of Food Biotechnology,
Federal Research Center of Nutrition and Biotechnologies,
Moscow, Russian Federation

Abstract: Development of sustainable biotechnologies for deep processing of grain raw materials requires effective mechanisms of obtaining strong wort for alcohol production. To provide qualitative characteristics of biochemical composition and rheological properties of strong wort, it is necessary to select optimal enzyme systems and conditions for deep conversion of high-molecular weight polymers of the grain. Previous research has proven the efficiency of carbohydrases for processing grain raw materials. However, there is little evidence on the catalytic effect of phytase, including in combination with other hydrolytic enzymes, on the degree of hydrolysis of polymers in grain raw materials when preparing strong wort. This paper demonstrates the effect of proteases and phytases in a multi-enzyme composition, as well as the conditions of enzymatic processing of raw materials, on the rheological and biochemical parameters of strong wort. Wheat, rye and corn were investigated. The synergism of the combined effect of studied hydrolases, including phytolytic and proteolytic enzymes, contributed to an increase in polymer conversion in this grain raw material and the concentration of soluble dry substances of the wort by 1.5 times. Using the proteases and phytases in the multi-enzyme composition allowed the concentration of the following components in the wort to be increased: glucose – by 1.2–1.3 times; amine nitrogen – by 1.5–2.2 times; phosphorus ions – by 1.4–4.3 times. Additionally, in the wort samples, the content of amino acids in the free form increased by over 4 times. It is shown that the pretreatment of grain raw materials at a temperature of 80–90°C for 6 hours and saccharification for 1–2 hours using a complete complex of enzymes containing α -amylase, glucoamylase, xylanase, protease and phytase, allows a strong wort with a dry matter content of over 30% to be obtained. Moreover, a significant decrease in viscosity was noted (particularly for rye wort – by 1.3–1.9 times). Our results confirm the essential role of enzymes exhibiting substrate specificity to protein and phytic polymers in grain raw materials.

Keywords: proteases, phytases, grain wort, carbohydrates, phosphates, amino acids, multienzyme composition

Acknowledgments: The study was supported by the Fundamental Scientific Research Program for the State Academies of Sciences.

For citation: Serba EM, Rimareva LV, Overchenko MB, Ignatova NI, Medrish ME, Pavlova AA, Sokolova EN. Selecting multi-enzyme composition and preparation conditions for strong wort. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2021;11(3):384–392. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-384-392>

ВВЕДЕНИЕ

Создание ресурсосберегающих биотехнологий производства спирта предусматривает прежде всего разработку эффективных способов подготовки зернового сырья для получения концентрированного сусла [1–4].

В настоящее время для получения этилового спирта по традиционной технологии используют зерновые среды, содержащие 18–22% растворимых сухих веществ. В результате их сбраживания образуется большое количество отхода производства – зерновой барды, которое более чем в 10 раз превышает объем целевого продукта – этанола. С целью снижения образования отходов необходимо повысить концентрацию перерабатываемого зернового сусла [1, 5, 6]. Проблема при этом заключается в том, что для приготовления качественного концентрированного сусла необходимо подобрать мультиэнзимную композицию и разработать условия ее биокаталитического действия, обеспечивающие глубокий гидролиз всех полимеров зернового сырья до ассимилируемых дрожжами углеводов и аминокислот. В работах ряда исследователей показана возможность повышения концентрации сухих веществ зернового сусла с использованием комплекса ферментов, катализирующих гидролиз крахмала, некрахмальных полисахаридов и белка. Однако при достижении концентрации сухих веществ сусла больше 25–28% существенно повышалась вязкость и снижались его качественные показатели, что негативно сказывалось на процессе

спиртового брожения [1, 5–9]. По-видимому, авторы не учитывали содержащиеся в зерне фитиновую кислоту или ее соли, являющиеся основным источником фосфора, которые представляют собой хелатные металлоорганические соединения, связывающие не только ионы минеральных веществ, но и образующие устойчивые углеводные и протеин-фитатные комплексы, что может негативно сказываться на обеспеченности дрожжей минеральным питанием [10–13]. По данным исследователей, применение фитолитических ферментов способствует распаду фитиновых соединений, высвобождению фосфора и других микроэлементов, что должно приводить к повышению качества зернового сусла, активизации жизнедеятельности спиртовых дрожжей [14–18]. Однако практически отсутствуют данные, касающиеся исследований каталитического действия фитазы, в том числе в комплексе с другими гидролитическими ферментами, на полимеры зернового сырья при приготовлении концентрированного сусла. Недостаточно изучено влияние условий ферментативной обработки зерна на биохимический состав и реологические свойства концентрированного сусла, содержащего более 30% сухих веществ.

Цель настоящих исследований состояла в подборе мультиэнзимной композиции, содержащей ферменты фитолитического действия, а также условий ферментативной обработки сырья на качество концентрированного зернового сусла.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве объектов для исследовательской работы были выбраны пшеница, рожь и кукуруза как наиболее широко применяемые в спиртовом производстве зерновые культуры. В целях декстринизации и осахаривания крахмала были рассмотрены ферментные препараты (ФП) – источники α -амилазы и глюкоамилазы; для гидролиза ксиланов и гемицеллюлозы – ксиланазы; для конверсии белковых веществ – протеазы; для деструкции фитиновых веществ – фитазы [1, 5, 6].

Переработку зернового сырья осуществляли по ферментативно-гидролитической схеме при температуре 60–90 °С и гидромодуле 1:1,8 [1, 6–8]. В зависимости от поставленных задач и стадии приготовления сусла варьировали составом ферментов. В контрольных вариантах сусла мультиэнзимная композиция включала следующие ферментные препараты: ФП-1 – как источник бактериальной термостабильной α -амилазы; ФП-2 – источник ксиланазы; ФП-3 – грибной α -амилазы; ФП-4 – глюкоамилазы. В опытных вариантах наряду с ферментами амилолитического, глюкоамилазного и ксиланазного действия для протеолиза белков дополнительно вводили препарат ФП-5 как источник кислой протеазы, а для гидролиза фитиновых веществ – ФП-6, содержащий фитазу.

Ферментативную активность ФП определяли стандартными методами:

- амилолитическую (АС) и глюкоамилазную (ГлС) – по ГОСТ Р 54430-2011;
- протеолитическую (ПС) – по ГОСТ Р 53974-2010;
- ксиланолитическую (КС) – по ГОСТ Р 55302-2012;
- фитолитическую (ФС) – по ГОСТ 31487-2012.

Состав основных полимеров зерна, содержание растворимых сухих (РСВ) и редуцирующих (РВ) веществ зернового сусла определяли в соответствии с инструкцией технохимического контроля спиртового производства¹; концентрацию аминного азота (NH_2^+) – медным способом²; содержание глюкозы и мальтозы – методом ВЭЖХ на хроматографе Shimadzu LC-20 (Япония) [19];

концентрацию ионов фосфора – методом капиллярного электрофореза с применением системы серии PrinCE-560 (Нидерланды), оснащенной кондуктометрическим детектором [20]. Динамическую вязкость зернового сусла определяли на синусоидальном вибрационном вискозиметре SV-10 (A&D Company Limited, Япония) с программным обеспечением Win-CT Viscosity методом вибрационной вискозиметрии [21]. Концентрацию аминокислот в зерновом сусле исследовали на аминокислотном анализаторе Knauer Eurochrom 2000 с последующим детектированием компонентов спектрофотометрическим детектором Smartline UV Detector 2500 (Германия) [5].

Статистическую обработку полученных экспериментальных данных не менее чем в 3-х повторностях осуществляли методом однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием Тьюки при $p < 0,05$ с использованием программы Statistica 6.0.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведены сравнительные исследования состава основных полимеров, содержащихся в исходном пшеничном, кукурузном и ржаном сырье, используемом для приготовления сусла (табл. 1). Результаты исследований подтвердили полученные ранее данные, что рожь отличалась наиболее высоким содержанием гемицеллюлоз, кукуруза – крахмала и фитатов, количество которых практически в 2 раза превосходило показатели пшеничного и ржаного зерна [15, 16, 22].

Исследовано влияние мультиэнзимных композиций, содержащих ферменты с различной субстратной специфичностью, и длительности процесса на степень гидролиза полисахаридов, белковых и фитиновых веществ и образование в концентрированном сусле растворимых углеводов (РВ), в том числе мальтозы и глюкозы, аминного азота и фосфатов. Алгоритм получения концентрированного зернового сусла с использованием исследуемых ФП представлен на рис. 1.

Таблица 1. Состав основных полимеров зернового сырья

Table 1. Composition of the main polymers of grain raw materials

Зерновое сырье	Состав полимеров, %			
	Крахмал	Гемицеллюлозы	Белки	Фитаты
Пшеница	59,5±2,9	4,3±0,2	12,5±0,5	1,2±0,03
Кукуруза	65,4±3,2	3,0±0,1	10,3±0,4	2,2±0,09
Рожь	57,1±2,8	10,8±0,4	11,9±0,5	1,1±0,05

Значения представлены в виде средних \pm стандартное отклонение.

¹Фирсов Н.Н. Микробиология: словарь терминов. М.: Дрофа, 2006. 256 с.

²Гребенщикова А.В. Подбор условий культивирования для бактерий рода *Bacillus* // Труды молодых ученых Алтайского государственного университета: материалы VII региональной молодежной конференции «Мой выбор – наука», XLVII научной конференции студентов, магистрантов, аспирантов и учащихся лицейных классов. Вып. 17. Барнаул: Изд-во Алтайского университета, 2020. С. 3–5.

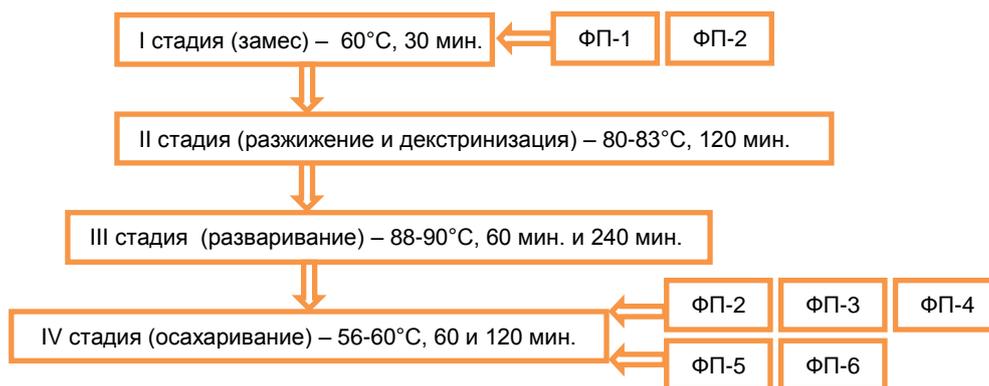


Рис. 1. Алгоритм ферментативно-гидролитического приготовления концентрированного зернового сусла (30% РСВ)

Fig. 1. Algorithm of enzymatic-hydrolytic preparation of concentrated grain wort (30% RSV)

Расход ФП осуществляли в соответствии с подобранными ранее дозировками [5, 7, 18]. Во всех вариантах приготовления сусла I-ая и II-ая стадии ферментативно-гидролитической обработки зернового сырья не различались (см. рис. 1). На I-й стадии с целью получения водно-мучного замеса (гидромодуль 1:1,8) вводили ФП-1 для разжижения и декстринизации крахмала в дозировке 0,9 ед. АС/г крахмала, и ФП-2 – в дозировке 0,3–0,7 ед. КС/г сырья (табл. 2). При дозировании ФП-2 учитывали, что наиболее высокое содержание некрахмальных полисахаридов отмечено в ржаном сырье (см. табл. 1).

Остальные ферментные препараты (ФП-3 – грибная α -амилаза, ФП-4 – глюкоамилаза, ФП-5 – протеаза, ФП-6 – фитаза) использовали на IV-й стадии (см. рис. 1, табл. 2). В контрольных вариантах в составе мультиэнзимных комплексов отсутствовали ферменты протеолитического и фитолитического действия. III-ая и IV-ая стадии приготовления сусла различались продолжительностью инкубации (табл. 3).

По окончании IV-й стадии получены образцы опытных и контрольных вариантов зернового сусла, содержащего 29,8–32,8% растворимых сухих веществ, что в 1,5 раза превышало кон-

центрацию сусла, приготовленного по классической технологии и содержащего 18–22% РСВ [2, 3]. Образцы сусла различались степенью конверсии полимеров в зависимости от длительности III-й и IV-й стадий ферментативно-гидролитической обработки сырья, а также от состава использованных ферментов (см. рис. 1, табл. 3).

Установлено, что длительная температурно-гидролитическая подготовка зернового замеса в течение 4-х ч (III-я стадия) и использование мультиэнзимной композиции, содержащей в своем составе наряду с амилазами и ксиланазами ферменты, катализирующие гидролиз белковых и фитиновых веществ, способствовало повышению содержания в сусле не только растворимых сухих и редуцирующих веществ, аминного азота, но и ассимилируемых дрожжами глюкозы и мальтозы, аминокислот в свободной форме и фосфатов (рис. 2, см. табл. 3). При увеличении длительности ферментативно-гидролитической обработки зернового замеса наблюдалось заметное снижение вязкости, особенно в ржаном сусле – в 1,4 раза (см. табл. 3), что, по-видимому, связано с более высоким содержанием в сырье гемицеллюлоз [17].

Таблица 2. Характеристика и расход ферментных препаратов для биокаталитической конверсии полимеров пшеничного, кукурузного и ржаного сусла

Table 2. Characteristics and consumption of enzymes for biocatalytic conversion of wheat, corn and rye wort polymers

Шифр ферментного препарата, основной фермент	*Активность фермента, ед./см ³	Расход фермента	Пшеница	Кукуруза	Рожь
			Дозировка фермента		
ФП-1 (Amylex, «Genencor», США), термостабильная α -амилаза	1980+70	ед. АС/г крахмала	0,9	0,9	0,9
ФП-2 (Tegazyme, «Genencor», США), ксиланаза	3600+150	ед. КС/г сырья	0,5	0,3	0,7
ФП-3 (Амилоризин, ВНИИПБТ, РФ), грибная α -амилаза	2500+100	ед. АС/г крахмала	0,9	0,9	0,9
ФП-4 (Diazyme X5, «Genencor», США), глюкоамилаза	8000+350	ед. ГЛС/г крахмала	15,0	15,0	15,0
ФП-5 (Протооризин, ВНИИПБТ, РФ), протеаза	640+30	ед. ПС/г сырья	0,4	0,4	0,4
ФП-6 (Phytaflow, Novozymes, Дания), фитаза	30000+1100	ед. ФС/г сырья	2,0	2,0	2,0

*Значения представлены в виде средних \pm стандартное отклонение.

Таблица 3. Физико-химическая характеристика пшеничного, кукурузного и ржаного сусла

Table 3. Physical and chemical characteristics of wheat, corn and rye wort

Вариант	Длительность стадии, ч		Вязкость, мПа·с	PCB, %	Содержание углеводов, %			Аминный азот, мг%	Ионы фосфора, мг/дм ³
	III ст.	IV ст.			РВ	глюкоза	мальтоза		
Пшеница									
Опыт	1	1	31,2±1,5	29,8±1,4	24,3±1,2	14,0±0,7	9,4±0,5	78,4±3,9	1739,0±87,0
	1	2	29,0±1,4	30,5±1,5	25,1±1,3	15,1±0,8	9,0±0,4	84,7±4,1	2262,1±113,1
	4	1	30,0±1,5	31,5±1,6	26,2±1,3	16,9±0,7	8,4±0,3	86,4±4,3	2395,5±119,8
	4	2	28,5±1,4	32,3±1,7	28,1±1,4	18,9±0,9	8,0±0,3	92,5±4,5	2840,0±142,0
Контроль	4	2	35,4±1,8	31,4±1,5	25,0±1,2	15,7±0,6	8,1±0,3	41,8±4,0	987,2±49,4
Кукуруза									
Опыт	1	1	38,4±1,9	30,4±1,5	25,8±1,3	15,0±0,7	8,4±0,3	57,2±2,8	964,2±48,2
	1	2	35,0±1,8	31,0±1,5	26,9±1,4	16,3±0,8	7,8±0,4	64,7±3,1	1230,2±61,5
	4	1	34,0±1,7	31,9±1,7	27,8±1,3	16,9±0,8	7,7±0,3	69,6±3,8	1389,4±69,5
	4	2	30,0±1,5	32,8±1,6	30,1±1,5	19,7±0,9	7,4±0,2	72,4±4,2	1401,7±70,2
Контроль	4	2	40,4±2,0	31,2±1,4	27,0±1,4	16,4±0,8	8,2±0,4	38,2±1,9	324,2±16,2
Рожь									
Опыт	1	1	233,5±11,7	30,0±1,5	23,0±1,1	7,3±0,4	13,8±0,7	80,6±4,0	1497,0±74,9
	1	2	183,0±9,4	30,4±1,5	23,9±1,2	8,5±0,5	13,4±0,6	86,2±4,3	1581,6±79,1
	4	1	220,1±11,2	30,6±1,5	23,2±1,0	9,7±0,5	12,4±0,6	88,1±4,4	1590,1±79,2
	4	2	168,0±8,6	30,9±1,5	25,1±1,4	11,5±0,6	12,0±0,5	95,9±4,9	1653,0±76,3
Контроль	4	2	310,9±15,2	30,2±1,4	23,8±1,2	9,1±0,5	12,3±0,6	43,2±4,1	1084,7±55,1

Значения представлены в виде средних ± стандартное отклонение.

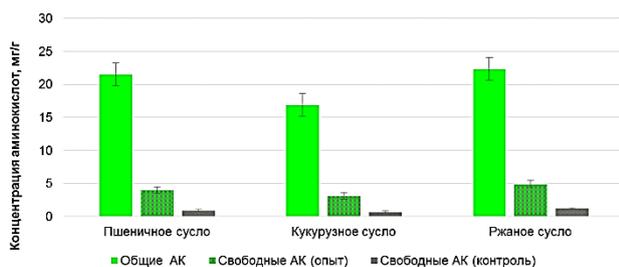


Рис. 2. Влияние механико-ферментативной обработки пшеничного, кукурузного и ржаного сусла на образование свободных аминокислот

Fig. 2. Effect of mechanical-enzymatic treatment of wheat, corn and rye wort on free amino acids formation

Более существенно на физико-химические характеристики концентрированного сусла влиял состав ферментного комплекса. Использование в составе мультиэнзимной композиции протеаз и фитаз позволило увеличить концентрацию глюкозы в 1,2–1,3 раза, аминного азота – в 1,5–2,2 раза, а ионов фосфора – в 1,4–4,3 раза. Полученное концентрированное сусло имело хорошие реологические свойства: вязкость пшеничного и кукурузного сусла снизилась в 1,2–1,3 раза, а ржаного – в 1,9 раза по сравнению с контрольными вариантами.

В опытных вариантах сусла отмечена также и более высокая степень гидролиза белка с образованием свободных аминокислот, ассимилируемых дрожжами, концентрация которых увеличилась более чем в 4 раза по сравнению с контролем (см. рис. 2).

Таким образом, подготовка зернового сырья при температуре 80–90 °С в течение 6 ч. (II-ая + III-я стадии) и продолжительности осахаривания в тече-

ние 1–2-х ч с использованием полного комплекса ферментов, содержащего ферменты амилолитического, ксиланолитического, протеолитического и фитазного действия, позволяет получить концентрированное зерновое сусло (более 30% PCB) с наиболее низкой вязкостью и высоким содержанием растворимых углеводов, свободных аминокислот и ионов фосфора.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований показано, что подобранный мультиэнзимный комплекс обеспечивает глубокий гидролиз высокомолекулярных полимеров зернового сырья: полисахаридов – с образованием моно- и дисахаров; белков – с накоплением аминного азота и свободных аминокислот; фитиновых веществ – с высвобождением фосфатов в биодоступной форме, и позволяет получить концентрированное сусло с содержанием PCB более 30%, что в 1,5 раза превышало концентрацию сусла, приготовленного по классической технологии и содержащего 18–22% PCB [2, 3, 17].

Установлено, что совместное действие исследованных гидролаз способствовало не только повышению степени конверсии полимеров зернового сырья, но и улучшению реологических свойств концентрированного сусла. Известно, что содержащиеся в зерне гемицеллюлозы оказывают негативное влияние на реологические свойства зернового сусла, что затрудняет атакуемость крахмала амилолитическими ферментами, приводит к снижению качественных показателей сусла и замедлению процесса брожения [5]. В проведенных ранее исследованиях была доказана возможность существенного снижения вязкости сус-

ла в результате биокаталитической конверсии ксиланов [4, 5, 17]. Итоги данных исследований показали, что при подготовке концентрированного суслу дополнительное включение в состав комплекса фитазы и протеазы способствовало еще большему снижению вязкости пшеничного и кукурузного суслу – в 1,2–1,3 раза, ржаного – в 1,9 раза, что, по-видимому, связано с синергизмом действия ферментов [17].

Показано, что выбранные параметры ферментативно-гидролитической подготовки сырья и длительность процесса (температуре 80–90 °С в течение 6 ч и продолжительность осахаривания в течение 1–2-х ч с использованием полного

комплекса ферментов) позволили максимально повысить концентрацию растворимых сухих веществ и степень гидролиза полисахаридов, белков и фитина в концентрированном зерновом сусле.

Таким образом, подобран состав мультиэнзимной композиции и условия ферментативно-гидролитической обработки зернового сырья, обеспечивающие получение качественного концентрированного суслу с хорошими реологическими свойствами и высоким содержанием растворимых сухих веществ, углеводов, свободных аминокислот и ионов фосфора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Серба Е.М., Оверченко М.Б., Римарева Л.В. Биотехнологические основы микробной конверсии концентрированного зернового суслу в этанол: монография. М.: Библио-Глобус, 2017. 120 с. <https://doi.org/10.18334/9785950050169>
2. Зуева Н.В., Агафонов Г.В., Корчагина М.В., Долгов А.Н., Чусова А.Е. Выбор ферментных препаратов и температурно-временных режимов водно-тепловой и ферментативной обработки при разработке комплексной технологии переработки зернового сырья // Вестник ВГУИТ. 2019. Т. 81. N 1. С. 112–119. <https://doi.org/10.20914/2310-1202-2019-1-112-119>
3. Кривченко В.А., Туршатов М.В., Соловьев А.О., Абрамова И.М. Спиртовое производство – технологическая основа комплексной переработки зерна с получением пищевых продуктов // Пищевая промышленность. 2019. N 4. С. 53–54. <https://doi.org/10.24411/0235-2486-2019-10027>
4. Родионова Н.А., Капельянец Л.В., Середницкий П.В., Килимник А.Ю. Гемилцеллюлозы зерна и ферменты, катализирующие их расщепление // Прикладная биохимия и микробиология. 1992. Т. 28. N 5. С. 645–664.
5. Серба Е.М., Абрамова И.М., Римарева Л.В., Оверченко М.Б., Игнатова Н.И., Грунин Е.А. Влияние ферментных препаратов на технологические показатели зернового суслу и качество спирта // Пиво и напитки. 2018. N 1. С. 50–54. <https://doi.org/10.24411/2072-9650-2018-00002>
6. Серба Е.М., Оверченко М.Б., Игнатова Н.И., Белокопытова Е.Н., Римарева Л.В. Состав концентрированного зернового суслу, приготовленного из различных видов зернового сырья // Актуальные вопросы индустрии напитков. 2018. N 2. С. 166–170. <https://doi.org/10.21323/978-5-6041190-3-7-2018-2-166-170>
7. Римарева Л.В., Оверченко М.Б., Игнатова Н.И., Шелехова Н.В., Серба Е.М., Мартыненко Н.Н. [и др.]. Влияние ферментных комплексов на метаболизм спиртовых дрожжей и накопление ионов неорганической природы в концентрированном зерновом сусле // Вестник российской сельскохозяйственной науки. 2016. N 3. С. 28–31.
8. Зуева Н.В., Агафонов Г.В., Корчагина М.В., Долгов А.Н. Влияние ферментных препаратов на основные показатели продуктов при разработке технологии переработки концентрированного суслу на этанол // Вестник ВГУИТ. 2017. Т. 79. N 2. С. 191–197. <https://doi.org/10.20914/2310-1202-2017-2-191-197>
9. Guillaume A., Thorigné A., Carré Y., Vinh J., Levavasseur L. Contribution of proteases and cellulases produced by solid-state fermentation to the improvement of corn ethanol production // Bioresources and Bioprocessing volume. 2019. Vol. 6. Issue 7. <https://doi.org/10.1186/s40643-019-0241-0>
10. Carli L.D., Schnitzler E., Ionashiro M., Szpogancz B., Rosso N.D. Equilibrium, thermoanalytical and spectroscopic studies to characterize phytic acid complexes with Mn (II) and Co (II) // Journal of the Brazilian Chemical Society. 2009. Vol. 20. Issue 80. P. 1515–1522. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532009000800019>
11. Benesova K., Belakova S., Mikulikova R., Svoboda Z. Survey of the analytical methods for the phytic acid determination // Kvasny Prumysl. 2013. Vol. 59. Issue 5. P. 127–133. <https://doi.org/10.1883/2/kp2013013>
12. Mikulski D., Klosowski G. Phytic acid concentration in selected raw materials and analysis of its hydrolysis rate with the use of microbial phytases during the mashing process // Journal of the Institute of Brewing. 2015. Vol. 121. Issue 2. P. 213–218. <https://doi.org/10.1002/jib.221>
13. Dost K., Tokul O. Determination of phytic acid in wheat and wheat products by reverse phase high performance liquid chromatography // Analytica Chimica Acta. 2006. Vol. 558. Issue 1-2. P. 22–27. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2005.11.035>
14. Greiner R., Konietzny U. Phytase for food application // Food Technology and Biotechnology. 2006. Vol. 44. Issue 2. P. 125–140.
15. Kruger J., Oelofse A., Taylor J., Taylor J.R.N. Potential for improvement in yeast nutrition in raw whole grain sorghum and maize lager brewing and bioethanol production through grain genetic modification and phytase treatment // Journal of the Institute

of Brewing. 2012. Vol. 118. Issue 1. P. 70–75. <https://doi.org/10.1002/jib.86>

16. Sapna, Singh B. Phytase production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation and its applicability in dephytinization of wheat bran // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2014. Vol. 173. Issue 7. P. 1885–1895. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0974-3>

17. Римарева Л.В., Оверченко М.Б., Игнатова Н.И., Кривова А.Ю., Серба Е.М. Генерация спиртовых дрожжей на средах, приготовленных из зерновых культур с различным содержанием фитата // *Пищевая промышленность*. 2019. N 4. С. 83–85. <https://doi.org/10.24411/0235-2486-2019-10042>

18. Polyakov V.A., Serba E.M., Overchenko M.B., Ignatova N.I., Rimareva L.V. Effects of a complex phytase-containing enzyme preparation on the rye fermentation process // *Foods and Raw Materials*. 2019. Vol. 7. Issue 2. P. 221–228. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2019-2-221-228>

19. Поляков В.А., Абрамова И.М., Медриш М.Э.,

Гаврилова Д.А., Павленко С.В. Применение жидкостной хроматографии для исследования органических кислот и углеводов в сусле и бражке // *Хранение и переработка сельхозсырья*. 2017. N 9. С. 20–23.

20. Шелехова Н.В., Римарева Л.В. Исследование ионного состава полупродуктов спиртового производства с использованием методов капиллярного электрофореза // *Производство спирта и ликероводочных изделий*. 2012. N 3. С. 25–27.

21. Шариков А.Ю., Иванов В.В., Амелякина М.В. Влияние перемешивания на эффективность ферментативного гидролиза высококонцентрированных сред экструдированного крахмала кукурузы // *Вестник ВГУИТ*. 2020. Т. 82. N 3. С. 96–103. <https://doi.org/10.20914/2310-1202-2020-3-96-103>

22. Абрамова И.М., Римарева Л.В., Туршатов М.В. Исходные требования к качеству зернового сырья, обеспечивающие высокие показатели эффективности производства спирта. М.: БиблиоГлобус, 2019. 114 с. <https://doi.org/10.18334/9785907063556>

REFERECES

1. Serba EM, Overchenko MB, Rimareva LV. *Biotechnological bases of microbial conversion of concentrated grain mash into ethanol*. Moscow: BiblioGlobus; 2017. 120 p. (In Russian) <https://doi.org/10.18334/9785950050169>

2. Zueva NV, Agafonov GV, Korchagina MV, Dolgov AN, Chusova AE. Selection of enzyme preparations and temperature-time regimes of water-heat and enzymatic treatment in the development of complex technology of processing of grain raw materials. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta inzhenernykh tekhnologii = Proceedings of VSUET*. 2019;81(1):112–119. (In Russian) <https://doi.org/10.20914/2310-1202-2019-1-112-119>

3. Krivchenko VA, Turshatov MV, Solovyev AO, Abramova IM. Ethanol production is a technological basis of grain complex processing with foodstuff producing. *Pishchevaya promyshlennost' = Food Industry*. 2019;4:53–54. (In Russian) <https://doi.org/10.24411/0235-2486-2019-10027>

4. Rodionova NA, Kaprel'yants LV, Serednitskii PV, Kilimnik AYu. Hemicelluloses of grains and enzymes that catalyze their breakdown. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya = Applied Biochemistry and Microbiology*. 1992;28(5):645–664. (In Russian)

5. Serba EM, Abramova IM, Rimareva LV, Overchenko MB, Ignatova NI, Grunin EA. Influence of enzymatic preparations on technological parameters of grain wort and quality of alcohol. *Pivo i napitki = Beer and beverages*. 2018;1:50–54. (In Russian) <https://doi.org/10.24411/2072-9650-2018-00002>

6. Serba EM, Overchenko MB, Ignatova NI, Belokopytova EN, Rimareva LV. Composition of concentrated grain wort, prepared from various types of grain raw materials. 2018;2:166–170. (In Russian) <https://doi.org/10.21323/978-5-6041190-3-7-2018-2-166-170>

7. Rimareva LV, Overchenko MB, Ignatova NI,

Shelekhova NY, Serba YeM, Martynenko NN, et al. Influence of ferment complexes on metabolism of alcoholic yeast and accumulation of ions of nonorganic nature in concentrated grain wort. *Vestnik Rossiiskoi sel'skokhozyaistvennoi nauki = Vestnik of the Russian Agricultural Science*. 2016;3:28–31. (In Russian)

8. Zueva NV, Agafonov GV, Korchagina MV, Dolgov AN. Effect of enzyme preparations on the main parameters of products in the development of processing technology of concentrated wort on ethanol. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta inzhenernykh tekhnologii = Proceedings of VSUET*. 2017;79(2):191–197. (In Russian) <https://doi.org/10.20914/2310-1202-2017-2-191-197>

9. Guillaume A, Thorigné A, Carré Y, Vinh J, Levavasseur L. Contribution of proteases and cellulases produced by solid-state fermentation to the improvement of corn ethanol production. *Bioresources and Bioprocessing*. 2019;6(7):12 p. <https://doi.org/10.1186/s40643-019-0241-0>

10. Carli LD, Schnitzler E, Ionashiro M, Szpoganicz B, Rosso ND. Equilibrium, termoanalytical and spectroscopic studies to characterize phytic acid complexes with Mn (II) and Co (II). *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2009;20(80):1515–1522. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532009000800019>

11. Benesova K, Belakova S, Mikulikova R, Svoboda Z. Survey of the analytical methods for the phytic acid determination. *Kvasny Prumysl*. 2013;59(5):127–133. (In Czech) <https://doi.org/10.18832/kp2013013>

12. Mikulski D, Klosowski G. Phytic acid concentration in selected raw materials and analysis of its hydrolysis rate with the use of microbial phytases during the mashing process. *Journal of the Institute of Brewing*. 2015;121(2):213–218. <https://doi.org/10.1002/jib.221>

13. Dost K, Tokul O. Determination of phytic acid in wheat and wheat products by reverse phase high

performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*. 2006;558(1-2):22–27. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2005.11.035>

14. Greiner R, Konietzny U. Phytase for food application. *Food Technology and Biotechnology*. 2006;44(2):125–140.

15. Kruger J, Oelofse A, Taylor J, Taylor JRN. Potential for improvement in yeast nutrition in raw whole grain sorghum and maize lager brewing and bioethanol production through grain genetic modification and phytase treatment. *Journal of the Institute of Brewing*. 2012;118(1):70–75. <https://doi.org/10.1002/jib.86>

16. Sapna, Singh B. Phytase production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation and its applicability in dephytinization of wheat bran. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2014;173(7):1885–1895. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0974-3>

17. Rimareva LV, Overchenko MB, Ignatova NI, Krivova AYU, Serba EM. Generation of alcoholic yeast on media prepared from cereals with different phytate content. *Pishchevaya promyshlennost' = Food Industry*. 2019;4:83–85. (In Russian) <https://doi.org/10.24411/0235-2486-2019-10042>

18. Polyakov VA, Serba EM, Overchenko MB, Ignatova NI, Rimareva LV. Effects of a complex phytase-containing enzyme preparation on the rye

fermentation process. *Foods and Raw Materials*. 2019;7(2):221–228. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2019-2-221-228>

19. Polyakov VA, Abramova IM, Medrish ME, GavriloVA DA, Pavlenko SV. The use of liquid chromatography for the study of organic acids and carbohydrates in wort and brew. *Khranenie i pererabotka sel'khozsyrya = Storage and processing of farm products*. 2017;9:20–23. (In Russian)

20. Shelekhova NV, Rimareva LV. Investigation of the ionic composition of intermediates in alcohol production using capillary electrophoresis methods. *Proizvodstvo spirta i likerovodochnykh izdelii*. 2012;3:25–27. (In Russian)

21. Sharikov AYU, Ivanov VV, Amelyakina MV. Effect of agitation on the efficiency of enzymatic hydrolysis of highly concentrated media of extruded corn starch. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta inzhenernykh tekhnologii = Proceedings of VSUET*. 2020;82(3):96–103. (In Russian) <https://doi.org/10.20914/2310-1202-2020-3-96-103>

22. Abramova IM, Rimareva LV, Turshatov MV. *Initial requirements for the quality of grain raw materials, providing high efficiency of alcohol production*. Moscow: Biblio-Globus; 2019. 114 p. (In Russian) <https://doi.org/10.18334/9785907063556>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Серба Елена Михайловна,

д.б.н., член-корреспондент РАН, заместитель директора ВНИИПБТ – филиала ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», 111033, Москва, Самокатная, 4б, Российская Федерация, e-mail: serbae@mail.ru

Римарева Любовь Вячеславовна,

д.т.н., академик РАН, главный научный сотрудник, ВНИИПБТ – филиал ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», 111033, Москва, Самокатная, 4б, Российская Федерация, e-mail: lrimareva@mail.ru

Оверченко Марина Борисовна,

к.т.н., ведущий научный сотрудник, ВНИИПБТ – филиал ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», 111033, Москва, Самокатная, 4б, Российская Федерация, e-mail: mb_over@mail.ru

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Elena M. Serba,

Dr. Sci. (Biology), Corresponding member of RAS; Deputy Director, Russian Research Institute of Food Biotechnology, Federal Research Center of Nutrition and Biotechnologies, 4b, Samokatnaya St., Moscow, 111033, Russian Federation, e-mail: serbae@mail.ru

LuyboV V. Rimareva,

Dr. Sci. (Engineering), Academician of RAS, Chief Researcher, Russian Research Institute of Food Biotechnology, Federal Research Center of Nutrition and Biotechnologies, 4b, Samokatnaya St., Moscow, 111033, Russian Federation, e-mail: lrimareva@mail.ru

Marina B. Overchenko,

Cand. Sci. (Engineering), Leading Researcher, Russian Research Institute of Food Biotechnology, Federal Research Center of Nutrition and Biotechnologies, 4b, Samokatnaya St., Moscow, 111033,

Russian Federation,
e-mail: mb_over@mail.ru

Игнатова Надежда Иосифовна,
научный сотрудник,
ВНИИПБТ – филиал ФГБУН
«ФИЦ питания и биотехнологии»,
111033, Москва, Самокатная, 4б,
Российская Федерация,
e-mail: ignatova59@mail.ru

Nadezda I. Ignatova,
Researcher,
Russian Research Institute of Food
Biotechnology,
Federal Research Center of Nutrition
and Biotechnologies,
4b, Samokatnaya St., Moscow, 111033,
Russian Federation,
e-mail: ignatova59@mail.ru

Медриш Марина Эдуардовна,
к.т.н., заведующая испытательной
лабораторией технологического контроля
и арбитражных методов анализа,
ВНИИПБТ – филиал ФГБУН
«ФИЦ питания и биотехнологии»,
111033, Москва, Самокатная, 4б,
Российская Федерация,
e-mail: medrishm@mail.ru

Marina E. Medrish,
Cand. Sci. (Engineering),
Head of Testing Laboratory of Technological
Control and Arbitration Analysis Methods,
Russian Research Institute of Food
Biotechnology,
Federal Research Center of Nutrition
and Biotechnologies,
4b, Samokatnaya St., Moscow, 111033,
Russian Federation,
e-mail: medrishm@mail.ru

Павлова Анжелика Андреевна,
инженер-технолог 1-й категории,
ВНИИПБТ – филиал ФГБУН
«ФИЦ питания и биотехнологии»,
111033, Москва, Самокатная, 4б,
Российская Федерация,
e-mail: pavlovaanzhelika98@gmail.ru

Anzhelika A. Pavlova,
Engineer-technologist,
Russian Research Institute of Food
Biotechnology,
Federal Research Center of Nutrition
and Biotechnologies,
4b, Samokatnaya St., Moscow, 111033,
Russian Federation,
e-mail: pavlovaanzhelika98@gmail.ru

Соколова Елена Николаевна,
к.б.н., ведущий научный сотрудник,
ВНИИПБТ – филиал ФГБУН
«ФИЦ питания и биотехнологии»,
111033, Москва, Самокатная, 4б,
Российская Федерация,
✉ e-mail: elenaniksokolova@inbox.ru

Elena N. Sokolova,
Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher,
Russian Research Institute of Food
Biotechnology,
Federal Research Center of Nutrition
and Biotechnologies,
4b, Samokatnaya St., Moscow, 111033,
Russian Federation,
✉ e-mail: elenaniksokolova@inbox.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 04.03.2021.
Одобрена после рецензирования 23.08.2021.
Принята к публикации 30.08.2021.*

*The article was submitted 04.03.2021.
Approved after reviewing 23.08.2021.
Accepted for publication 30.08.2021.*

Оригинальная статья / Original article

УДК 579.66

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-393-402>



Разработка пробиотика для животных и аквакультуры на основе штаммов *Bacillus toyonensis* B-13249 и *Bacillus pumilus* B-13250

© А.В. Малкова, И.Ю. Евдокимов, М.В. Ширманов,
А.Н. Иркитова, Д.Е. Дудник

Алтайский государственный университет, ИЦ «Промбиотех»,
г. Барнаул, Российская Федерация

Резюме: Цель настоящего исследования – разработать пробиотик для животных и аквакультуры на основе штаммов *Bacillus toyonensis* B-13249 и *Bacillus pumilus* B-13250. Осуществлен подбор питательной среды для культивирования посевного материала данных микроорганизмов, а также проведен ряд ферментаций бактерий рода *Bacillus* в биологических реакторах емкостью 15 и 250 л. Отработана технология получения готового пробиотика для животных и аквакультуры. Установлено, что L-бульон является наиболее оптимальной питательной средой для культивирования изученных штаммов. В ходе культивирования штаммов *B. toyonensis* B-13249 и *B. pumilus* B-13250 в ферментерах выявлено, что спорообразование начинается через 4–8 ч ферментации. На ферментативной среде, в отличие от вегетативной, бациллы развивают более высокие оптическую плотность (максимальное значение у штамма *B. pumilus* – $2,400 \pm 0,149$), значение pH (максимальное значение у штамма *B. toyonensis* – $8,483 \pm 0,609$) и титр (не менее 10^{10} КОЕ/г). Через 20–24 ч инкубирования оба штамма бацилл в ферментаторе почти полностью переходят в эндоспоры, это служит сигналом для начала центрифугирования биомассы. Получено: с 15-литрового ферментера – $83,3 \pm 6,1$ г концентрата, с 250-литрового – $499,8 \pm 51,4$ г. Численность бацилл в концентрированном состоянии для обоих штаммов составила не менее $1 \cdot 10^{11}$ КОЕ/г. Для получения готового препарата бактериальные концентраты смешивали с мальтодекстрином до титра не менее $1 \cdot 10^{10}$ КОЕ/г. Численность бактерий в препарате проверяли в течение года ежемесячно, значение менее $1 \cdot 10^{10}$ КОЕ/г не было зафиксировано. Таким образом, для выращивания материнской культуры штаммов *B. toyonensis* B-13249 и *B. pumilus* B-13250 наиболее благоприятна L-среда, а для культивирования в ферментерах – ферментативная питательная среда. Срок хранения биопрепарата на основе бацилл – не менее 12 мес., в течение которых сохраняется не только титр бактерий (не менее $1 \cdot 10^{10}$ КОЕ/г) и их жизнеспособность, но также поликомпонентность, цвет и консистенция препарата.

Ключевые слова: *Bacillus pumilus*, *Bacillus toyonensis*, аквакультура, пробиотики, ферментация

Для цитирования: Малкова А.В., Евдокимов И.Ю., Ширманов М.В., Иркитова А.Н., Дудник Д.Е. Разработка пробиотика для животных и аквакультуры на основе штаммов *Bacillus toyonensis* B-13249 и *Bacillus pumilus* B-13250. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т. 11. N 3. С. 393–402. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-393-402>

Development of a probiotic for animals and aquaculture based on *Bacillus toyonensis* B-13249 and *Bacillus pumilus* B-13250 strains

Angelina V. Malkova, Ivan Yu. Evdokimov, Maxim V. Shirmanov,
Alena N. Irkitova, Dina E. Dudnik

Altai State University, Engineering Center “Prombiotech”,
Barnaul, Russian Federation,

Abstract: This article aims to develop a probiotic for animals and aquaculture based on the *Bacillus toyonensis* B-13249 and *Bacillus pumilus* B-13250 strains. The selection of a nutrient medium was conducted for cultivating the inoculum of these microorganisms. Several bacteria fermentations of the *Bacillus* genus were performed in biological reactors with a capacity of 15 and 250 l. A technology for obtaining a finished probiotic for animals and aquaculture was developed. The results indicate that L-broth is the most optimal nutrient medium for cultivating the studied strains. The cultivation of *B. toyonensis* B-13249 and

B. pumilus B-13250 strains in fermenters revealed that sporulation begins after 4–8 hours of fermentation. In contrast to the vegetative medium, the fermentative medium helped the bacilli develop a higher optical density (the maximum value in the *B. pumilus* strain – 2.400 ± 0.149), pH value (maximum value in the *B. toyonensis* strain – 8.483 ± 0.609) and titer (at least 10^{10} CFU/g). After 20–24 hours of incubation, both strains of bacilli in the fermenter, almost completely pass into endospores, which serve as a signal for the start of biomass centrifugation. This was indicated by the following: from a 15 l fermenter – 83.3 ± 6.1 g of concentrate, from a 250 l fermenter – 499.8 ± 51.4 g. The number of bacilli in a concentrated state was at least $1 \cdot 10^{11}$ CFU/g for both strains. Obtaining a finished preparation required mixing bacterial concentrates with maltodextrin to a titer of at least $1 \cdot 10^{10}$ CFU/g. The number of bacteria in the preparation checked every month during the year, recorded no value less than $1 \cdot 10^{10}$ CFU/g. Thus, L-broth is most favorable for growing the mother culture of the *B. toyonensis* B-13249 and *B. pumilus* B-13250 strains, and fermentative nutrient medium – for the cultivation in fermenters. The expiry date of the bacilli-based biological preparation is at least 12 months, during which the drug's polycomponence, color and consistency are preserved, in addition to the bacteria titer (at least $1 \cdot 10^{10}$ CFU/g) and their viability.

Keywords: *Bacillus pumilus*, *Bacillus toyonensis*, aquaculture, probiotics, fermentation

For citation: Malkova AV, Evdokimov IYu, Shirmanov MV, Irkitova AN, Dudnik DE. Development of a probiotic for animals and aquaculture based on *Bacillus toyonensis* B-13249 and *Bacillus pumilus* B-13250 strains. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(3):393–402. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-393-402>

ВВЕДЕНИЕ

Микробные биопрепараты состоят из живых клеток или спор микроорганизмов, а также продуктов их метаболизма, отобранных по полезным и технологически ценным свойствам [1]. В последние годы увеличилось количество исследований, направленных на разработку биопрепаратов, содержащих спорообразующие бактерии рода *Bacillus* в качестве основы. Это обусловлено тем, что многие виды бацилл имеют особые свойства, которые дают возможность использовать их в качестве объектов для разработки бактериальных препаратов. К таким характеристикам можно отнести:

1) безопасность для человека и позвоночных животных (за исключением некоторых патогенных представителей группы *Bacillus cereus* [2]);

2) способность производить антимикробные вещества и различные токсины (бактерии рода *Bacillus* известны как активные антагонисты по отношению к различным патогенным микроорганизмам и вредителям сельского хозяйства [3–6]);

3) способность к спорообразованию, благодаря которой увеличивается жизнеспособность и сохраняемость бацилл в окружающей среде [7] и непосредственно в препаратах, а также обеспечивается высокая выживаемость клеток при различных технологических операциях (заморозка, сушка и пр.).

Типовым видом р. *Bacillus* является *B. subtilis*, который лучше всего изучен и поэтому чаще используется для производства биопрепаратов. Например, такие пробиотики, как Субтилис, Проваген и Олин, содержащие штаммы вида *B. subtilis*, способствуют увеличению рентабельности выращивания порослят на 12,8, 17,1 и 18,2% соответственно [8]. В ходе экспериментов, проведенных иранскими учеными, было установлено,

что у креветок, при выращивании которых применялись пробиотические препараты на основе бацилл, наблюдался повышенный уровень выживаемости, а также более эффективное усвоение пищи [9]. Корейские исследователи установили, что штаммы *B. subtilis* KA1 и *B. subtilis* KA3 улучшают усвоение пищи креветками *Palaeomon paucidens*, а также способствуют их выживаемости при такой вирусной инфекции, как синдром белого пятна [10]. Ученые из Китая в ходе своих экспериментов доказали, что пробиотические бактерии *B. coagulans* ATCC 7050 в концентрации $1 \cdot 10^9$ КОЕ/г эффективнее всего действуют на морфологию кишечника, иммунный ответ и устойчивость к *Vibrio parahaemolyticus* у креветок *Litopenaeus vannamei*, а также улучшают их рост [11]. Иранские ученые показали, что пробиотический штамм *B. subtilis* оказывает положительный эффект на микрофлору кишечника, рост и развитие немого, или японского, перепела [12].

Сегодня ученые стремятся расширить пул видов р. *Bacillus*, которые могут быть использованы в различных отраслях народного хозяйства, поэтому активно изучают их безопасность и антагонистическую активность. Вид *B. pumilus* является продуцентом антибиотика амикумацин А, который обладает противомикробным действием в отношении таких патогенов человека и животных, как *Helicobacter pylori*, *Leuconostoc mesenteriodes*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium smegmatis*, *Escherichia coli*, *St. epidermidis* [13, 14]. Авторами работы [15] было установлено, что штамм *B. pumilus* AQAHBS01 в составе пробиотика способен повышать иммунный ответ и устойчивость к *Streptococcus agalactiae* у нильской тилапии. Другой группой ученых было доказано, что штамм *B. pumilus* H2 имеет большой потенциал для профилактики и лечения

вibriоза рыб в аквакультуре [16]. В работе [17] продемонстрировано, что пробиотик на основе штаммов *B. amyloliquefaciens* 54A и *B. pumilus* 47B увеличивает скорость роста и устойчивость к инфекции, вызываемой *Edwardsiella ictaluri*, у полосатого сома.

В состав пробиотика Toyoserin входит штамм *B. toyonensis* ВСТ-7112Т. В 1994 г. данный препарат был одобрен в Европе, и таким образом штамм ВСТ-7112Т стал первым микроорганизмом, разрешенным в качестве кормовой добавки в Европейском Союзе [18]. Было установлено, что данный биопрепарат улучшает здоровье и показатели роста поросят [19]. В другом эксперименте было доказано, что добавление к пище пробиотика Toyoserin® положительно влияет на продуктивность кроликов [20]. Также было зафиксировано, что применение препарата Toyoserin® в рационе угрей приводит к снижению их смертности от *Edwardsiella* spp. [21].

На основании всех перечисленных фактов, а также ввиду необходимости постоянной ротации штаммов в составе биопрепаратов ради сохранения их эффективности разработка многокомпонентного пробиотика из штаммов *B. pumilus* и *B. toyonensis* актуальна для развития и экологизации различных отраслей сельского хозяйства и аквакультуры. В предыдущих исследованиях нами было установлено, что штаммы *B. toyonensis* В-13249 и *B. pumilus* В-13250 обладают антагонистической активностью по отношению к *E. coli*, *Candida albicans*, *St. aureus*, *St. epidermidis*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Pseudomonas aeruginosa* [22, 23]. Данные микроорганизмы являются возбудителями инфекционных заболеваний у птиц, крупного рогатого скота, домашних животных, креветок и рыб, поэтому разработка пробиотика на основе выбранных штаммов является перспективной.

После селекции лучших штаммов с необходимой биологической активностью перед исследователями встает задача масштабирования процесса получения биомассы микроорганизмов или их метаболитов. Для этого необходимо подобрать режимы культивирования отобранных бактерий в ферментерах, а также отработать технологию производства биопрепарата.

Цель настоящего исследования заключалась в разработке пробиотика для животных и аквакультуры на основе штаммов *B. toyonensis* В-13249 и *B. pumilus* В-13250.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве объектов исследования использовали два штамма ризосферных споровых бактерий: *B. toyonensis* В-13249 и *B. pumilus* В-13250. Оба штамма запатентованы и задепонированы во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ).

Питательные среды и реактивы, использо-

ванные в работе, их состав.

Л-среда, г/л: дрожжевой экстракт – 5,0; пептон – 15,0; NaCl – 5,0; агар – 15,0; дистиллированная вода – 1,0 л. Стерилизация в автоклаве. Для приготовления жидкого Л-бульона использован этот же состав, только без добавления агара.

Среда Эндо: 37 г сухой среды вносили в 1000±50 мл холодной воды, смесь тщательно кипятили в течение 3–5 мин и фильтровали через ватно-марлевый фильтр (при наличии осадка) по ГОСТ 28085-2013. Данную среду использовали для проверки наличия в пробах бактерий группы кишечной палочки.

Вегетативная питательная среда, г/л: дрожжевой экстракт – 5; пептон – 3; NaH₂PO₄ – 1; K₂HPO₄ – 4; MgSO₄ – 0,25; MnSO₄ – 0,03; NaCl – 1; CaCl₂ – 1; FeSO₄ – 0,01; глюкоза – 15; дистиллированная вода – до 1 л. (рН = 6,8–7,0). Раствор глюкозы готовили отдельно: 150 г кристаллической глюкозы растворяли в горячей дистиллированной воде, доводили объем до 0,3 л и стерилизовали в автоклаве при давлении 0,08 МПа в течение 40 мин.

Ферментативная питательная среда, г/л: меласса – 25; кукурузный экстракт – 12,5; дрожжевой экстракт – 1; триптон – 0,5; MgSO₄ – 0,25; MnSO₄ – 0,03; CoCl₂ – 1; солевой сток – 10 мкл; дистиллированная вода – 1 л. Для приготовления солевого стока в небольшом количестве дистиллированной воды растворяли 1 г FeSO₄ и 1 г CuSO₄, затем доводили объем до 100 мл.

Защитная среда, г/л: желатин – 25, сахароза – 100.

Посевной материал составлял около 10% объема питательной среды в ферментере. Для приготовления посевного материала штаммы глубинно засевали петлей в колбы на 500 мл с объемом питательной среды 150 мл. Культивировали в шейкер-инкубаторе Innova 44 (New Brunswick, США) при температуре 37 °С в течение 24 ч со скоростью 250 об./мин (эксцентриситет – 5 см). Подсчет численности бацилл, а также проверку чистоты процесса ферментации и готового препарата осуществляли путем поверхностного посева на среды и дальнейшего инкубирования в термостате Binder BD 115 (Германия) при 37 °С в течение 24 ч [24].

Глубинное культивирование каждого штамма проводили в биореакторах объемом 15 и 250 л (ООО «Сторге», г. Санкт-Петербург). Для получения большего количества бактериальных концентратов *B. pumilus* и *B. toyonensis* ферментацию осуществляли в биореакторе объемом 250 л с ферментативной питательной средой, предварительно выращив микробные культуры бацилл до стадии активного деления на вегетативной питательной среде в биореакторе на 15 л. Перед загрузкой питательной среды биореактор, и в особенности индивидуальный воздушный фильтр, предварительно стерилизовали острым паром в

течение 1 ч при 121–125 °С и давлении 0,13–0,15 МПа.

Для биореактора объемом 15 л готовили 10 л вегетативной среды, доля посевного материала составляла не менее 10% от этого объема. Для биореактора объемом 250 л готовили 180 л ферментативной среды. Культуру, выращенную в 15-литровом биореакторе, использовали как посевной материал для ферментации в 250-литровом биореакторе. Для поддержания необходимого рН использовали 10%-й раствор NaOH и 10%-й раствор HCl. В качестве пеногасителя использовали лапрол. Ферментативную и вегетативную среды стерилизовали непосредственно в биореакторе при температуре 121–125 °С в течение 1 ч при давлении 0,13–0,15 МПа.

После засева ферментера температуру культуральной жидкости поддерживали на уровне 37±1 °С. В начале процесса в ферментер непрерывно подавали стерильный воздух в количестве 0,5 л/мин на 1 л среды и поддерживали давление 0,02–0,03 МПа, перемешивали со скоростью 250 об./мин. Каждые 2 ч производили стерильный отбор проб для проведения наблюдений за развитием бактериальной культуры, морфологическим состоянием и отсутствием посторонней микрофлоры, а также измерения оптической плотности культуральной жидкости (при 490 нм).

Целевым продуктом ферментации является биомасса бактерий, поэтому ее концентрировали путем центрифугирования. Процесс вели на проточной центрифуге GTGQ-1251 Tubular Centrifuge (Китай) при 15000 об./мин в случае ферментации в 250 л биореакторе и на центрифуге SIGMA 4-16S/KS (Япония) в течение 20 мин при 4100 об./мин после культивирования бацилл в ферментере объемом 15 л.

Еще одним этапом в производстве биопрепарата является его высушивание в замороженном состоянии в условиях вакуума или лиофилизации¹. После концентрирования биомассу смешивали с предварительно простерилизованной защитной средой, замораживали и отправляли в камеру лиофильной сушки SP Scientific 25L Genesis SQ Super ES-55 (США) (250 л) или Epsilon 1-4 LSCplus (Германия) (15 л). Время сушки составляло около 40 ч, после чего биомассу извлекали, измельчали и проверяли на содержание влаги с помощью анализатора влажности MOC63u Shimadzu (Япония). Как правило, после 40 ч сушки содержание влаги в готовом концентрате было минимальным – менее 5%.

Конечным этапом производства биопрепара-

та являлся процесс смешивания с наполнителем для получения желаемого титра. В качестве наполнителя был выбран мальтодекстрин. В течение года хранения также проверяли численность бактерий в готовом препарате. Для получения готового препарата использовали смеситель периодического действия типа «пьяная бочка», в котором сухой концентрат смешивали с мальтодекстрином в течение 60 мин в соотношении, необходимом для получения титра бацилл в готовом препарате не менее $1 \cdot 10^{10}$ КОЕ/г.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При выращивании посевного материала в колбах при 37 °С на вегетативной среде и L-бульоне оба штамма вырастают за 18–24 ч, и визуально это заметно в виде образования мути по всей колбе. Результаты по подбору питательной среды для культивирования посевного материала представлены на VII региональной молодежной конференции «Мой выбор – наука»².

Согласно полученным ранее данным, численность живых клеток при культивировании посевного материала на изучаемых средах отличалась: штамм *B. toyonensis* имел численность, КОЕ/мл: на вегетативной среде – $4,6(\pm 2,0) \cdot 10^8$ (M±m), на L-бульоне – $5,9(\pm 1,6) \cdot 10^9$ (M±m); штамм *B. Pumilus*: на вегетативной среде – $4,7(\pm 2,5) \cdot 10^8$ (M±m), на L-бульоне – $2,4(\pm 0,8) \cdot 10^9$ (M±m). Исходя из полученных данных L-среду можно считать наиболее оптимальной для культивирования посевного материала.

Установлено, что в начале ферментации идет увеличение количества клеток микроорганизмов, изменяется их размер, активно потребляются питательные вещества из среды, что ведет к снижению показателя рН и количества растворенного кислорода. Для поддержания уровня рН в среде в диапазоне 6,8–7,0 в нее автоматически перистальтическим насосом Etatron добавляли 10%-й раствор NaOH. Подачу воздуха регулировали механически по показателям ротаметра. Через 6–8 ч титрование заканчивалось, начиналось выделение в среду ферментов и других продуктов жизнедеятельности микроорганизмов. Поскольку в этот период возможно пенообразование, регулировка количества (высоты) образовавшейся пены производилась механически периодическим включением перистальтического насоса, отвечающего за подачу пеногасителя.

После того как микроорганизмами были использованы все питательные элементы среды, наблюдалось повышение уровня рН вплоть до

¹Фирсов Н.Н. Микробиология: словарь терминов. М.: Дрофа, 2006. 256 с.

²Гребенщикова А.В. Подбор условий культивирования для бактерий рода *Bacillus* // Труды молодых ученых Алтайского государственного университета: материалы VII региональной молодежной конференции «Мой выбор – наука», XLVII научной конференции студентов, магистрантов, аспирантов и учащихся лицейных классов. Вып. 17. Барнаул: Изд-во Алтайского университета, 2020. С. 3–5.

8,5–9,0. При pH = 8,2–8,5 начинается активное спорообразование, во время которого бациллы активно дышат, поэтому в это время применяли интенсивную аэрацию. После окончания спорообразования уровень растворенного кислорода достигал 50–100%, что говорит об отсутствии дыхания и окончании процесса ферментации.

На протяжении всего процесса ферментации производились замеры оптической плотности среды. По окончании выравнивания pH оптическая плотность среды практически не изменялась. При наступлении фазы активного спорообразования оптическая плотность уменьшалась незначительно (22–24 ч роста) и после принимала постоянное значение. Это свидетельствует о том, что культура полностью перешла в споры.

В табл. 1 представлены средние результаты по показателям ферментации штаммов *B. pumilus* и *B. toyonensis* на ферментативной питательной среде. Штамм *B. toyonensis* в процессе роста сильнее смещает pH среды от первоначального значения, чем штамм *B. pumilus*. К 20–24 ч культивирования у обоих штаммов бацилл заканчивается процесс спорообразования, вегетативных клеток фактически не остается.

По окончании процесса ферментации концентраты лиофилизированные на центрифуге, а затем высушенные в лиофильной сушке бактериальные концентраты использовали для дальнейших исследований. Масса концентратов как штамма *B. pumilus*, так и штамма *B. toyonensis*, получаемая с 15-литрового ферментера, в среднем составляла 83,3±6,1 г, с 250-литрового – 1499,8±51,4 г.

Как видно из данных, приведенных в табл. 2,

на ферментативной питательной среде бактерии р. *Bacillus* развивают численность на 1 порядок выше, поэтому сушка после культивирования осуществлялась именно на этой питательной среде, в результате чего численность бактерий возросла еще на 1 порядок.

Полученные концентраты смешивали с мальтодекстрином до итогового титра препарата не менее $1 \cdot 10^{10}$ КОЕ/г. Соотношение *B. toyonensis* и *B. pumilus* всегда составляло 1:3. Поскольку штамм *B. pumilus* развивает более высокую численность, его преобладание в препарате экономически оправдано.

Ввиду того что готовый бактериальный препарат является поликомпонентным, в нем можно наблюдать два морфологически различных вида бацилл (рисунок). Санитарно-показательные микроорганизмы из группы кишечной палочки (БГКП) ни в концентратах, ни в готовом бактериальном препарате на момент их получения обнаружены не были.

Для установления срока годности готового микробного препарата на протяжении времени хранения при 5 °С проверяли изменение титра бацилл, а также наличие, либо отсутствие, посторонней микрофлоры (табл. 3).

В ходе хранения препарата в течение 12 месяцев титр менее $1 \cdot 10^{10}$ КОЕ/г не зафиксирован. Посторонняя микрофлора не обнаружена (в том числе БГКП), поэтому можно сказать, что срок хранения биопрепарата на основе бацилл – не менее 12 месяцев. Однако для установления окончательного срока годности необходимо вести дальнейшее наблюдение.

Таблица 1. Показатели ферментации штаммов бацилл

Table 1. Indices of bacilli strains fermentation

Время ферментации, ч	Питательная среда	pH (M±m)		Оптическая плотность (M±m)	
		Штамм			
		<i>B. pumilus</i>	<i>B. toyonensis</i>	<i>B. pumilus</i>	<i>B. toyonensis</i>
0	Вегетативная	6,755±0,063	6,657±0,149	0,269±0,073	0,233±0,023
	Ферментативная	6,632±0,362	6,875±0,106	0,639±0,165	0,531±0,159
2	Вегетативная	7,025±0,050	6,860±0,228	1,236±0,132	0,861±0,069
	Ферментативная	6,906±0,054	7,127±0,424	1,187±0,309	0,795±0,224
4	Вегетативная	7,250±0,509	7,018±0,520	1,838±0,519	1,904±0,247
	Ферментативная	7,214±0,371	8,063±0,146	1,706±0,513	1,464±0,313
6	Вегетативная	7,385±0,671	8,013±0,549	1,860±0,040	2,011±0,120
	Ферментативная	7,5694±0,354	8,465±0,148	1,931±0,419	1,672±0,192
20–24	Вегетативная	7,655±0,191	8,230±0,347	1,926±0,037	2,090±0,317
	Ферментативная	7,890±0,193	8,483±0,609	2,400±0,149	2,042±0,421

Таблица 2. Численность бацилл после культивирования в ферментерах и сушки

Table 2. The number of bacilli after cultivation in fermenters and drying

Штамм	Титр, КОЕ		
	Вегетативная среда, КОЕ/мл	Ферментативная среда, КОЕ/мл	Лиофилизированный концентрат, КОЕ/г
<i>B. toyonensis</i>	$4,3(\pm 0,9) \cdot 10^9$	$2,5(\pm 0,8) \cdot 10^{10}$	$3,6(\pm 0,6) \cdot 10^{11}$
<i>B. pumilus</i>	$4,6(\pm 0,9) \cdot 10^9$	$5,2(\pm 1,6) \cdot 10^{10}$	$5,8(\pm 1,6) \cdot 10^{11}$



Внешний вид колоний бацилл в готовом препарате:
 1 – КОЕ *B. toyonensis*; 2 – КОЕ *B. pumilus*

Colonies of bacilli in the finished preparation:
 1 – CFU of *B. toyonensis*; 2 – CFU of *B. pumilus*

Таблица 3. Изменение численности бацилл в готовом биопрепарате в ходе хранения

Table 3. Change in the number of bacilli in the finished biological product during storage

Срок хранения	Титр, КОЕ/г (M±m)
1 день	1,3(±0,3)·10 ¹⁰
1 месяц	1,9(±0,1)·10 ¹⁰
2 месяца	2,6(±0,2)·10 ¹⁰
3 месяца	3,5(±0,4)·10 ¹⁰
4 месяца	2,9(±0,3)·10 ¹⁰
5 месяцев	2,6(±0,3)·10 ¹⁰
6 месяцев	2,3(±0,5)·10 ¹⁰
7 месяцев	3,5(±0,9)·10 ¹⁰
8 месяцев	1,0(±0,1)·10 ¹⁰
9 месяцев	1,5(±0,2)·10 ¹⁰
10 месяцев	1,9(±0,4)·10 ¹⁰
11 месяцев	1,7(±0,1)·10 ¹⁰
12 месяцев	1,4(±0,3)·10 ¹⁰

Стоит отметить особо, что на протяжении времени хранения оба штамма бацилл сохраняют свою жизнеспособность, т.е. препарат остается поликомпонентным. Об этом свидетельствует рост двух различных по морфологии типов колоний бактерий р. *Bacillus*, характерных для штаммов *B. toyonensis* и *B. pumilus*. Также в течение 12 месяцев хранения цвет и консистенция препарата остались неизменными. Посторонние запахи выявлены не были.

ВЫВОДЫ

1. Для культивирования материнской закваски (посевного материала) на основе бацилл наиболее благоприятна L-жидкая питательная среда. Численность живых клеток на ней составляет, КОЕ/мл: у штамма *B. pumilus* – 2,4(±0,8)·10⁹; у *B. toyonensis* – 5,9(±1,6)·10⁹.

2. Разработаны режимы культивирования *B. pumilus* и *B. toyonensis* в ферментационных установках, определены оптимальные условия культивирования для роста и спорообразования бацилл: температура выращивания – 37 °С; pH = 6,8–7,0; время роста – 22–24 ч; уровень растворенного кислорода – 50%.

3. Для наращивания биомассы бацилл в био-реакторе наиболее благоприятна ферментативная среда. При культивировании на ней бактерии *Bacillus* развивают численность на 1 порядок выше (не менее 2,5(±0,8)·10¹⁰ КОЕ/мл), чем на вегетативной (не менее 4,3(±0,9)·10⁹ КОЕ/мл).

4. Отработана технология получения готового биопрепарата на основе лиофилизированных концентратов штаммов *B. pumilus* и *B. toyonensis* с титром не менее 1·10¹⁰ КОЕ/г и мальтодекстрином в качестве наполнителя.

5. Установлен предварительный срок годности готового бактериального препарата – не менее 12 месяцев при температуре хранения 4–5 °С.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Муродова С.С., Давранов К.Д. Комплексные микробные препараты. Применение в сельскохозяйственной практике // *Biotechnologia Acta*. 2014. Т. 7. N 6. С. 92–101. <https://doi.org/10.15407/biotech7.06.092>
2. Ehling-Schulz M., Lereclus D., Koehler T.M. The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* species with pathogenic potential // *Microbiology Spectrum*. 2019. Vol. 7. Issue 3. P. 1–35. <https://doi.org/10.1128/microbial-spec.gpp3-0032-2018>
3. Kivanç S.A., Takim M., Kivanç M., Gullulu G. *Bacillus* Spp. isolated from the conjunctiva and their potential antimicrobial activity against other eye pathogens // *African Health Sciences*. 2014. Vol. 14. Issue 2. P. 364–371. <https://doi.org/10.4314/ahs.v14i2.11>
4. Sharif M., Yazdani M., Almas Z., Ghias W., Qureshi R., Zakki S., et al. *Bacillus* species found antagonistic activity against bacteria isolated from currency notes in local circulation // *Biomedical Letters*. 2016. Vol. 2. Issue 2. P. 86–90.
5. Abbas A., Khan S.U., Khan W.U., Saleh T.A., Khan M.H.U., Ullah S., et al. Antagonist effects of strains of *Bacillus* spp. against *Rhizoctonia solani* for their protection against several plant diseases: Alternatives to chemical pesticides // *Comptes Rendus Biologies*. 2019. Vol. 342. Issue 5-6. P. 124–135. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2019.05.002>
6. Akarapisan A., Khamtham J., Kositratana W. Characterization of antagonistic-potential of *Bacillus velezensis* SK71 against bacterial brown spot on a terrestrial orchid (*Habenaria lindleyana*) // *International Journal of Agricultural Technology*. 2020. Vol. 16. Issue 1. P. 1–18.
7. Савустьяненко А.В. Механизмы действия пробиотиков на основе *Bacillus subtilis* // *Актуальная инфектология*. 2016. N 2 (11). С. 35–44.

8. Абрамкова Н.В. Сравнительная эффективность применения спорообразующих пробиотиков в технологии выращивания поросят // Вестник КрасГАУ. 2015. N 8. С. 173–176.
9. Ziaei-Nejad S., Rezaei M.H., Takami G.A., Lovett D.L., Mirvaghefi A.-R., Shakouri M. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus* // Aquaculture. 2006. Vol. 252. Issue 2-4. P. 516–524. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.07.021>
10. Sekar A., Kim M., Jeon H., Kim K. Screening and selection of bacteria inhibiting white spot syndrome virus infection to *Litopenaeus vannamei* // Biochemistry and Biophysics Reports. 2019. Vol. 19. Article number 100663. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2019.100663>
11. Amoah K., Huang Q.-C., Tan B.-P., Zhang S., Chi S.-Y., Yang Q.-H., et al. Dietary supplementation of probiotic bacteria, *Bacillus coagulans* ATCC 7050, improves the growth performance, intestinal morphology, microflora, immune response, and disease confrontation of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* // Fish and Shellfish Immunology. 2019. Vol. 87. P. 796–808. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.029>
12. Bahrampour K., Afsharmanesh M., Khajen Bami M. Comparative effects of dietary *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans* and Flavophospholipol supplements on growth performance, intestinal microflora and jejunal morphology of Japanese quail // Livestock Science. 2020. Vol. 239. Article number 104089. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104089>
13. Ефименко Т.А., Маланичева И.А., Зенкова В.А., Королев А.М., Остерман И.А., Сергиев П.В. [и др.]. Изыскание антибиотиков, эффективных в отношении бактерий с лекарственной устойчивостью, на примере *Bacillus pumilus* продуцента антибиотика амикумацина А // Вестник Оренбургского государственного университета. 2014. N 13 (174). С. 27–31.
14. Ефременкова О.В., Габриэлян Н.И., Маланичева И.А., Ефименко Т.А., Сумарукова И.Г., Глухова А.А. [и др.]. Антимикробные свойства амикумацина А // Антибиотики и химиотерапия. 2017. Т. 62. N 1-2. С. 16–19.
15. Srisaroome P., Areechon N. Efficacy of viable *Bacillus pumilus* isolated from farmed fish on immune responses and increased disease resistance in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Laboratory and on-farm trials // Fish and Shellfish Immunology. 2017. Vol. 67. P. 199–210. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.06.018>
16. Gao X.-Y., Liu Y., Miao L.-L., Li E.-W., Hou T.-T., Liu Z.-P. Mechanism of anti-*Vibrio* activity of marine probiotic strain *Bacillus pumilus* H2, and characterization of the active substance // AMB Express. 2017. Vol. 7. Issue 1. P. 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0323-3>
17. Thy H.T.T., Tri N.N., Quy O.M., Fotedar R., Kannika K., Unajak S., et al. Effects of the dietary supplementation of mixed probiotic spores of *Bacillus amyloliquefaciens* 54A, and *Bacillus pumilus* 47B on growth, innate immunity and stress responses of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) // Fish & Shellfish Immunology. 2017. Vol. 60. P. 391–399. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.11.016>
18. Jiménez G., Urdiain M., Cifuentes A., López-López A., Blanch A.R., Tamames J., et al. Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations // Systematic and Applied Microbiology. 2013. Vol. 36. Issue 6. P. 383–391. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.04.008>
19. Kantas D., Papatsiros V.G., Tassis P.D., Giavasis I., Bouki P., Tzika E.D. A feed additive containing *Bacillus toyonensis* (Toyocerin®) protects against enteric pathogens in postweaning piglets // Journal of Applied Microbiology. 2015. Vol. 118. Issue 3. P. 727–738. <https://doi.org/10.1111/jam.12729>
20. Pinheiro V., Mourão J.L., Jimenez G. Influence of Toyocerin® (*Bacillus cereus* var. *toyo*) on the breeding performances of primiparous rabbit does // World Rabbit Science. 2007. Vol. 15. Issue 4. P. 179–188. <https://doi.org/10.4995/wrs.2007.590>
21. Cruz P.M., Ibañez A.L., Hermosillo O.A.M., Saad H.C.R. Use of probiotics in aquaculture // International Scholarly Research Network. 2012. Vol. 2012. Article ID 916845. 13 p. <https://doi.org/10.5402/2012/916845>
22. Пат. № 2693439, Российская Федерация. Штамм бактерий *Bacillus toyonensis* ВКПМ В-13249, обладающий выраженным антагонизмом по отношению к микроорганизмам *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *St. epidermidis*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Pseudomonas aeruginosa* / А.Н. Иркитова, А.В. Гребенщикова; патентообладатель ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет»; заявл. 25.12.2018; опубл. 02.07.2019.
23. Пат. № 2694522, Российская Федерация. Штамм бактерий *Bacillus pumilus* ВКПМ В-13250, обладающий выраженным антагонизмом по отношению к микроорганизмам *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *St. epidermidis* / А.Н. Иркитова, А.В. Гребенщикова; патентообладатель ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет»; заявл. 25.12.2018; опубл. 16.07.2019.
24. Иркитова А.Н., Гребенщикова А.В., Яценко Е.С., Сперанская Н.Ю., Мацюра А.В. Морфологическое разнообразие *Bacillus subtilis* // Ukrainian Journal of Ecology. 2018. Т. 8. N. 2. С. 365–370. https://doi.org/10.15421/2018_355

REFERENCES

1. Murodova SS, Davranov KD. Complex microbial preparations. The application in agricultural practice. *Biotechnologia Acta*. 2014;7(6):92–101. (In Russian) <https://doi.org/10.15407/biotech7.06.092>
2. Ehling-Schulz M, Lereclus D, Koehler TM. The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* Species with Pathogenic Potential. *Microbiology Spectrum*. 2019; 7(3):1–35. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0032-2018>
3. Kivanç SA, Takim M, Kivanç M, Gullulu G. *Bacillus* spp. isolated from the conjunctiva and their potential antimicrobial activity against other eye pathogens. *African Health Sciences*. 2014;14(2):364–371. <https://doi.org/10.4314/ahs.v14i2.11>
4. Sharif M, Yazdani M, Almas Z, Ghias W, Qureshi R, Zakki S, et al. *Bacillus* species found antagonistic activity against bacteria isolated from currency notes in local circulation. *Biomedical Letters*. 2016;2(2):86–90.
5. Abbas A, Khan SU, Khan WU, Saleh TA, Khan MHU, Ullah S, et al. Antagonist effects of strains of *Bacillus* spp. against *Rhizoctonia solani* for their protection against several plant diseases: Alternatives to chemical pesticides. *Comptes Rendus Biologies*. 2019;342(5-6):124–135. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2019.05.002>
6. Akarapisan A, Khamtham J, Kositratana W. Characterization of antagonistic-potential of *Bacillus velezensis* SK71 against bacterial brown spot on a terrestrial orchid (*Habenaria lindleyana*). *International Journal of Agricultural Technology*. 2020;16(1):1–18.
7. Savustyanenko AV. Mechanisms of action of probiotics based on *Bacillus subtilis*. *Aktual'naâ Infektologîâ = Actual Infectology*. 2016;2:35–44. (In Russian)
8. Abramkova NV. Comparative efficiency of the spore-forming probiotic application in the piglet breeding technology. *Vestnik KrasGAU = The Bulletin of KrasGAU*. 2015;8:173–176. (In Russian)
9. Ziaei-Nejad S, Rezaei MH, Takami GA, Lovett DL, Mirvaghefi A-R, Shakouri M. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture*. 2006;252(2-4):516–524. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.07.021>
10. Sekar A, Kim M, Jeon H, Kim K. Screening and selection of bacteria inhibiting white spot syndrome virus infection to *Litopenaeus vannamei*. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 2019;19. Article number 100663. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2019.100663>
11. Amoah K, Huang Q-C, Tan B-P, Zhang S, Chi S-Y, Yang Q-H, et al. Dietary supplementation of probiotic bacteria, *Bacillus coagulans* ATCC 7050, improves the growth performance, intestinal morphology, microflora, immune response, and disease confrontation of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*. 2019;87:796–808. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.029>
12. Bahrapour K, Afsharmanesh M, Khajen Bami M. Comparative effects of dietary *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans* and Flavophospholipol supplements on growth performance, intestinal microflora and jejunal morphology of Japanese quail. *Livestock Science*. 2020;239. Article number 104089. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104089>
13. Efimenko TA, Malanicheva IA, Zenkova VA, Korolev AM, Osterman IA, Sergiev PV, et al. *Bacillus pumilus* – producer of amicoumacin A as an example of searching for new antibiotics which effective against drug resistant bacteria. *Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta = Vestnik of the Orenburg State University*. 2014;13:27–31. (In Russian)
14. Efremenkova OV, Gabrielyan NI, Malanicheva IA, Efimenko TA, Sumarukova IG, Gluhova AA, et al. Antibacterial properties of amicoumycin A. *Antibiotics and Chemotherapy*. 2017;62(1-2):16-19. (In Russian)
15. Srisapoom P, Areechon N. Efficacy of viable *Bacillus pumilus* isolated from farmed fish on immune responses and increased disease resistance in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Laboratory and on-farm trials. *Fish and Shellfish Immunology*. 2017;67:199–210. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.06.018>
16. Gao X-Y, Liu Y, Miao L-L, Li E-W, Hou T-T, Liu Z-P. Mechanism of anti-*Vibrio* activity of marine probiotic strain *Bacillus pumilus* H2, and characterization of the active substance. *AMB Express*. 2017;7(1):1–10. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0323-3>
17. Thy HTT, Tri NN, Quy OM, Fotedar R, Kanika K, Unajak S, et al. Effects of the dietary supplementation of mixed probiotic spores of *Bacillus amyloliquefaciens* 54A, and *Bacillus pumilus* 47B on growth, innate immunity and stress responses of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Fish and Shellfish Immunology*. 2017;60:391–399. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.11.016>
18. Jiménez G, Urdiain M, Cifuentes A, López-López A, Blanch AR, Tamames J, et al. Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. *Systematic and Applied Microbiology*. 2013;36(6):383–391. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.04.008>
19. Kantas D, Papatsiros VG, Tassis PD, Giavasis I, Bouki P, Tzika ED. A feed additive containing *Bacillus toyonensis* (Toyocerin®) protects against enteric pathogens in postweaning piglets. *Journal of Applied Microbiology*. 2015;118(3):727–738. <https://doi.org/10.1111/jam.12729>
20. Pinheiro V, Mourão JL, Jimenez G. Influence of Toyocerin® (*Bacillus cereus* var. *toyoi*) on the breeding performances of primiparous rabbit does. *World Rabbit Science*. 2007;15(4):179–188. <https://doi.org/10.1016/j.wrs.2007.11.001>

doi.org/10.4995/wrs.2007.590

21. Cruz PM, Ibañez AL, Hermsillo OAM, Saad HCR. Use of probiotics in aquaculture. *International Scholarly Research Network*. 2012;2012. Article ID 916845. 13 p. <https://doi.org/10.5402/2012/916845>

22. Irkitova AN, Grebenschikova AV. Bacterial strain *Bacillus toyonensis* VKPM B-13249, having marked antagonism with respect to microorganisms *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Pseudomonas aeruginosa*. Patent RF, no. 2693439; 2018. (In Russian)

23. Irkitova AN, Grebenschikova AV. Bacterial strain *Bacillus pumilus* RNCIM V-13250, having expressed antagonism towards microorganisms *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*. Patent RF, no. 2694522; 2018. (In Russian)

24. Irkitova AN, Grebenschikova AV, Yatsenko ES, Speranskaya NY, Matsyura AV. Morphological diversity of *Bacillus subtilis*. *Ukrainian Journal of Ecology*. 2018;8(2):365–370. https://doi.org/10.15421/2018_355 (In Russian)

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Малкова Ангелина Владимировна,
младший научный сотрудник,
ИЦ «Промбиотех»,
Алтайский государственный университет,
656049, г. Барнаул, пр-т Ленина, 61,
Российская Федерация,
✉ e-mail: gelishka96@mail.ru

Евдокимов Иван Юрьевич,
исполняющий обязанности заместителя
директора,
ИЦ «Промбиотех»,
Алтайский государственный университет,
656049, г. Барнаул, пр-т Ленина, 61,
Российская Федерация,
e-mail: ivan.evdokimov.92@mail.ru

Ширманов Максим Вячеславович,
младший научный сотрудник,
ИЦ «Промбиотех»,
Алтайский государственный университет,
656049, г. Барнаул, пр-т Ленина, 61,
Российская Федерация,
e-mail: maks-shirmanov@mail.ru

Ирkitова Алена Николаевна,
к.б.н., ведущий научный сотрудник,
ИЦ «Промбиотех»,
Алтайский государственный университет,
656049, г. Барнаул, пр-т Ленина, 61,
Российская Федерация,
e-mail: elen171987@mail.ru

Дудник Дина Евгеньевна,
лаборант-исследователь,
ИЦ «Промбиотех»,
Алтайский государственный университет,
656049, г. Барнаул, пр-т Ленина, 61,
Российская Федерация,
e-mail: dudnik-dina@mail.ru

Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Angelina V. Malkova,
Junior Researcher,
Engineering Center “Prombiotech”,
Altai State University,
61, Lenin Ave., Barnaul, 656049,
Russian Federation,
✉ e-mail: gelishka96@mail.ru

Ivan Yu. Evdokimov,
Acting Deputy Director,
Engineering Center “Prombiotech”,
Altai State University,
61, Lenin Ave., Barnaul, 656049,
Russian Federation,
e-mail: ivan.evdokimov.92@mail.ru

Maxim V. Shirmanov,
Junior Researcher,
Engineering Center “Prombiotech”,
Altai State University,
61, Lenin Ave., Barnaul, 656049,
Russian Federation,
e-mail: maks-shirmanov@mail.ru

Alena N. Irkitova,
Cand. Sci. (Biology),
Leading Researcher,
Engineering Center “Prombiotech”,
Altai State University,
61, Lenin Ave., Barnaul, 656049,
Russian Federation,
e-mail: elen171987@mail.ru

Dina E. Dudnik,
Laboratory Assistant-Researcher,
Engineering Center “Prombiotech”,
Altai State University,
61, Lenin Ave., Barnaul, 656049,
Russian Federation,
e-mail: dudnik-dina@mail.ru

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

*Поступила в редакцию 17.05.2021.
Одобрена после рецензирования 01.08.2021.
Принята к публикации 30.08.2021.*

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 17.05.2021.
Approved after reviewing 01.08.2021.
Accepted for publication 30.08.2021.*



Экзогенный кальций модулирует активность аденилатциклаз растений картофеля при биотическом стрессе

© Н.В. Филинова, Л.А. Ломоватская, А.С. Романенко

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
г. Иркутск, Российская Федерация

Резюме: Целью данного исследования являлось изучение влияния различных концентраций ионов кальция на активность трансмембранной (тМАЦ) и растворимой форм аденилатциклаз (рАЦ) из клеток корней и стеблей растений двух сортов картофеля, контрастных по устойчивости к возбудителю кольцевой гнили *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Cms) на фоне воздействия его экзополисахаридов. Результаты экспериментов показали, что реакция тМАЦ из корней и стеблей на экзогенный Ca^{2+} оказалась почти противоположной у растений обоих сортов. В клетках корня растений устойчивого сорта 1 и 10 мМ Ca^{2+} весьма интенсивно активировал тМАЦ. В то же время в стебле средние концентрации Ca^{2+} ингибировали активность тМАЦ, а самые высокие – 1 и 10 мМ, на нее не влияли. Напротив, активность тМАЦ из клеток корня растений восприимчивого сорта незначительно активировалась повышенными концентрациями Ca^{2+} , но в стеблях все концентрации Ca^{2+} , начиная с 1 мкМ, существенно повышали активность тМАЦ. Таким образом, неодинаковая реакция аденилатциклаз растений картофеля обоих сортов на различные концентрации экзогенного кальция свидетельствует, скорее всего, о наличии нескольких изоформ этого фермента, отличающихся по чувствительности к ионам кальция. При этом, возможно, растения обоих сортов также отличаются по спектру таких изоформ. Исходя из того, что под воздействием экзополисахаридов Cms чувствительность к ионам кальция обеих форм аденилатциклаз существенно менялась в клетках растений обоих сортов, можно предположить, что эта особенность является одним из механизмов различной устойчивости растений данных сортов к патогену.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum*, кальций, трансмембранная и растворимая аденилатциклазы растений, биотический стресс

Благодарности: Работа выполнена на оборудовании ЦКП «Биоаналитика» и с использованием коллекций ЦКП «Биоресурсный центр» Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск).

Финансирование: Работа выполнена в рамках Проекта научно-исследовательских работ, № государственной регистрации 121031300011-7.

Для цитирования: Филинова Н.В., Ломоватская Л.А., Романенко А.С. Экзогенный кальций модулирует активность аденилатциклаз растений картофеля при биотическом стрессе. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2021. Т. 11. N 3. С. 403–412. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-403-412>

Exogenous calcium modulates the activity of adenylate cyclases in potato plants under biotic stress

Nadegda V. Filinova, Lidiya A. Lomovatskaya, Anatoliy S. Romanenko

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS,
Irkutsk, Russian Federation

Abstract: This article aims to study the influence of different concentrations of calcium ions on the activity of transmembrane (tmAC) and soluble forms of adenylate cyclase (sAC) in the cells of roots and stems of the plants of two types of potatoes. It compares and contrasts their stability to the agent of the annular rot *Clavibacter michiganensis* ssp. *Sepedonicus* (Cms) when exposed to its exopolysaccharides. The experimental results have shown that the reaction of tmAC from the roots and stems to exogenous Ca^{2+} was almost oppo-

site in the plants of both types. In the root cells of the plants of the resistant types, 1 and 10 mM of Ca^{2+} have activated tmAC in a very intensive way. In the stem, the average concentrations of Ca^{2+} inhibited the tmAC activity, while the highest, 1 and 10 mM, did not affect it. The activity of tmAC taken from the root cells of the receptive type of plants was not activated significantly by the increased concentrations of Ca^{2+} , whereas, in the stems, all the concentrations of Ca^{2+} , tmAC activity increased substantially starting with 1 μ M. Thus, the unequal reaction of adenylate cyclases of the potato plants of both types to different concentrations of exogenous calcium, testifies, most likely, the presence of several isoform of this ferment that differ in the sensitivity to calcium ions. At the same time, it is possible that the plants of both types may also differ in the spectrum of such isoforms. Since the influence of Cms exopolysaccharides significantly changes the sensitivity to the calcium ions of both forms of adenylate cyclases in the cells of plants of both types, it can be assumed that this feature is one of the mechanisms of these plants' resistance to the pathogen.

Keywords: *Solanum tuberosum*, calcium, transmembrane and soluble plant adenylate cyclases, biotic stress

Acknowledgments: The work was carried out using the equipment of the Center for Collective Use "Bioanalytica" and the collections of the Center for Collective Use "Bioresource Center" of the Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS (Irkutsk).

Funding: The study was conducted as part of the Research Project (Federal registration number 121031300011-7).

For citation: Filinova NV, Lomovatskaya LA, Romanenko AS. Exogenous calcium modulates the activity of adenylate cyclases in potato plants under biotic stress. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(3):403–412. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-403-412>

ВВЕДЕНИЕ

Аденилатциклазная сигнальная система растений включает несколько ключевых компонентов: аденилатциклазы (АЦ), циклический аденозинмонофосфат (цАМФ) и цАМФ, синтезируемый АЦ, – специфичные фосфодиэстеразы, переводящие его в неактивную нециклическую форму. Кроме того, имеются протеинкиназы и другие специфические белки, активируемые цАМФ. Как и во всех живых системах, цАМФ в растениях выполняет роль вторичного посредника, участвующего в каскадной передаче сигналов в геноме содержащие органеллы клетки. Эта сигнальная система в числе других регулирует метаболизм растений как в нормальных, так и в стрессовых условиях [1].

В последние годы появились работы, посвященные исследованию структуры растительных АЦ, где показано, что данный фермент представляет собой отдельный домен, входящий в состав мультифункциональных комплексов. Так, АЦ была обнаружена в составе R-белка ADB66335.1 из *Populus trichocarpa* [2], K^+ -зависимой пермеазы 7 (AtKUP7) [3], а также в эндоцитозных пузырьках в составе клатринового белкового комплекса. Полагают, что цАМФ в данном случае необходим в интернализации патогенных эффекторов в эндоплазматическую сеть и вакуоль растительных клеток [4]. Кроме того, в печеночнике (*Marchantia polymorpha*) АЦ (MrCAPE) объединена в один мультидоменный комплекс с фосфодиэстеразой [5].

Несмотря на интенсификацию исследований АЦ растений, механизмы их внутриклеточной регуляции остаются во многом неясными. В то же время известно, что активность большинства

изоформ трансмембранной аденилатциклазы животных регулируется кальцием при участии кальмодулина или кальцийнейрина [6].

У растений роль кальция в качестве вторичного посредника исследована довольно подробно [7–9]. Передача сигналов с участием кальция происходит благодаря его способности дифференцированно взаимодействовать с клеточными белками, включая ферменты, являющимися ключевыми звеньями в сигнальных системах растений [7]. Кроме того, у растений выявлены неселективные цАМФ-зависимые кальциевые каналы, активность которых возрастает при биотических стрессах. Таким образом, активация АЦ растений влечет за собой открытие таких ионных каналов [10]. В этом случае возникает вопрос, может ли кальций также участвовать в регуляции активности АЦ растений. Поэтому целью данного исследования являлось изучение влияния различных концентраций ионов кальция на активность трансмембранной (tmAC) и растворимой форм аденилатциклаз (pAC) из клеток корней и стеблей растений двух сортов картофеля, контрастных по устойчивости к *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Cms) на фоне воздействия экзополисахаридов (ЭПС) Cms.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Растения картофеля (*Solanum tuberosum* L.): сорт Луговской – резистентный, сорт Лукьяновский – восприимчивый к возбудителю кольцевой гнили (*Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* – Cms), *in vitro* культивировали в течение 7 дней на твердой питательной среде Мурасиге – Скуга (Sigma, США) с добавлением 20 г/л сахарозы и 5 г/л агар-агара до образования первичных кор-

ней, затем переносили на жидкую среду и дополнительно культивировали 3–4 недели. *Cms* (вирулентный, мукоидный штамм 5369) выращивали на жидкой среде, содержащей дрожжевой экстракт (10 г/л), глюкозу (15 г/л), pH = 7,0, в течение трех дней. Эндоплазматическую сеть (ЭПС) выделяли из культурального фильтрата и очищали методом колоночной ионообменной хроматографии [11].

Экзополисахариды *Cms* в конечной концентрации 0,1% добавляли к жидкой среде роста растений и выдерживали в течение 1 мин. Растения фиксировали в жидком азоте, затем корень отделяли от стебля. Каждую часть отдельно растирали в 50 мМ Трис-НСI буфере (pH = 7,2) (Sigma, США), приготовленном на деионизованной воде с добавлением 1 мМ дитиотреитола (Sigma, США), ингибитора цАМФ-специфичной фосфодиэстеразы – 0,1 мМ теофиллина (KRKA, Словения), ингибиторов протеаз – 50 мкг/мл фенилметилсульфонилфторида (ФМСФ), 50 мкг/мл гидроксимеркурийбензоата (ГМБ), 1 мкг/мл лейпептина (Sigma, США). Гомогенат фильтровали через капроновую ткань и центрифугировали на центрифуге Allegra 64R при 16000 g (Beckman Coulter, США). Далее проводили дифференциальное центрифугирование на ультрацентрифуге Sorvall Discovery 90SE при 105000 g (США) в течение 3 ч. В результате получали две фракции – мембранную и растворимую, в мембранной фракции определяли тМАЦ, в растворимой – рАЦ. Определение активности ферментов начинали с внесения 500 мкл растительной пробы к 0,5 мМ АТФ (Sigma, США), MgSO₄ (0,5 мМ) и MnCl₂ (3 мМ) служили кофакторами для тМАЦ и рАЦ соответственно. Кальций добавляли в виде CaCl₂ (Реахим, Россия) в следующих конечных концентрациях: 500 нМ, 1 мкМ, 500 мкМ, 1 мМ и 10 мМ. Реакцию проводили при 27 °С в течение 30 мин и останавливали кипячением на водяной бане. Об активности аденилатциклаз судили по концентрации цАМФ, которую определяли методом иммуноферментного анализа (ELISA), модифицированного нами путем применения первичных поликлональных кроличьих антител против цАМФ (Antibodies-online.com, Германия) и вторичных козьих антител, меченных пероксидазой (Antibodies-online.com, Германия) [12]. Активность фермента рассчитывали на мг белка в мин.

Белок в пробе определяли методом Бредфорда. Контролем служили образцы без добавления кальция (вариант «0»).

Эксперименты проводили в 2-кратной биологической повторности, определение уровня цАМФ – в 4-кратной аналитической повторности. Результаты обработаны статистически с помощью программы SigmaPlot 12.3. На графиках данные представлены в процентах к контролю со стандартной ошибкой. Значимость различий средних значений оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследования показали, что исходная активность тМАЦ и рАЦ весьма существенно менялась под воздействием ЭПС *Cms* и различалась в клетках растений обоих сортов (таблица).

При добавлении ионов кальция к выделенному ферменту в корнях активность тМАЦ возрастала как в варианте без ЭПС, так и на их фоне у растений картофеля сорта Луговской, резистентного к *Cms* (рис. 1, а). При этом в варианте с ЭПС активирующий эффект Ca²⁺ повышался в диапазоне 1–10 мМ. В то же время в клетках стеблей тех же растений в варианте без ЭПС активность тМАЦ не изменялась в присутствии всех концентраций ионов кальция, но после добавления ЭПС значительно возрастала, особенно при миллимолярных концентрациях этих ионов (рис. 1, б).

В корнях растений картофеля восприимчивого сорта Лукьяновский в варианте без ЭПС низкие концентрации кальция не оказывали влияния на активность тМАЦ, а 500 мкМ и 1 мМ Ca²⁺ увеличивали активность фермента в среднем на 70%, тогда как после добавления ЭПС самая высокая концентрация, 10 мМ ионов кальция, напротив, ингибировала его активность на 30% (рис. 2, а).

В стеблях тех же растений в варианте без ЭПС активность тМАЦ существенно стимулировали как низкие, так и повышенные концентрации ионов кальция: 1 мкМ, 500 мкМ и 1 мМ. В то же время после инкубации с ЭПС ее активность почти полностью подавлялась при более высоких концентрациях этого иона – 1 и 10 мМ (рис. 2, б).

Активность тМАЦ и рАЦ (нмоль/мг белка) в органах растений картофеля *in vitro* под воздействием ЭПС *Cms*

Activity of tmAC and sAC (nmol/mg of protein) in potato plant organs *in vitro* under the influence of *Cms* exopolysaccharides

Часть растения	Сорт картофеля							
	Луговской				Лукьяновский			
	тМАЦ		рАЦ		тМАЦ		рАЦ	
	-ЭПС	+ЭПС	-ЭПС	+ЭПС	-ЭПС	+ЭПС	-ЭПС	+ЭПС
Корни	0,31±0,02	12,2±0,64	0,52±0,02	0,55±0,03	2,4±0,02	1,3±0,12	0,72±0,04	0,08±0,01
Стебли	1,29±0,07	29,7±1,13	0,13±0,01	2,2±0,11	0,23±0,03	0,034±0,002	1,06±0,06	0,2±0,13

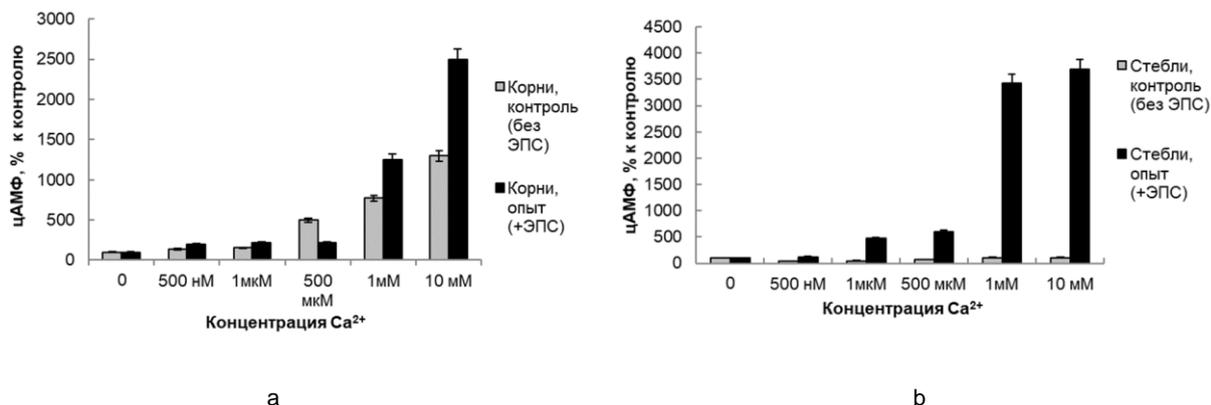


Рис. 1. Изменение активности тмАЦ из клеток растений картофеля устойчивого сорта Луговской под влиянием различных концентраций ионов Ca²⁺: а – в корнях, б – в стеблях. Различия значимы при P ≤ 0,01

Fig. 1. Changes in the activity of tmAC from potato plant cells of the resistant cultivar Lugovskoy under the influence of different concentrations of Ca²⁺ ions: in the roots (a), in the stems (b). Differences are significant at P ≤ 0.01

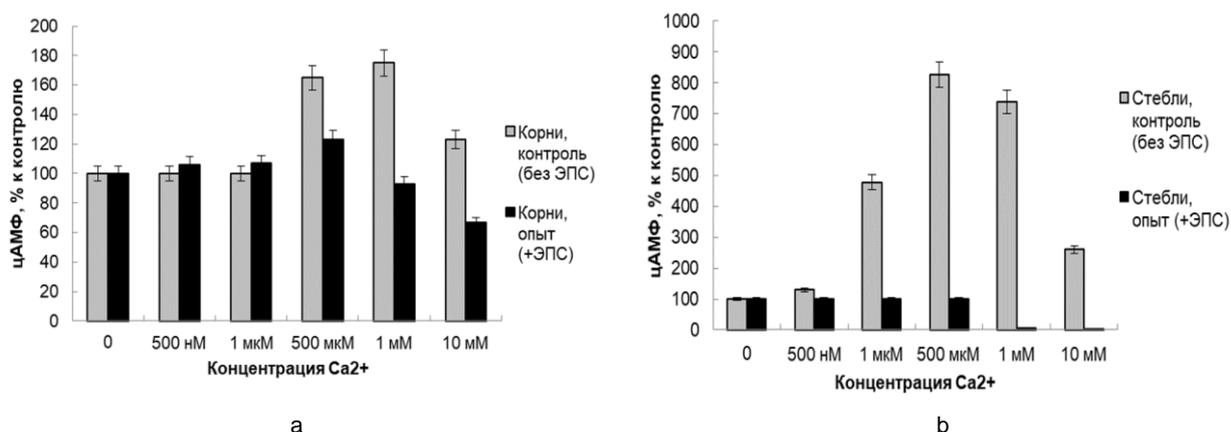


Рис. 2. Изменение активности тмАЦ из клеток растений картофеля восприимчивого сорта Лукьяновский под влиянием различных концентраций ионов Ca²⁺: а – в корнях, б – в стеблях. Различия значимы при P ≤ 0.01

Fig. 2. Changes in the activity of tmAC from potato plant cells of the susceptible cultivar Lukyanovskii under the influence of different concentrations of Ca²⁺ ions: in the roots (a), in the stems (b). Differences are significant at P ≤ 0.01

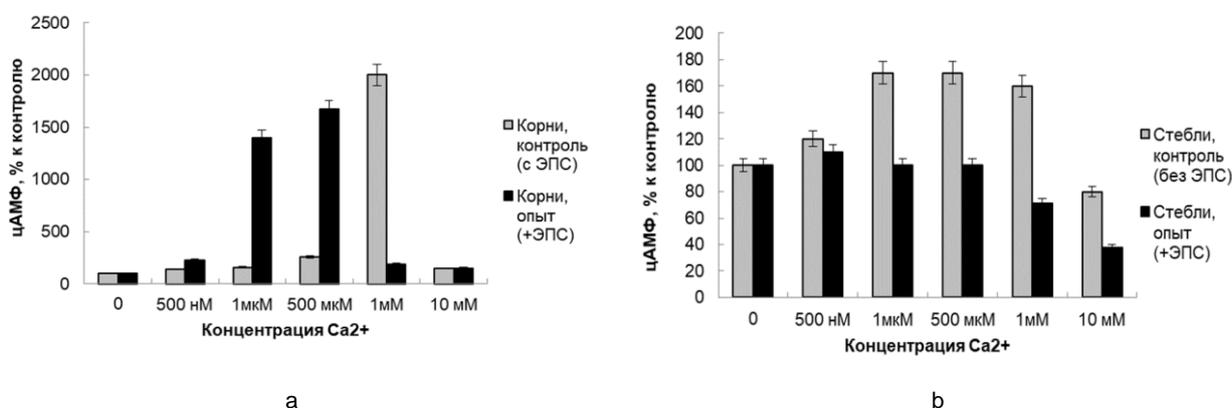


Рис. 3. Изменение активности рАЦ из клеток растений картофеля устойчивого сорта Луговской под влиянием различных концентраций ионов Ca²⁺: а – в корнях, б – в стеблях. Различия значимы при P ≤ 0.05

Fig. 3. Changes in the activity of sAC from potato plant cells of the resistant cultivar Lugovskoy under the influence of different concentrations of Ca²⁺ ions: in the roots (a), in the stems (b). Differences are significant at P ≤ 0.05

У растворимой формы АЦ была выявлена иная чувствительность к Ca^{2+} . В корнях растений устойчивого сорта в контроле (без ЭПС) наибольший активирующий эффект на рАЦ оказывал только 1 мМ Ca^{2+} , тогда как после воздействия ЭПС существенная стимуляция рАЦ наблюдалась при более низких концентрациях Ca^{2+} – 10 и 500 мкМ (рис. 3, а). На рАЦ из стеблей тех же растений почти все концентрации ионов кальция (без воздействия ЭПС) оказывали небольшой стимулирующий эффект, за исключением 10 мМ, когда активность рАЦ ингибировалась. В присутствии ЭПС активность этого фермента оставалась на уровне контроля, за исключением 1 и 10 мМ Ca^{2+} , проявивших ингибирующий эффект (рис. 3, б).

В корнях растений картофеля восприимчивого сорта Лукьяновский как в контроле, так и после воздействия ЭПС низкие концентрации Ca^{2+} (500 нМ и 1 мкМ) не оказывали существенного воздействия на эту форму фермента (рис. 4, а), тогда как 500 мкМ, 1 мМ и 10 мМ катиона в присутствии ЭПС ингибировали ее активность. Напротив, в стеблях тех же растений в контроле наблюдалась весьма значительная активация рАЦ концентрациями кальция 500 мкМ и 1 мМ при явном подавлении ее активности при 10 мМ. В присутствии ЭПС максимальная активность рАЦ была зафиксирована при концентрации 1 мМ Ca^{2+} (рис. 4, б).

Согласно литературным данным, у животных аденилатциклазная и кальциевая сигнальные системы функционируют в тесном взаимодействии [6]. У млекопитающих активность девяти изоформ тМАЦ может модулироваться ионами кальция, причем отдельные изоформы могут как активироваться, так и ингибироваться ими, а некоторые не чувствительны к Ca^{2+} [13, 6]. Одной из функций цАМФ, синтезируемого тМАЦ, является активация нуклеотид-зависимых кальциевых каналов в мембранах органелл клеток животных [13], что поддерживает необходимый ор-

ганоспецифический уровень вторичных мессенджеров, от которых в значительной степени зависит дистанционная внутри- и межклеточная передача сигналов.

У растений в состоянии покоя в цитоплазме концентрация Ca^{2+} составляет 100–200 нМ, что на 3–4 порядка ниже, чем во внутриклеточных компартментах: в митохондриях и ЭПР – около 1 мМ, в клеточной стенке и вакуоли – 1–10 мМ [14].

Результаты экспериментов показали, что реакция тМАЦ из корней и стеблей на экзогенный Ca^{2+} оказалась почти противоположной у растений обоих сортов. В клетках корня растений устойчивого сорта 1 и 10 мМ Ca^{2+} интенсивно активировал тМАЦ. В то же время в стебле средние концентрации Ca^{2+} ингибировали активность тМАЦ, а самые высокие – 1 и 10 мМ, на нее не влияли. Напротив, активность тМАЦ из клеток корня растений восприимчивого сорта незначительно активировалась повышенными концентрациями Ca^{2+} , но в стеблях все концентрации Ca^{2+} , начиная с 1 мкМ, существенно повышали активность тМАЦ. Различия чувствительности изоформ тМАЦ к кальцию отмечены также у животных: тМАЦ1, тМАЦ3 тМАЦ8 активируются высокими концентрациями кальция, тогда как тМАЦ5 и тМАЦ6 ингибируются его физиологическими концентрациями.

Однако, судя по нашим данным, чувствительность тМАЦ из клеток различных органов растений имеет, скорее всего, сортовые особенности. Такое наблюдение еще раз подтверждает предположение о наличии других изоформ тМАЦ у растений картофеля этого сорта. Феномен различных изоформ ферментов у сортов растений картофеля, различающихся по устойчивости к возбудителю кольцевой гнили, известен: показано, что спектр изоформ пероксидазы различается у растений тех же самых сортов картофеля, и это во многом определяет устойчивость сорта картофеля к *Cms* [16].

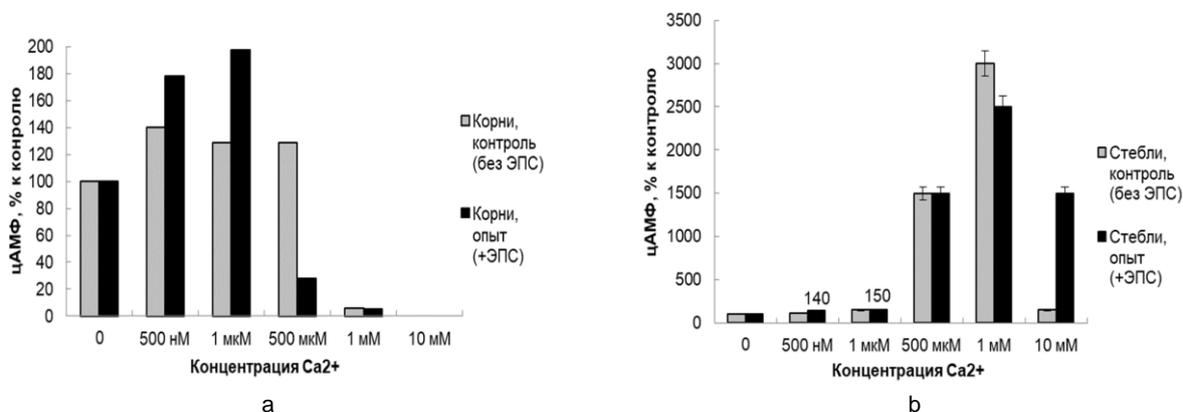


Рис. 4. Изменение активности рАЦ из клеток растений картофеля восприимчивого сорта Лукьяновский под влиянием различных концентраций ионов Ca^{2+} : а – в корнях, б – в стеблях. Различия значимы при $P \leq 0.01$

Fig. 4. Changes in the activity of sAC from potato plant cells of the susceptible cultivar Lukyanovskii under the influence of different concentrations of Ca^{2+} ions: in the roots (a), in the stems (b). Differences are significant at $P \leq 0.01$

Известно, что рАЦ из клеток животных также чувствительна к ионам кальция, которые повышают сродство фермента к субстрату [17]. Особенностью данной формы фермента и у животных, и у растений является его локализация во внутриклеточных компартментах, где ионы кальция содержатся в более высокой концентрации, чем в цитоплазме. У растений эта форма фермента была найдена в строме и межмембранном пространстве изолированных хлоропластов табака [18, 19], в клетках корней люцерны [20] и в пыльце *Agapanthus umbellatus* [21].

В наших экспериментах чувствительность рАЦ существенно отличалась как в клетках различных частей растений, так и у растений разных сортов. У растений устойчивого сорта только 1 мМ Ca^{2+} весьма сильно активировал рАЦ в клетках корня, тогда как в стебле все концентрации, за исключением 10 мМ, незначительно активировали ее активность. В то же время у восприимчивого сорта в корнях рАЦ ингибировалась при повышенных концентрациях Ca^{2+} , но под влиянием тех же концентраций весьма сильно возрастала в клетках стебля.

Известно, что воздействие биотических стрессоров вызывает у растений резкое и кратковременное повышение уровня цАМФ, которое приводит, в том числе, к активации нуклеотид-зависимых кальциевых ионных каналов [22, 23].

Ранее нами был выполнен цикл работ по влиянию ЭПС *Cms* на уровень цАМФ и активность тМАЦ и рАЦ в клетках растений картофеля *in vitro*, где по этим показателям были выявлены сортовые особенности. Было показано, что при добавлении ЭПС *Cms* к среде роста наблюдалась активация тМАЦ и рАЦ в клетках корня и стеблей растений *in vitro* резистентного сорта картофеля уже через 1 мин воздействия, тогда как в тех же органах растений восприимчивого сорта наблюдалось существенное ингибирование активности АЦ, а незначительная активация появлялась только спустя 15 мин после воздействия [24]. В этих же условиях были исследованы кинетические параметры тМАЦ и рАЦ из клеток корня. Показано, что ЭПС прямо или косвенно оказывали влияние на кинетические параметры этих форм фермента [25]. Активация тМАЦ фторидом натрия, ингибиторный анализ [25], а также результаты выявления рецепторов к *Cms* на плазмалемме клеток тех же сортов картофеля позволили сделать вывод о том, что ЭПС *Cms* выступают в качестве лигандов и оказывают воздействие на тМАЦ через сигнальный каскад, включающий рецептор – G-белок – тМАЦ. Участие рецепторов, связанных с G-елками и тАЦ было показано нами ранее [25], хотя пока трудно более предметно обсуждать, какого типа G-белки присутствуют в клетках картофеля. Ранее в плазмалемме клеток растений восприимчивого сорта картофеля были

выявлены рецепторы, обладающие повышенным сродством к ЭПС *Cms* [26], тогда как в клетках растений устойчивого сорта аффинность к ЭПС отсутствовала. Поскольку ЭПС *Cms* гетерогенны по составу, то предполагалось, что они могут выступать в качестве элиситоров для растений устойчивого сорта картофеля или супрессоров для растений восприимчивого сорта. Авторами работы [27] у *Arabidopsis thaliana* был обнаружен белок, имеющий в своем составе нуклеотид-связывающий сайт с лейциновым повтором (NBS-LRR), который обладает аденилатциклазной активностью. Транскрипция его гена выявлялась при инфицировании растений биотрофными грибами и бактериями, но не менялась под воздействием некротрофного гриба. Было высказано предположение, что мультибелковые комплексы с АЦ в качестве одного из доменов вовлечены в реализацию устойчивости к болезням: связываясь со специфическими вирулентными белковыми факторами, они активируются, в результате чего локально возрастает уровень цАМФ, запускающий дальнейший сигнальный каскад [27].

Несмотря на то что с ЭПС *Cms* контактировали только корни, изменение активности тМАЦ и рАЦ наблюдалось и в стеблях. На основании этого был сделан вывод о том, что в растениях индуцировалась системная реакция аденилатциклазной сигнальной системы [25]. Известно, что под воздействием стрессоров на плазмалемме клеток растений может возникать электрохимический потенциал, системно распространяющийся по всему стеблю [28], а активность тМАЦ может меняться под его воздействием [29]. Модуляция активности тМАЦ приводит к локальному изменению концентрации цАМФ, что способствует активации нуклеотид-зависимых Ca^{2+} -каналов [22], кратковременно повышая концентрацию ионов кальция в районе плазмалеммы за счет их выхода из свободного пространства клеточной стенки. Можно предположить, что такие изменения уровня цАМФ индивидуальны в клетках растений разных сортов картофеля, поскольку, как обсуждалось выше, связаны с лиганд-рецепторными взаимодействиями. В свою очередь изменение уровня ионов Ca^{2+} в цитозоле, возможно, оказывает дополнительный супрессирующий эффект на активность тМАЦ в клетках растений восприимчивого сорта, как было показано в данной работе.

Активность рАЦ может модулироваться только под воздействием меняющихся окружающих условий, например, изменения концентрации ионов кальция в цитоплазме или оргanelлах. Поскольку эта форма фермента локализована в основном во внутриклеточных оргanelлах (ядро, хлоропласты, вакуоли), где подерживается, как правило, более высокая концентрация ионов кальция [30], снижение его

концентрации в данных компартментах при стрессе, вероятно, может оказывать модулирующий эффект на активность рАЦ.

ВЫВОДЫ

Таким образом, неодинаковая реакция аденилатциклаз растений картофеля обоих сортов на различные концентрации экзогенного кальция свидетельствует, скорее всего, о наличии нескольких изоформ этого фермента, отличаю-

щихся по чувствительности к ионам кальция. При этом возможно, что растения обоих сортов также отличаются по спектру таких изоформ. Исходя из того, что под воздействием ЭПС *Cms* чувствительность к ионам кальция обеих форм аденилатциклаз существенно менялась в клетках растений обоих сортов, можно предположить, что эта особенность является одним из механизмов различной устойчивости растений данных сортов к *Cms*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gehring C., Turek I. Cyclic nucleotide monophosphates and their cyclases in plant signaling // *Frontiers Plant Science*. 2017. Vol. 8. Article 1704. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01704>
2. Leipe D.D., Koonin E.V., Aravind L. STAND, a class of P-loop NTPases including animal and plant regulators of programmed cell death: multiple, complex domain architectures, unusual phyletic patterns, and evolution by horizontal gene transfer // *Journal of Molecular Biology*. 2004. Vol. 343. Issue 1. P.1–28. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.08.023>
3. Al-Younis I., Wong A., Gehring C. The *Arabidopsis thaliana* K⁺-uptake permease 7 (AtKUP7) contains a functional cytosolic adenylate cyclase catalytic centre // *FEBS Letters*. 2015. Vol. 589. Issue 21, part B. P. 3848–3852. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.11.038>
4. Chatukuta P., Dikobe T.B., Kawadza D.T., Sehlabane K.S., Takundwa M.M., Wong A., et al. An *Arabidopsis clathrin* assembly protein with a predicted role in plant defense can function as an adenylate cyclase // *Biomolecules*. 2018. Vol. 8. Issue 2. P. 15. <https://doi.org/10.3390/biom8020015>
5. Kasahara M., Suetsugu N., Urano Y., Yamamoto C., Ohmori M., Takada Y., et al. An adenylyl cyclase with a phosphodiesterase domain in basal plants with a motile sperm system // *Scientific Reports*. 2016. Vol. 6. Article no. 39232. <https://doi.org/10.1038/srep39232>
6. Halls M.L., Cooper D.M.F. Regulation by Ca²⁺-signaling pathways of adenylyl cyclases // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2011. Vol. 3. Issue 1. Article no. a004143. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004143>
7. Johnson J.M., Reichelt M., Vadassery J., Gershenzon J., Oelmüller R. An *Arabidopsis* mutant impaired in intracellular calcium elevation is sensitive to biotic and abiotic stress // *BMC Plant Biology*. 2014. Vol. 14. Issue 1. Article no. 162. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-162>
8. Hepler P.K. Calcium: a central regulator of plant growth and development // *The Plant Cell*. 2005. Vol. 17. Issue 8. P. 2142–2155. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.032508>
9. Ma S.Y., Zhao M. Calcium regulation of *Arabidopsis* salt resistance // *Acta Agronomica Sinica*. 2006. Vol. 32. Issue 11. P. 1706–1711.
10. Moeder W., Urquhart W., Ung H., Yoshioka K. The role of cyclic nucleotide-gated ion channels in plant immunity // *Molecular Plant*. 2011. Vol. 4. Issue 3. P. 442–452. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp018>
11. Strobel G.A. Purification and properties of a phytotoxic polysaccharide produced by *Corynebacterium sepedonicum* // *Plant Physiology*. 1967. Vol. 42. Issue 10. P. 1433–1441. <https://doi.org/10.1104/pp.42.10.1433>
12. Lomovatskaya L.A., Romanenko A.S., Filinova N.V., Dudareva L.V. Determination of cAMP in plant cells by a modified enzyme immunoassay method // *Plant Cell Reports*. 2011. Vol. 30. Issue 1. P. 125–132. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0950-5>
13. Medvedev S.S. Calcium signaling system in plants // *Russian Journal of Plant Physiology*. 2005. Vol. 52. Issue 2. P. 249–270. <https://doi.org/10.1007/s11183-005-0038-1>
14. Willoughby D., Cooper D.M.F. Organization and Ca²⁺ regulation of adenylyl cyclases in cAMP microdomains // *Physiological Reviews*. 2007. Vol. 87. Issue 3. P. 965–1010. <https://doi.org/10.1152/physrev.00049.2006>
15. Швартау В.В., Вирыч П.А., Маковейчук Т.И., Артеменко А.Ю. Кальций в растительных клетках // *Вестник Днепропетровского университета. Серия: Биология. Экология*. 2014. Т. 22. N 1. С. 19–32. <https://doi.org/10.15421/011403>
16. Graskova I.A., Borovskii G.B., Kolesnichenko A.V., Voinikov V.K. Peroxidase as a component of the signaling pathway in potato cells during ring rot infection // *Russian Journal of Plant Physiology*. 2004. Vol. 51. Issue 5. P. 621–626. <https://doi.org/10.1023/B:RUPP.0000040747.61131.a9>
17. Tanzarella P., Ferretta A., Barile S.N., Ancona M., de Rasmio D., Signorile A., et al. Increased levels of cAMP by the calcium-dependent activation of soluble adenylyl cyclase in *parkin*-mutant fibroblasts // *Cells*. 2019. Vol. 8. Issue 3. P. 250. <https://doi.org/10.3390/cells8030250>
18. Witters E., Quanten L., Bloemen J., Valcke R., van Onckelen H. Product identification and adenylyl cyclase activity in chloroplasts of *Nicotiana tabacum* // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2004. Vol. 18. Issue 4. P. 499–504. <https://doi.org/10.1002/rcm.1365>
19. Witters E., Valcke R., van Onckelen H. Cytological analysis of adenylyl cyclase activity and 3':5'-cAMP immunolocalization in chloroplasts of *Nicotiana tabacum* // *New Phytologist*. 2005. Vol. 168. Is-

sue 1. P. 99–108. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01476.x>

20. Carricarte V.C., Bianchin G.M., Muschietti J.P., Téllez-Iñón M.T., Peticari A., Torres N., et al. Adenylate cyclase activity in a higher plant, alfalfa (*Medicago sativa*) // *The Biochemical Journal*. 1988. Vol. 249. Issue 3. P. 807–811. <https://doi.org/10.1042/bj2490807>

21. Moutinho A., Hussey P.J., Trevawas A.J., Malho R. cAMP acts as a second messenger in pollen tube growth and reorientation // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2001. Vol. 98. Issue 18. P. 10481–1048. <https://doi.org/10.1073/pnas.171104598>

22. Ma W., Berkowitz G.A. Ca²⁺ conduction by plant cyclic nucleotide gated channels and associated signaling components in pathogen defense signal transduction cascades // *New Phytologist*. 2011. Vol. 190. Issue 3. P. 566–572. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03577.x>

23. Duszyn M., Świeżawska B., Szmidt-Jaworska A., Jaworski K. Cyclic nucleotide gated channels (CNGCs) in plant signalling—Current knowledge and perspectives // *Journal of Plant Physiology*. 2019. Vol. 241. Article no. 153035. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2019.153035>

24. Ломоватская Л.А., Романенко А.С., Криволапова Н.В., Копытчук В.Н., Саляев П.К. Системная активация аденилатциклазы, локализованной в плазмалемме клеток картофеля при бактериальном патогенезе // *Доклады Академии наук*. 2007. Т. 413. N 3. С. 420–423.

25. Ломоватская Л.А., Романенко А.С., Филино-

ва Н.В. Аденилатциклазы растений: влияние биотического стрессора на кинетические параметры трансмембранной и «растворимой» форм аденилатциклазы // *Биологические мембраны*. 2014. Т. 31. N 2. С. 129–136. <https://doi.org/10.7868/S0233475514010071>

26. Romanenko A.S., Lomovatskaya L.A., Shafikova T.N., Borovskii G.B., Krivolapova N.V. Potato cell plasma membrane receptors to ring rot pathogen extracellular polysaccharides // *Journal of Phytopathology*. 2003. Vol. 151. Issue 1. P 1–6. <https://doi.org/10.1046/J.1439-0434.2003.00667.x>

27. Bianchet C., Wong A., Quaglia M., Alqurashi M., Gehring C., Ntoukakis V., et al. An *Arabidopsis thaliana* leucine-rich repeat protein harbors an adenylyl cyclase catalytic center and affects responses to pathogens // *Journal of Plant Physiology*. 2019. Vol. 232. P. 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.10.025>

28. Пятыгин С.С., Воденев В.А., Опритов В.А. Деполяризация плазматической мембраны как универсальная первичная биоэлектрическая реакция растительных клеток на действия различных // *Успехи современной биологии*. 2006. Т. 126. N 5. С. 492–502.

29. Cooper D.M.F., Shell M.J., Thorn P., Irvine R.F. Regulation of adenylyl cyclase by membrane potential // *Journal of Biological Chemistry*. 1998. Vol. 273. Issue 42. P. 27703–27707. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.42.27703>

30. Pittman J.K. Vacuolar Ca²⁺ uptake // *Cell Calcium*. 2011. Vol. 50. Issue 2. P. 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2011.01.004>

REFERENCES

1. Gehring C, Turek I. Cyclic nucleotide monophosphates and their cyclases in plant signaling. *Frontiers Plant Science*. 2011;8. Article 1704. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01704>

2. Leipe DD, Koonin EV, Aravind L. STAND, a class of P-loop NTPases including animal and plant regulators of programmed cell death: multiple, complex domain architectures, unusual phyletic patterns, and evolution by horizontal gene transfer. *Journal of Molecular Biology*. 2004;343(1):1–28. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.08.023>

3. Al-Younis I, Wong A, Gehring C. The *Arabidopsis thaliana* K⁺-uptake permease 7 (AtKUP7) contains a functional cytosolic adenylyl cyclase catalytic centre. *FEBS Letters*. 2015;589(21B):3848–3852. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.11.038>

4. Chatukuta P, Dikobe TB, Kawadza DT, Sehlabane KS, Takundwa MM, Wong A, et al. An *Arabidopsis clathrin* assembly protein with a predicted role in plant defense can function as an adenylyl cyclase. *Biomolecules*. 2018;8(2):15. <https://doi.org/10.3390/biom8020015>

5. Kasahara M, Suetsugu N, Urano Y, Yamamoto C, Ohmori M, Takada Y, et al. An adenylyl cyclase with a phosphodiesterase domain in basal plants with a motile sperm system. *Scientific Reports*. 2016;6.

Article no. 39232. <https://doi.org/10.1038/srep39232>

6. Halls ML, Cooper DMF. Regulation by Ca²⁺-signaling pathways of adenylyl cyclases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2011;3(1). Article no. a004143. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004143>

7. Johnson JM, Reichelt M, Vadassery J, Gershenzon J, Oelmüller R. An *Arabidopsis* mutant impaired in intracellular calcium elevation is sensitive to biotic and abiotic stress. *BMC Plant Biology*. 2014;14(1). Article no. 162. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-162>

8. Hepler PK. Calcium: a central regulator of plant growth and development. *The Plant Cell*. 2005;17(8):2142–2155. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.032508>

9. Ma SY, Zhao M. Calcium regulation of *Arabidopsis* salt resistance. *Acta Agronomica Sinica*. 2006;32(11):1706–1711.

10. Moeder W, Urquhart W, Ung H, Yoshioka K. The role of cyclic nucleotide-gated ion channels in plant immunity. *Molecular Plant*. 2011;4(3):442–452. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp018>

11. Strobel GA. Purification and properties of a phytotoxic polysaccharide produced by *Corynebacterium sepedonicum*. *Plant Physiology*. 1967;42(10):1433–1441. <https://doi.org/10.1104/pp.42.10.1433>

12. Lomovatskaya LA, Romanenko AS, Filinova NV, Dudareva LV. Determination of cAMP in plant cells by a modified enzyme immunoassay method. *Plant Cell Reports*. 2011;30(1):125–132. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0950-5>
13. Medvedev SS. Calcium signaling system in plants. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2005;52(2):249–270. <https://doi.org/10.1007/s11183-005-0038-1>
14. Willoughby D, Cooper DMF. Organization and Ca²⁺ regulation of adenylyl cyclases in cAMP microdomains. *Physiological Reviews*. 2007;87(3):965–1010. <https://doi.org/10.1152/physrev.00049.2006>
15. Schwartau VV, Virych PA, Makoveychuk TI, Artemenko AY. Calcium in plant cells. *Vestnik Dnepropetrovskogo universiteta. Seriya: Biologiya. Ekologiya = Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, ecology*. 2014;22(1):19–32. (In Russian) <https://doi.org/10.15421/011403>
16. Graskova IA, Borovskii GB, Kolesnichenko AV, Voinikov VK. Peroxidase as a component of the signaling pathway in potato cells during ring rot infection. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2004;51(5):621–626. <https://doi.org/10.1023/B:RUPP.0000040747.61131.a9>
17. Tanzarella P, Ferretta A, Barile SN, Ancona M, de Rasmio D, Signorile A, et al. Increased levels of cAMP by the calcium-dependent activation of soluble adenylyl cyclase in *parkin*-mutant fibroblasts. *Cells*. 2019;8(3):250. <https://doi.org/10.3390/cells8030250>
18. Witters E, Quanten L, Bloemen J, Valcke R, van Onckelen H. Product identification and adenylyl cyclase activity in chloroplasts of *Nicotiana tabacum*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2004;18(4):499–504. <https://doi.org/10.1002/rcm.1365>
19. Witters E, Valcke R, van Onckelen H. Cytoenzymological analysis of adenylyl cyclase activity and 3':5'-cAMP immunolocalization in chloroplasts of *Nicotiana tabacum*. *New Phytologist*. 2005;168(1):99–108. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01476.x>
20. Carricarte VC, Bianchin GM, Muschietti JP, Téllez-Iñón MT, Peticari A, Torres N, et al. Adenylate cyclase activity in a higher plant, alfalfa (*Medicago sativa*). *The Biochemical Journal*. 1988;249(3):807–811. <https://doi.org/10.1042/bj2490807>
21. Moutinho A, Hussey PJ, Trevewas AJ, Malho R. cAMP acts as a second messenger in pollen tube growth and reorientation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2001;98(18):10481–10488. <https://doi.org/10.1073/pnas.171104598>
22. Ma W, Berkowitz GA. Ca²⁺ conduction by plant cyclic nucleotide gated channels and associated signaling components in pathogen defense signal transduction cascades. *New Phytologist*. 2011;190(3):566–572. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03577.x>
23. Duszyn M, Świeżawska B, Szmidt-Jaworska A, Jaworski K. Cyclic nucleotide gated channels (CNGCs) in plant signalling—Current knowledge and perspectives. *Journal of Plant Physiology*. 2019;241. Article no. 153035. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2019.153035>
24. Lomovatskaya LA, Romanenko AS, Krivolapova NV, Kopytchuk VN, Salyaev RK. Systemic activation of adenylate cyclase localized in the plasma membrane of potato cells during bacterial pathogenesis. *Doklady Akademii nauk*. 2007;413(3):420–423. (In Russian)
25. Lomovatskaya LA, Romanenko AS, Filinova NV. Plant adenylate cyclases: the effect of a biotic stressor on the kinetic parameters of transmembrane and “soluble” forms of adenylate cyclases. *Biologicheskie membrany*. 2014, vol. 31, no 2. pp.129–136. (In Russian)
26. Romanenko AS, Lomovatskaya LA, Shafikova TN, Borovskii GB, Krivolapova NV. Potato cell plasma membrane receptors to ring rot pathogen extracellular polysaccharides. *Journal of Phytopathology*. 2003;151(1):1–6. <https://doi.org/10.1046/J.1439-0434.2003.00667.x>
27. Bianchet C, Wong A, Quaglia M, Alqurashi M, Gehring C, Ntoukakis V, et al. An *Arabidopsis thaliana* leucine-rich repeat protein harbors an adenylyl cyclase catalytic center and affects responses to pathogens. *Journal of Plant Physiology*. 2019;232:12–22. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.10.025>
28. Pyatygin SS, Vodeneev VA, Opritov VA. Depolarization of plasma membrane as the universal primary bioelectnc response of plant cells to action of different factors. *Uspekhi sovremennoi biologii*. 2006;126(5):493–502. (In Russian)
29. Cooper DMF, Shell MJ, Thorn P, Irvine RF. Regulation of adenylyl cyclase by membrane potential. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(42):27703–27707. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.42.27703>
30. Pittman JK. Vacuolar Ca²⁺ uptake. *Cell Calcium*. 2011;50(2):139–146. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2011.01.004>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Филинова Надежда Владимировна,
к.б.н., научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
а/я 317,
Российская Федерация,
✉ e-mail: filinova@sifibr.irk.ru

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Nadegda V. Filinova,
Cand. Sci. (Biology), Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
✉ e-mail: filinova@sifibr.irk.ru

Ломоватская Лидия Арнольдовна,
д.б.н., профессор,
ведущий научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
а/я 317,
Российская Федерация,
e-mail: LidaL@sifibr.irk.ru

Романенко Анатолий Сидорович,
д.б.н., профессор,
главный научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
а/я 317,
Российская Федерация,
e-mail: rom@sifibr.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 19.10.2020.
Одобрена после рецензирования 14.01.2021.
Принята к публикации 30.08.2021.*

Lidiya A. Lomovatskaya
Dr. Sci. (Biology), Professor,
Leading Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
e-mail: LidaL@sifibr.irk.ru

Anatoliy S. Romanenko
Dr. Sci. (Chemistry), Professor,
Chief Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation
e-mail: rom@sifibr.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 approved
by all the co-authors.*

*The article was submitted 19.10.2020.
Approved after reviewing 14.01.2021.
Accepted for publication 30.08.2021.*

Оригинальная статья / Original article

УДК 631.871 : 581.142: 661.52

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-413-420>



Раствор азотной кислоты после обработки мискантуса как регулятор роста гороха посевного (*Pisum sativum* L.) *in vitro*

© Е.А. Скиба*, М.А. Скиба**, О.И. Пятунина**

*Институт проблем химико-энергетических технологий СО РАН,
г. Бийск, Российская Федерация

**Краевое государственное бюджетное общеобразовательное учреждение
«Бийский лицей-интернат Алтайского края», г. Бийск, Российская Федерация

Резюме: Мискантус во всем мире позиционируется как чрезвычайно перспективное быстровозобновляемое целлюлозосодержащее сырье для производства большого числа веществ химического и биотехнологического синтеза. В Институте проблем химико-энергетических технологий СО РАН разрабатываются авторские способы обработки мискантуса разбавленными растворами азотной кислоты, при этом количество отработанного раствора (жидкой фазы) в 20 раз больше, чем целевого продукта – твердой фазы, предназначенной для ферментативного гидролиза и дальнейшего микробиологического синтеза биоэтанола, бактериальной целлюлозы и других ценных продуктов. Была выдвинута гипотеза, что раствор азотной кислоты после обработки мискантуса, нейтрализованный гидратом аммония (далее препарат), представляет собой комбинированное лигногуминовое удобрение. Для проверки этой гипотезы исследована рострегулирующая активность препарата на примере семян гороха посевного. Установлено, что в зависимости от степени разведения и времени выдержки препарат действует двояственно: то как стимулятор, то как ингибитор роста. Так, при степени разведения 1:10 препарат действует как ингибитор, а при степени разведения 1:1 000 000 действие препарата перестает проявляться. Рабочим диапазоном является степень разведения от 1:100 до 1:10 000, когда наблюдается повышение энергии прорастания и всхожести на 2–6% по сравнению с контролем и стимулируется рост корней на 21–29%, то есть, проявляется ауксиноподобное ростстимулирующее действие. При длительной выдержке в течение 4-х суток препарат показывает ростингибирующее действие: снижаются энергия прорастания, всхожесть, длина стеблей и корней гороха посевного. Поскольку новый препарат в определенных условиях показал ростстимулирующую активность, можно считать подтвержденным, что он является комбинированным лигногуминовым удобрением.

Ключевые слова: мискантус, азотная кислота, горох посевной, рострегулирование

Благодарности: Работа выполнена в рамках госзадания 121061500030-3.

Для цитирования: Скиба Е.А., Скиба М.А., Пятунина О.И. Раствор азотной кислоты после обработки мискантуса как регулятор роста гороха посевного (*Pisum sativum* L.) *in vitro*. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т. 11. N 3. С. 413–420. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-413-420>

Nitric acid solution after treating miscanthus as a growth regulator of seed peas (*Pisum sativum* L.) *in vitro*

Ekaterina A. Skiba*, Maria A. Skiba**, Olga I. Pyatunina**

*Institute for Problems of Chemical and Energetic Technologies SB RAS,
Biysk, Russian Federation

**Biysk Lyceum School of Altai Region, Biysk, Russian Federation

Abstract: All over the world, miscanthus is positioned as an extremely promising and rapidly renewable cellulose-containing raw material for the production of a large number of substances of chemical and biotechnological synthesis. The Institute for Problems of Chemical and Energetic Technologies of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences has been developing its own methods of treating miscanthus using diluted solutions of nitric acid. While the amount of a waste solution (liquid phase) is 20 times greater than the target product — a solid phase -- intended for enzymatic hydrolysis and further microbiological synthesis of

bioethanol, bacterial cellulose and other valuable products. The hypothesis states that a nitric acid solution after treatment with miscanthus, which was neutralized with ammonium hydrate (hereinafter referred to as the preparation), is a combined lignohumic fertilizer. Testing this hypothesis has required studying the growth-regulating activity of the preparation using the example of sowing pea seeds. The results show that, depending on the degree of dilution and the exposure time, the preparation acts in two ways: either as a stimulant or as a growth inhibitor. Thus, at a dilution rate of 1:10, the preparation acts as an inhibitor, and at a dilution rate of 1:1,000,000, its effect ceases. The working range includes the dilution rate between 1:100 and 1:10,000, when an increase in germination energy and rate is observed by 2–6% compared to the control and root growth is stimulated by 21–29%, i.e. an auxin-like growth-stimulating effect is observed. With prolonged endurance during the 4th day, the preparation showed a growth-inhibiting effect, indicated by the decrease in the germination energy and rate, the length of the stems and roots of the sowing pea. The new preparation showing growth-stimulating activity under certain conditions, supposedly confirms the hypothesis that it is a combined lignohumic fertilizer.

Keywords: miscanthus, nitric acid, seed peas, growth regulation

Acknowledgments: This work was performed under Governmental contract no. 121061500030-3.

For citation: Skiba EA, Skiba MA, Pyatunina OI. Nitric acid solution after treating miscanthus as a growth regulator of seed peas (*Pisum sativum* L.) *in vitro*. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(3):413–420. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-413-420>

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в мировом сообществе активно развивается концепция экономики замкнутого цикла, основные принципы которой включают в себя возобновление ресурсов, переработку вторичного сырья, переходе от ископаемого топлива к использованию возобновляемых источников энергии [1, 2].

Чрезвычайно перспективным сырьём является мискантус – быстрорастущая («энергетическая») многолетняя злаковая техническая культура. Его биологической особенностью является высокая скорость роста надземной биомассы. От других трав (как однолетних, так и многолетних) его отличает высокое содержание целлюлозы. В связи с этим мискантус позиционируется как глобальное значимое целлюлозосодержащее сырьё, призванное частично заменить такой невозобновляемый ресурс, как нефть в производстве широкого спектра веществ химического и биотехнологического синтеза [3–5].

В 2013 г. в Институте цитологии и генетики (ИЦиГ) СО РАН (г. Новосибирск) был зарегистрирован сорт мискантуса Сорановский. В течение 15 лет возделывания его урожайность составляет 12 т/га [6, 7]. Этот вид мискантуса обладает высоким потенциалом для выращивания в условиях Западной Сибири [8]. В 2019–2020 гг. заложены промышленные плантации мискантуса сорта Камис в 7 регионах Российской Федерации¹. В Институте проблем химико-энергетических технологий (ИПХЭТ) СО РАН разработка технологий переработки мискантуса ведется с 2008 г., и к настоящему времени из него получены целлюлоза и ее эфиры, в том числе нитраты, бумага, глюкоза, биоэтанол, бактериальная целлюлоза, молочная кислота [9–14]. Для перера-

ботки мискантуса предложены авторские способы извлечения целлюлозы и предварительной химической обработки с целью последующей биотехнологической трансформации. Эти способы основаны на использовании разбавленных растворов азотной кислоты. Целевым продуктом является твердая фаза, которая используется в дальнейшем для ферментативного гидролиза или извлечения целлюлозы, а побочным – жидкая фаза, которой образуется в 20 раз больше, чем целевой.

Под действием азотной кислоты происходят реакции нитрования и конденсации лигнина, а также из полисахаридов (целлюлозы и гемицеллюлоз) образуются муравьиная, леволиновая, уксусная и другие органические кислоты [9, 10]. То есть, под действием азотной кислоты происходит гумификация органических веществ (целлюлозы, гемицеллюлоз и лигнина) мискантуса. Гуминовые вещества, растворимые в кислотах, относят к фракции фульвокислот [15]. Можно предположить, что отработанный раствор азотной кислоты, нейтрализованный гидроксидом аммония, представляет собой комбинированное лигногуминовое удобрение: включает органическую составляющую: фульвокислоты, органические кислоты, нитрованный лигнин и минеральную составляющую: нитрат аммония. Однако эта гипотеза требует доказательств.

Рострегулирующие свойства гуминовых веществ широко обсуждаются в литературе, но при этом сведений об использовании фракции фульвокислот очень мало, что связано с тем, что обычно используются фракции, извлекаемые с помощью щёлочи, например, из торфа или бурого угля, или из других источников гуминовых веществ [15–18]. Но в единичных работах, напри-

¹Целлюлоза – не только лес [Электронный ресурс]. URL: <http://www.proektnoegosudarstvo.ru/pse-ssion/1438/> (10.10.2020).

мер в кандидатской диссертации Е.Ю. Егоровой², показана эффективность извлечения гуминовых кислот из торфа с помощью 2,5%-го раствора азотной кислоты, при этом извлеченные фракции показали хорошие результаты как на стадии предпосевной обработки, так и на стадии возделывания моркови, картофеля и томатов.

Целью данной работы являлось исследование рострегулирующей активности раствора, полученного после обработки мискантуса разбавленным раствором азотной кислоты, на примере семян гороха посевного. Бобовые растения ассоциированы с азотфиксирующими бактериями и мало нуждаются в азоте. Если обработка гороха отработанным раствором положительно скажется на энергии прорастания и всхожести гороха, то можно предположить, что более требовательные культуры еще лучше отреагируют на такую предпосевную обработку.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В данной работе был использован мискантус сахароцветковый (или сахароцветный) – *Miscanthus saccharifloris* (Maxim.) Hack (авторская форма веерник *Andersson*), выращенный в условиях резко континентального климата Западной Сибири (г Бийск), где средняя температура зимой составляет $-15,1^{\circ}\text{C}$, летом – $17,7^{\circ}\text{C}$, среднегодовая норма осадков – 459 мм. Посадочный материал был предоставлен ИЦиГ СО РАН. Возраст плантации – 7 лет. Мискантус состоял из, м.д., % в пересчете на АСВ: целлюлозы по Кюршнеру – $52,0 \pm 0,3$, пентозанов – $20,3 \pm 0,2$, кислотонерастворимого лигнина – $21,7 \pm 0,1$, и золы – $5,9 \pm 0,1$.

Мискантус был измельчен с помощью соломорезки Gardena (Германия) до размера частиц не более 10 мм и обработан 4%-м раствором азотной кислоты на опытно-промышленном производстве ИПХЭТ СО РАН в стандартном емкостном оборудовании объемом 250 л при атмосферном давлении, температуре $92\text{--}96^{\circ}\text{C}$, гидромодуле 1:20. Далее раствор был отделен от твердой фракции и нейтрализован с помощью гидроксида аммония.

Отработанный и нейтрализованный раствор 4%-й азотной кислоты (далее препарат) имел следующий химический состав: сухих веществ – 4,54%, в том числе: солей аммония – 1,13%, восстанавливающих сахаров – 1,13% (в том числе глюкозы – 0,17%).

Горох посевной (*Pisum sativum* L.) был предоставлен ООО «Курай Агро Плюс» (Алтайский край, Бийский р-н, пос. Боровой). По посевным качествам семена гороха соответствовали 2-му классу согласно ГОСТ 10246-86. В работе

намеренно использованы семена 2-го класса, чтобы разница между контрольными и опытными результатами была более заметна.

Исследования энергии прорастания и всхожести проведены в соответствии с требованиями ГОСТ 12038-84 «Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести». Модификация состояла в проращивании на вискозе ролонным методом. Проращивание семян осуществляли в термостате ТСО-1/80 СПУ при температуре 20°C . Опыты проведены в 4-х повторностях и обработаны статистически. Допускаемое отклонение результатов анализа отдельных проб от среднего составила не более $\pm 6\%$.

Рострегулирующая активность препарата исследована при степенях разведения препарата 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10 000, 1:100 000. В качестве контроля использована водопроводная вода. Продолжительность выдержки семян гороха в препарате составила 2 ч и 4 суток.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Определение степени разведения препарата для его использования в качестве рострегулятора. Продолжительность выдержки в препарате составила 2 ч. Энергия прорастания и всхожесть при разведениях препарата от 1:10 до 1:100 000 представлены на рис. 1. Степень разведения препарата 1:10 являлась недостаточной, так как при ее использовании энергия прорастания уменьшается на 35%, а всхожесть – на 17% по сравнению с контролем. При степенях разведения от 1:100 до 1:10 000 наблюдалось повышение энергии прорастания и всхожести на 2–6% по сравнению с контролем. Дальнейшее увеличение степени разведения до 1:100 000 привело к результатам, аналогичным контролю, то есть это разведение было избыточным.

Эти выводы подтвердились при измерении морфометрических показателей (рис. 2). Энергия прорастания определялась на 4-е сутки. В этот момент, при степенях разведения от 1:100 до 1:10 000, длина стеблей была выше контроля на 12–28%, а длина корней – на 21–29%. Степень разведения 1:10 являлась недостаточной: длина стеблей меньше на 25%, корней – на 16% по сравнению с контролем, то есть при этой степени разведения препарат действовал как ингибитор роста семян гороха. Степень разведения 1:100 000 являлась избыточной: длина стеблей и корней примерно были равны контрольным, то есть при этой степени разведения препарат переставал действовать в силу избыточного разбавления.

Всхожесть семян гороха определялась на 8-е сутки. При степени разведения 1:10 отставание

²Егорова Е.Ю. Эффективность препаратов на основе гуминовых кислот торфа под сельскохозяйственные культуры в условиях луговой степи Алтайского края: дисс. ... канд. с-х. наук: 06.01.04. Барнаул, 2000. 148 с.

длины стеблей от контрольной сокращалось до 24%, корней – до 9% по сравнению с контролем, то есть частично снималось ингибирующее воздействие. При степенях разведения от 1:100 до 1:10 000 длина стеблей в контрольном и опытных вариантах уравнивалась, а длина корней была выше, чем в контроле, на 14–20%. Овидно, что исследуемый препарат обладает гормоноподобным действием и проявляет себя как ауксин. При степени разведения 1: 100 000 длины стеблей и корней оставались примерно равными контрольным.

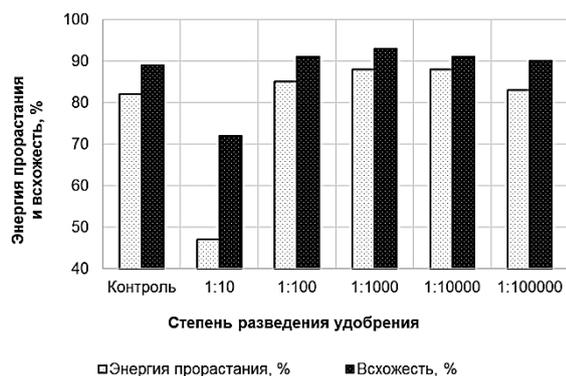


Рис. 1. Энергия прорастания и всхожесть гороха посевного при разведениях препарата от 1:10 до 1:100 000

Fig. 1. Germination energy and capacity of garden pea at preparation dilutions from 1:10 to 1:100 000

Явление, когда в зависимости от концентрации вещество может быть стимулятором или ингибитором роста растения, описано в литературе² [15, 19]. Поскольку новый препарат показал ростстимулирующую активность, можно считать подтвержденным, что он является комбинированным лигногуминовым удобрением. Ростстимулирующая активность проявлялась при степенях разведения от 1:100 до 1:10 000, именно этот диапазон следует считать рабочим.

В работе [20] при проращивании семян гороха в воде приводятся следующие данные: энергия прорастания – 45%, при этом длина стебля –

0,7 см, длина корня – 3,3 см. В контрольном опыте в нашей работе энергия прорастания составила 82%, при этом длина стебля – 2,4 см, длина корня – 5,0 см. Расхождения могут быть обусловлены использованием разных сортов гороха.

Исследование рострегулирующей активности препарата при длительной выдержке. Потребители не всегда читают инструкции к препаратам. Они полагают, что для более эффективной ростстимуляции семена нужно дольше выдерживать в растворе рострегулятора. Нами в данном опыте выдержка в исследуемом препарате составила 4 суток вместо 2–4 ч, степень разведения препарата выполнена в рабочем диапазоне от 1:100 до 1:10 000. Однако во всех вариантах длительная выдержка привела к значительному снижению энергии прорастания и всхожести, причем снижение было тем значительнее, чем меньше степень разведения препарата (рис. 3). Так, для варианта разбавления 1:100 энергия прорастания снизилась на 10%, всхожесть – на 9% по сравнению с контролем. То есть при длительной выдержке препарат действует как ингибитор.

Эти же выводы можно сделать, анализируя морфометрические показатели гороха посевного, полученные при его длительной выдержке в препарате (рис. 4). В течение первых 4-х суток семена гороха находились в неблагоприятных условиях, в результате для варианта разбавления 1:100 длина стеблей была меньше на 50%, корней – на 25% по сравнению с контролем. Далее препарат был заменен на воду и через 8 суток показатели роста улучшились. Так, длина стеблей стала меньше, чем в контроле, на 26–9%, а длина корней – на 22–11%. Для больших разбавлений (1:1000 и 1:10 000) длина стеблей меньше, чем в контроле, на 17 и 9% соответственно, а длина корней – на 17 и 11% соответственно. То есть за 4 суток растениям не удалось в достаточной мере восстановиться от угнетения.

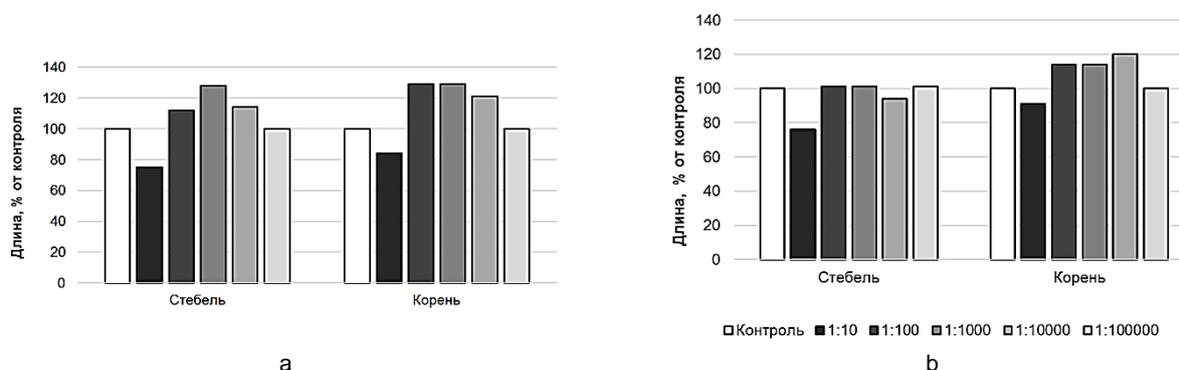


Рис. 2. Морфометрические показатели гороха посевного при различных степенях разведения препарата: а – при определении энергии прорастания; б – при определении всхожести

Fig. 2. Morphological characteristics of garden pea at different dilutions of the preparation: а – measured germination energy; б – measured germination capacity

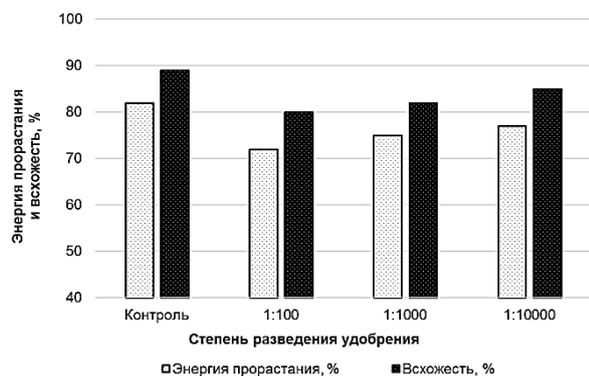


Рис. 3. Энергия прорастания и всхожесть гороха посевного при длительной выдержке в препарате

Fig. 3. Germination energy and capacity of garden pea when held in the preparation for a prolonged time

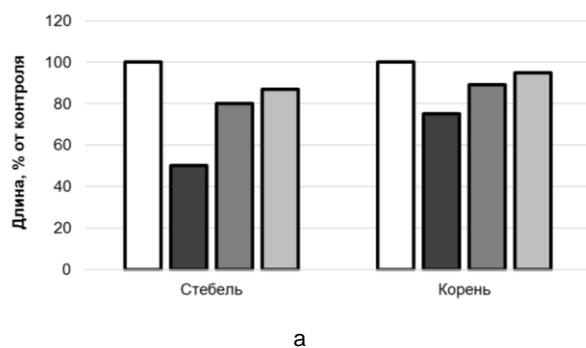


Рис. 4. Морфометрические показатели гороха посевного при длительной выдержке в препарате: а – при определении энергии прорастания; б – при определении всхожести

Fig. 4. Morphological characteristics of garden pea when held in the preparation for a prolonged time: а – measured germination energy; б – measured germination capacity

ВЫВОДЫ

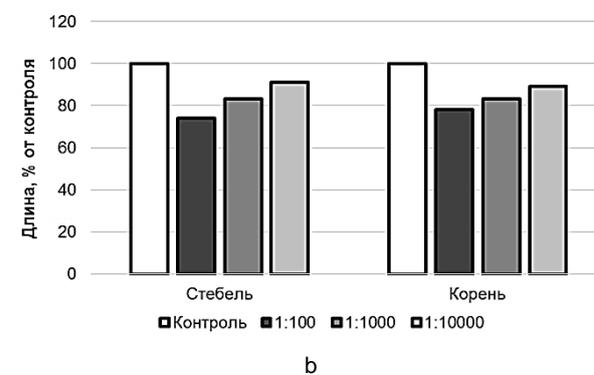
В зависимости от степени разведения и времени выдержки раствор азотной кислоты после обработки мискантуса (препарат) действует двойственно: то как стимулятор, то как ингибитор роста.

Степень разведения препарата 1:10 является недостаточной, при ней препарат действует как ингибитор, а степень разведения 1:1000 000 – избыточной, действие препарата не проявляется.

Рабочим диапазоном разведения препарата является соотношение от 1:100 до 1:10 000, тогда в нем наблюдается повышение энергии про-

растания и всхожести на 2–6% по сравнению с контролем и стимулируется рост корней на 21–29%, то есть, проявляется ауксиноподобное ростстимулирующее действие препарата.

В последующем планируется исследовать влияние препарата на зерновые культуры (пшеницу (*Triticum*) или овес посевной (*Avena sativa*)), так как эти культуры имеют важное сельскохозяйственное значение, а также на корнеплоды – морковь посевную (*Daucus carota subsp. sativus*) или свеклу обыкновенную (*Beta vulgaris*)), поскольку эти культуры чувствительны к действию гуматов². Ожидается более интенсивная ростстимулирующая активность исследуемого препарата для указанных культур. Кроме того, сотрудниками Алтайского государственного аграрного университета (г. Барнаул) планируется испытание нового комбинированного лигногуминового удобрения в полевых условиях.



растания и всхожести на 2–6% по сравнению с контролем и стимулируется рост корней на 21–29%, то есть, проявляется ауксиноподобное ростстимулирующее действие препарата.

При длительной выдержке в течение 4-х суток препарат показывает устойчивое ростингибирующее действие: снижаются энергия прорастания, всхожесть, длина стеблей и корней гороха посевного.

Поскольку новый препарат в определенных условиях показал ростстимулирующую активность, можно считать подтвержденным, что он является комбинированным лигногуминовым удобрением.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Geissdoerfer M., Savaget P., Bocken N.M.P., Hultink E.J. The circular economy – a new sustainability paradigm? // *Journal of Cleaner Production*. 2017. Vol. 43. P. 757–768. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.12.048>
2. Negro C., Garcia-Ochoa F., Tanguy P., Ferreira G., Thibault J., Yamamoto S., et al. 2018. Barcelona declaration – 10th world congress of chemi-

- cal engineering, 1–5 October 2017. // *Chemical Engineering Research and Design*. 2018. Vol. 129. P. A1–A2. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2017.12.035>
3. Kang K.E., Jeong J.-S., Kim Y., Min J., Moon S.-K. Development and economic analysis of bioethanol production facilities using lignocellulosic biomass // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2019. Vol. 128. Issue 4. P. 475–479. <https://doi.org/>

10.1016/j.jbiosc.2019.04.004

4. Dubis B., Bułkowska K., Lewandowska M., Szempliński W., Jankowski K.J., Idźkowski J., et al. Effect of different nitrogen fertilizer treatments on the conversion of *Miscanthus giganteus* to ethanol // *Bioresource Technology*. 2017. Vol. 243. P. 731–737. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.005>

5. Zhang Y., Oates L.G., Serate J., Xie D., Pohlmann E., Bukhman Y.V., et al. Diverse lignocellulosic feedstocks can achieve high field-scale ethanol yields while providing flexibility for the biorefinery and landscape-level environmental benefits // *GCB Bioenergy*. 2018. 16 p. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12533>

6. Капустянич С.Ю., Бурмакина Н.В., Якименко В.Н. Оценка эколого-агрохимического состояния агроценоза с многолетним выращиванием мискантуса в Западной Сибири // *Агрохимия*. 2020. N. 9. С. 65–73. <https://doi.org/10.31857/S0002188120090082>

7. Капустянич С.Ю., Поцелуев О.М., Галицын Г.Ю., Лихенко И.Е., Будаева В.В., Гисматулина Ю.А. [и др.]. Эколого-биологическая оценка перспективной технической культуры *Miscanthus sacchariflorus* // *Достижения науки и техники АПК*. 2020. Т. 34. N 1. С. 42–46. <https://doi.org/10.24411/0235-2451-2020-10108>

8. Dorogina O.V., Vasilyeva O.Yu., Nuzhdina N.S., Buglova L.V., Gismatulina Yu.A., Zhmud E.V., et al. Resource potential of some species of the genus *Miscanthus* Anderss. under conditions of continental climate of West Siberian foreststeppe // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2018. Т. 22. N 5. С. 553–559. <https://doi.org/10.18699/VJ18.394>

9. Budaeva V.V., Makarova E.I., Gismatulina Yu.A. Integrated Flowsheet for Conversion of Non-woody Biomass into Polyfunctional Materials // *Key Engineering Materials*. 2016. Vol. 670. P. 202–206. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.670.202>

10. Skiba E.A., Budaeva V.V., Vaibakova O.V., Zolotukhin V.N., Sakovich G.V. Dilute nitric-acid pretreatment of oat hulls for ethanol production // *Biochemical Engineering Journal*. 2017. Vol. 126. P. 118–125. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.09.003>

11. Gismatulina Yu.A., Budaeva V.V. Chemical composition of five *Miscanthus sinensis* harvests and nitric-acid cellulose therefrom // *Industrial Crops and Products*. 2017. Vol. 109. P. 227–232. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.08.026>

12. Корчагина А.А., Гисматулина Ю.А., Будаева В.В., Золотухин В.Н., Бычин Н.В., Сакович Г.В. Мискантус гигантский сорта «Камис» – новое сырье для нитратов целлюлозы // *Журнал Сибирского федерального университета. Химия*. 2020. Т. 13. N 4. С. 565–577. <https://doi.org/10.17516/1998-2836-0206>

13. Skiba E.A., Gladysheva E.K., Golubev D.S., Budaeva V.V., Aleshina L.A., Sakovich G.V. Self-standardization of quality of bacterial cellulose produced by *Medusomyces gisevii* in nutrient media derived from *Miscanthus* biomass // *Carbohydrate Polymers*. 2021. Vol. 252. P. 117178. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117178>

14. Gismatulina Y.A., Budaeva V.V., Sakovich G.V. Nitrocellulose synthesis from *Miscanthus* cellulose // *Propellants Explosives Pyrotechnics*. 2018. Vol. 43. Issue 1. P. 96–100. <https://doi.org/10.1002/prep.201700210>

15. Попов А.И. Гуминовые вещества: свойства, строение, образование / под ред. Е.И. Ермакова. СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2004. 248 с.

16. Духанина И.Я., Верещагин А.Л., Егорова Е.Ю., Степанова Н.В. Влияние состава экстрактов торфа и биогумуса на их физиологическую активность // *Химия растительного сырья*. 1998. N. 4. С. 47–51.

17. Суханова И.М., Алиев Ш.А., Газизов Р.Р., Ильясов М.М., Рахманова Г.Ф., Сидоров В.В. Влияние обработки семян органоминеральными суспензиями и их наноаналогами на морфометрические параметры проростков // *Эффективное растениеводство*. 2017. N. 8. С. 70–72.

18. Белопухов С.Л., Гришина Е.А. Исследование химического состава и ростстимулирующего действия экстрактов из гумифицированной льняной костры // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2012. N. 1 (2). С. 97–103.

19. Прусакова Л.Д., Кефели В.И., Белопухов С.Л., Вакуленко В.В., Кузнецова С.А. Роль фенольных соединений в растениях // *Агрохимия*. 2008. N. 7. С. 86–96.

20. Павлова А.А., Верещагин А.Л., Чацилов Д.В. Влияние препаратов из частей растений вьюнка полевого (*Convolvulus arvensis* L.) и сроков сбора на морфометрические показатели прорастающих семян гороха (*Pisum sativum* L.) // *Вестник алтайской науки*. 2014. N. 4. С. 162–165.

REFERENCES

1. Geissdoerfer M, Savaget P, Bocken NMP, Hultink EJ. The circular economy – a new sustainability paradigm? *Journal of Cleaner Production*. 2017;43:757–768. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.12.048>

2. Negro C, Garcia-Ochoa F, Tanguy P, Ferreira G, Thibault J, Yamamoto S., et al. 2018. Barcelona declaration – 10th world congress of chemical engineering, 1–5 October 2017. *Chemical Engineering*

Research and Design. 2018;129:A1–A2. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2017.12.035>

3. Kang KE, Jeong J-S, Kim Y, Min J, Moon S-K. Development and economic analysis of bioethanol production facilities using lignocellulosic biomass. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2019;128(4):475–479. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.04.004>

4. Dubis B, Bułkowska K, Lewandowska M,

Szempliński W, Jankowski KJ, Idźkowski J, et al. Effect of different nitrogen fertilizer treatments on the conversion of *Miscanthus giganteus* to ethanol. *Bioresource Technology*. 2017;243:731–737. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.005>

5. Zhang Y, Oates LG, Serate J, Xie D, Pohlmann E, Bukhman YV, et al. Diverse lignocellulosic feedstocks can achieve high field-scale ethanol yields while providing flexibility for the biorefinery and landscape-level environmental benefits. *GCB Bioenergy*. 2018. 16 p. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12533>

6. Kapustyanchik SYu, Burmakina NV, Yakimenko VN. Assessment of the ecological and agrochemical state of the agrocenosis with long-term cultivation of miscanthus in Western Siberia. *Agrokhimiya*. 2020;9:65–73. (In Russian) <https://doi.org/10.31857/S0002188120090082>

7. Kapustyanchik SYu, Potseluev OM, Galitsyn GYu, Likhenko IE, Budaeva VV, Gismatulina YuA, et al. Ecological and biological assessment of the promising technical crop *Miscanthus sacchariflorus*. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK = Achievements of Science and Technology in Agro-Industrial Complex*. 2020;34(1):42–46. (In Russian) <https://doi.org/10.24411/0235-2451-2020-10108>

8. Dorogina OV, Vasilyeva OYu, Nuzhdina NS, Buglova LV, Gismatulina YuA, Zhmud EV, et al. Resource potential of some species of the genus *Miscanthus* Anderss. under conditions of continental climate of West Siberian foreststeppe. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(5):553–559. <https://doi.org/10.18699/VJ18.394>

9. Budaeva VV, Makarova EI, Gismatulina YuA. Integrated Flowsheet for Conversion of Non-woody Biomass into Polyfunctional Materials. *Key Engineering Materials*. 2016;670:202–206. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.670.202>

10. Skiba EA, Budaeva VV, Baibakova OV, Zolotukhin VN, Sakovich GV. Dilute nitric-acid pretreatment of oat hulls for ethanol production. *Biochemical Engineering Journal*. 2017;126:118–125. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.09.003>

11. Gismatulina YuA, Budaeva VV. Chemical composition of five *Miscanthus sinensis* harvests and nitric-acid cellulose therefrom. *Industrial Crops and Products*. 2017;109:227–232. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.08.026>

12. Korchagina AA, Gismatulina YuA, Budaeva VV, Zolotukhin VN, Bychin NV, Sakovich GV. *Miscanthus* × *giganteus* var. KAMIS as a new feedstock for cellulose nitrates. *Journal of Siberian Federal University. Chemistry*. 2020;13(4):565–577. (In Russian) <https://doi.org/10.17516/1998-2836-0206>

13. Skiba EA, Gladysheva EK, Golubev DS, Budaeva VV, Aleshina LA, Sakovich GV. Self-standardization of quality of bacterial cellulose produced by *Medusomyces gisevii* in nutrient media derived from *Miscanthus* biomass. *Carbohydrate Polymers*. 2021;252:117178. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117178>

14. Gismatulina YA, Budaeva VV, Sakovich GV. Nitrocellulose Synthesis from *Miscanthus* Cellulose. *Propellants Explosives Pyrotechnics*. 2018;43(1):96–100. <https://doi.org/10.1002/prep.201700210>

15. Popov A.I. *Humic substances: properties, structure, formation*. St. Petersburg: Izdatel'stvo Sankt-Peterburgskogo universiteta; 2004. 248 p. (In Russian)

16. Dukhanina IYa, Vereshchagin AL, Egorova EYu, Stepanova NV. Vliyanie sostava ekstraktov torfa i biogumusa na ikh fiziologicheskuyu aktivnost'. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya = Chemistry of plant raw material*. 1998;4:47–51. (In Russian)

17. Sukhanova IM, Aliev ShA, Gazizov RR, Il'yasov MM, Rakhmanova GF, Sidorov VV. Influence of seed treatment with organomineral suspensions and their nano-analogs on the morphometric parameters of seedlings. *Effektivnoe rastenievodstvo*. 2017;8:70–72. (In Russian)

18. Belopukhov SL, Grishina EA. Chemical composition and growth stimulant effect of extracts from humified linen fires. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2012;1:97–103. (In Russian)

19. Prusakova LD, Kefeli VI, Belopuhov SL, Vakulenko VV, Kuznetsova SA. The role of phenolic compounds in plants. *Agrokhimiya*. 2008;7:86–96. (In Russian)

20. Pavlova AA, Vereshchagin AL, Chaschilov DV. The influence of the preparations from the field bindweed (*Convolvulus arvensis* L.) parts and of its collection periods on the morphometric parameters of germinating pea seeds (*Pisum sativum* L.). *Vestnik altaiskoy nauki*. 2014;4:162–165. (In Russian)

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

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

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Ekaterina A. Skiba,
Cand. Sci. (Engineering),
Associate Professor, Senior Scientist,
Institute for Problems of Chemical
and Energetic Technologies SB RAS,
1, Socialisticheskaya St., Biysk, 659322,
Russian Federation,
✉ e-mail: 08988@mail.ru

Скиба Мария Алексеевна,
Краевое государственное бюджетное
общеобразовательное учреждение
«Бийский лицей-интернат Алтайского края»,
659302, г. Бийск, ул. Михаила Кутузова, 9/3,
Российская Федерация

Пятунина Ольга Ивановна,
к.б.н., доцент, учитель биологии,
Краевое государственное бюджетное
общеобразовательное учреждение
«Бийский лицей-интернат Алтайского края»,
659302, г. Бийск, ул. Михаила Кутузова, 9/3,
Российская Федерация

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 21.05.2021.
Одобрена после рецензирования 16.08.2021.
Принята к публикации 30.08.2021.*

Maria A. Skiba,
Biysk Lyceum School of Altai Region,
9/3, Mikhail Kutuzov St., Biysk, 659302,
Russian Federation

Olga I. Pyatunina,
Cand. Sci. (Biology.), Associate Professor,
Teacher,
Biysk Lyceum School of Altai Region,
9/3, Mikhail Kutuzov St., Biysk, 659302,
Russian Federation

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 21.05.2021.
Approved after reviewing 16.08.2021.
Accepted for publication 30.08.2021.*

Оригинальная статья / Original article

УДК 631.811

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-421-429>



Получение наноразмерного кремнегуминового препарата и его первичная апробация

© Ю.Д. Смирнова, Г.Ю. Рабинович, Н.В. Фомичева

ФИЦ «Почвенный институт им. В.В. Докучаева», г. Москва, Российская Федерация

Резюме: В последние десятилетия отмечается развитие и внедрение нанотехнологий, в том числе и в различных областях сельского хозяйства. Идет активный поиск способов получения препаратов для растениеводства с наночастицами, которые быстрее включаются в метаболические процессы растений. Целью данной работы являлось получение наноразмерного кремнегуминового препарата и его апробация на растениях картофеля. В качестве источника гуминовых веществ был использован жидкий гуминовый препарат БоГум (разработка Всероссийского научно-исследовательского института мелиорированных земель), источника кремния – метасиликат натрия. Для достижения наноразмерности образцов применяли метод ультразвукового диспергирования. Получение осуществляли путем введения источника кремния в количестве 0,1% (по SiO₂) в БоГум, после чего применяли ультразвуковое воздействие в течение 5, 10, 15 и 20 мин. Анализ полученных образцов на анализаторе размера частиц 90 Plus/MAS показал, что с увеличением времени диспергирования эффективный диаметр частиц изменялся незначительно. В то же время отмечено перераспределение частиц: при воздействии на образцы в течение 20 мин увеличилось количество частиц меньшего размера. После 5 мин обработки диапазон распределения частиц составил 115±13–830±23 нм, после 20 мин воздействия диаметр частиц приходился на две области – 81±8–120±10 и 280±4–470±18 нм. Применение ультразвука способствовало сохранению стабильного агрегатного состояния полученного препарата, большей микробиологической активности и большего содержания гуминовых кислот по сравнению с кремнегуминовым препаратом, полученным без применения ультразвука. Апробацию нового наноразмерного кремнегуминового препарата проводили на растениях картофеля. Обработка клубней перед посадкой с последующим некорневым опрыскиванием вегетирующих растений способствовала повышению урожайности картофеля на 18,7%. Отмечали изменения в содержании монокремниевых и поликремниевых кислот в почве, а также накопление кремния в ботве картофеля при применении кремнегуминовых препаратов в среднем на 0,96% абс.

Ключевые слова: гуминовые кислоты, кремний, картофель, ультразвук, наноразмерность частиц, урожайность

Для цитирования: Смирнова Ю.Д., Рабинович Г.Ю., Фомичева Н.В. Получение наноразмерного кремнегуминового препарата и его первичная апробация. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2021. Т. 11. N 3. С. 421–429. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-421-429>

Obtaining a nanosized silica-humic preparation and its initial approbation

Yulia D. Smirnova, Galina Yu. Rabinovich, Natalia V. Fomicheva

FRC V.V. Dokuchaev Soil Science Institute, Moscow, Russian Federation

Abstract: The recent decades have witnessed a significant development and implementation of nanotechnology, including in various branches of agriculture. There is an active search for ways to obtain preparations for plant growing with nanoparticles that can be more rapidly involved in the metabolic processes of plants. This article aims to obtain a nanosized silica-humic preparation and its approbation on potato plants. As a source of humic substances, a liquid humic preparation BoGum (developed by the All-Russian Research Institute of Reclaimed Lands) was used, as a source of silicon – sodium metasilicate. Ultrasonic dispersion method was used for achieving the nanoscale of the samples. A silicon source was introduced in an amount of 0.1% (of SiO₂) into BoGum, followed by the application of ultrasonic action for 5, 10, 15 and 20 minutes. The analysis of the obtained samples using a 90 Plus/MAS particle size analyzer has shown that with increasing dispersion time, the effective particle diameter changed insignificantly. At the same time, a redistribution of particles was noted: when the samples were exposed for 20 minutes, the number of smaller particles increased. After 5 minutes of treatment, the range of particle distribution was 115±13–830±23 nm, after 20 minutes of exposure, the particle diameter fell into two regions: 81±8–120±10 and 280±4–470±18 nm.

Ultrasonic action contributed to the retention of the stable state of aggregation of the obtained preparation, larger microbiological activity and larger content of humic acid in comparison with the silica-humic preparation, obtained without the application of an ultrasound. The new nanosized silica-humic preparation has been tested on potato plants. Treatment of tubers before planting, followed by foliar spraying of vegetative plants, has contributed to an increase in potato yield by 18.7%. Changes were noted in the content of mono- and polysilicic acids in the soil, as well as the accumulation of silicon in the tops of potatoes when using silica-humic preparations by 0.96% of absolute dry mass on average.

Keywords: humic acids, silicon, potatoes, ultrasound, nanosize of particles, yield

For citation: Smirnova YuD, Rabinovich GYu, Fomicheva NV. Obtaining a nanosized silica-humic preparation and its initial approbation. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(3):421–429. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-421-429>

ВВЕДЕНИЕ

Внедрение нанотехнологий наблюдается во всех сферах, не исключение и агропромышленный комплекс [1]. Одно из направлений наноиндустрии в сельском хозяйстве – это разработка препаратов для растениеводства, содержащих наночастицы различных металлов, гуминовых веществ, кремния и др. [2–5]. Наноразмерность частиц достигается применением химических, биологических и физических методов [6].

Одним из эффективных методов получения ультрадисперсных наноразмерных частиц является ультразвук различной мощности. Например, ультразвуковое диспергирование верхового торфа в течение 30 мин на генераторе УЗГК-5-22-МС с выходной мощностью 5 кВт и магнито-стрикционным преобразователем ПМС-5-18 позволило получить монодисперсный препарат с наночастицами размером от 80 до 100 нм [7]. В других исследованиях показано, что ультразвуковая кавитационная обработка торфа в водной среде при высоком статическом давлении за счет тщательного выбора параметров позволяет добиться измельчения торфяных частиц до величин порядка 40–60 нм. Дальнейшее введение 3%-го торфогеля в почву эффективно повышало количество проросших семян и биометрические показатели проростков сельскохозяйственных культур (озимая пшеница, ячмень, овес, кукуруза) по сравнению с контролем [8]. Разрушенный до наноразмеров торф проявляет антиоксидантные свойства, что тормозит развитие окислительного стресса у культурных растений и в свою очередь оказывает благоприятное воздействие на их рост [9]. Применение ультразвука направлено на получение препаратов с высоким уровнем гуминовых и фульвокислот, повышенной физиологической активностью, которые эффективнее усваиваются мембранами клеточной структуры растений [10].

Также оказались перспективными и хорошо зарекомендовали себя в растениеводстве кремнийсодержащие нанопрепараты [11], получение которых осуществляется химическим синтезом и физическими методами, в частности, при воздействии ультразвуком [12–14]. Например, при

использовании ультразвукового диспергатора УЗДН (f – 35 кГц; N – 300 Вт; t – 30 мин)) получены наночастицы SiO_2 . Применение наночастиц, содержащих 0,03–0,21 г/кг кремния (Si), для обработки клубней картофеля способствовало достоверному увеличению содержания хлорофилла a в ростках – на 9,0–48,8%, каротиноидов – на 29,7% и обеспечивало накопление кремния в стеблях и листьях на 7,7–30,1 и 5,0–39,1% соответственно [15]. Установлено, что кремнийсодержащие нанопрепараты способны иммобилизовать питательные вещества в почве, быть носителями молекул и биологически активных веществ в растениях, усиливать метаболическую активность растений [11, 16, 17]. Использование раствора нанокремния для долговременного замачивания семян ряда сельскохозяйственных культур способствовало увеличению биометрических показателей их проростков [18]. Обработка семян перед посевом кремнийсодержащим препаратом с частицами размером до 100 нм позволила повысить урожайность зерна на 18% [19].

Наноразмерные препараты, применяемые в растениеводстве чаще всего в качестве основного действующего вещества, имеют один компонент. Разработка способов получения образцов комплексного состава с синергетическим эффектом представляет перспективное направление. Новые препараты способны быстрее включаться в биохимические процессы растений, что выражается в сокращении сроков прорастания семян, развитии более мощной корневой системы, эффективном метаболизме поступающих питательных элементов, тем самым увеличивая продукционные возможности сельскохозяйственных культур.

Целью данной работы являлось получение наноразмерного кремнегуминового препарата и его апробация на растениях картофеля.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве источника гуминовых веществ использовали жидкий гуминовый препарат БоГум, разработанный во Всероссийском научно-исследовательском институте мелиорированных земель (ВНИИМЗ). Получение препарата осу-

ществляется путем щелочной экстракции на ферментационно-экстракционной линии, где исходным сырьем является торфоновозная смесь [20]. Источник кремния – водорастворимая соль кремния (метасиликат натрия ($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)) с содержанием 28% оксида кремния (SiO_2). Для достижения наноразмерности частиц применяли метод ультразвукового (УЗ) диспергирования, используя ультразвуковой гомогенизатор Sonopulse HD 3200 (Bandelin electronic, Германия) с системой управления Amplichron®. Гомогенизатор оборудован высокочастотным генератором GM 3200, ультразвуковым преобразователем UW 3200, бустером SH 213 G с титановым зондом ТТ диаметром 13 мм. В данной комплектации гомогенизатор позволяет проводить ультразвуковую обработку растворов, дисперсий и т.д. объемом от 20 до 900 мл с максимально разрешенной амплитудой 100% (амплитуда – 165 мкм). ВЧ-мощность – 200 Вт, рабочая частота – 20 кГц.

Получение наноразмерного кремнегуминового препарата осуществляли путем введения сухого метасиликата натрия в количестве 0,1% (по SiO_2) в гуминовый препарат БоГум непосредственно перед УЗ воздействием. Ультразвуковое воздействие осуществляли в течение 5, 10, 15 и 20 мин (соответственно кремнегуминовый образец 1, 2, 3 и 4). Температура смеси поддерживалась не выше 60 °С с помощью проточного охладителя. Проводили две серии обработок. Во всех полученных образцах определяли размер частиц методом фотон-корреляционной спектроскопии квазиупругого светорассеяния на анализаторе размера частиц 90 Plus/MAS с лавинным детектором (Brookhaven Instruments, США).

По размеру частиц исследуемых кремнегуминовых образцов был выбран препарат с наименьшими значениями диаметра частиц, обозначенный НаноБоГум-С, который анализировали на ряд агрохимических и микробиологических показателей в трехкратной аналитической повторности:

– pH_{KCl} – по ГОСТ 27979-88;
– содержание гуминовых кислот, Гк – по ГОСТ 9517-94;

– численность аммонифицирующих, амилотических микроорганизмов, энтеробактерий – методом предельных разведений на твердых питательных средах: мясо-пептонный агар, крахмало-амиачный агар, среда Козера соответственно.

Также для сравнения проводились анализы БоГум и БоГум-С. БоГум-С – образец, полученный при введении сухого метасиликата натрия в БоГум с последующим перемешиванием до полного его растворения без применения УЗ диспергирования.

Статистическую обработку полученных данных проводили, используя элементы вариационной статистики: среднеарифметические значения и стандартные отклонения конкретных показателей (объем выборки $n = 3$).

Апробация выбранного кремнегуминового образца проводилась в мелкоделяночном опыте по выращиванию картофеля сорта Скарб. Характеристика почвы: дерново-подзолистая легкосуглинистая; $\text{pH}_{\text{KCl}} = 5,0\text{--}5,1$; содержание гумуса (по Тюрину) – 2,2–2,4%, подвижного фосфора (P_2O_5) – 208–240 мг/кг, подвижного калия (K_2O) (по Кирсанову) – 164–185 мг/кг. Опыт проводили по естественному фону (без внесения удобрений). В качестве препаратов сравнения в опыт включены варианты с использованием БоГум и БоГум-С, которые применяли для обработки клубней и вегетирующих растений картофеля. Обработка клубней осуществлялась за 2 ч до посадки из ручного опрыскивателя в следующих разбавлениях: БоГум и БоГум-С – 1 : 100; НаноБоГум-С – 1 : 50; 1 : 100; 1 : 200. Некорневая обработка вегетирующих растений проводилась по фазам всходов и бутонизации в единой норме расходов – 1 л/га (разведение 1 : 300). Повторность опыта четырехкратная, расположение делянок систематическое. Учет урожая проводили сплошным методом, результаты обрабатывали методом дисперсионного анализа с вычислением наименьшей существенной разницей (НСР) при 5%-м уровне значимости.

В фазу цветения картофеля анализировали почвенные и растительные образцы на содержание кремния¹ в четырехкратной аналитической повторности. Выделение монокремниевых кислот проводили из почвы естественной влажности водой, поликремниевых – из воздушно-сухой почвы 0,1 н соляной кислотой, затем окрашивали растворимые силикаты в молибденовую синь и колориметрировали на спектрофотометре SPEKOL при длине волны 740 нм согласно модифицированного метода Маллена и Райли [21]. Содержание кремния в ботве растений картофеля определяли спектрофотометрическим методом по Барсуковой: проводили мокрое озоление сухого растительного материала смесью концентрированных азотной и серной кислот с последующим выделением кремниевых кислот щелочным гидролизом, окрашиванием их в молибденовую синь и колориметрированием на спектрофотометре SPEKOL при длине волны 640 нм.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью пакета программ Microsoft Excel и STATGRAPHICS Centurion XVI.II.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Применение ультразвукового диспергирования способствовало снижению эффективного

¹Титова В.И., Дабахова Е.В., Дабахов М.В. Агро- и биохимические методы исследования состояния экосистем: учеб. пособие для вузов. Н. Новгород: Изд-во ВВАГС, 2011. 170 с.

диаметра частиц в исследуемых кремнегуминовых образцах по сравнению с гуминовым препаратом БоГум, о чем свидетельствовали данные, полученные на анализаторе размера частиц. На рис. 1 представлен график, отражающий затраты энергии на прохождение физико-химического взаимодействия. Эффективный диаметр частиц в препарате БоГум составлял 374 ± 16 нм, после 5 мин воздействия УЗ их диаметр резко снизился до 255 ± 8 нм. Однако дальнейшая обработка на размере эффективного диаметра образцов отразилась мало, при этом разница в размере эффективного диаметра частиц образцов, полученных после обработки в течение 15 и 20 мин, оказалась минимальной. Но в то же время отмечено перераспределение частиц: при воздействии на образцы в течение 20 мин увеличивалось количество частиц меньшего размера (рис. 2, представлены результаты одной из двух серий измерений).

Распределение частиц в исследуемых образцах в основном приходилось на два диапазона. В БоГум средний размер частиц равнялся 542 ± 14 нм, минимальный – 119 ± 7 нм (рис. 2, а). Применение УЗ диспергирования способствовало снижению размеров частиц, при этом преимущественно происходило разрушение более крупных частиц. Средний размер частиц в кремнегуминовом образце 1 (после 5-минутного воздействия УЗ) равнялся 311 ± 17 нм, но минимальный размер снизился незначительно и диапазон распределения

частиц составил 115 ± 13 – 830 ± 23 нм (рис. 2, б). Дальнейшее увеличение времени воздействия приводило к снижению минимального диаметра: после 10 мин – 109 ± 18 нм; 15 мин – 100 ± 9 нм; 20 мин – 81 ± 8 нм (рис. 2, с). Таким образом, обработка УЗ в течение 20 мин способствовала значительному снижению ширины распределения размера частиц в образце 4 кремнегуминового препарата, и диаметр частиц приходился на две области – 81 ± 8 – 120 ± 10 нм и 280 ± 4 – 470 ± 18 нм (рис. 2, с).

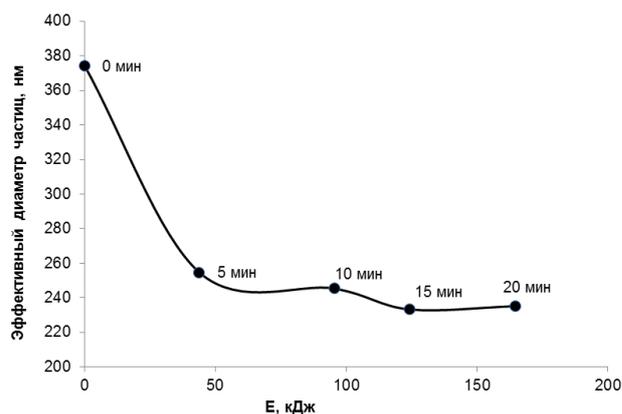


Рис. 1. Размер эффективного диаметра частиц в образцах кремнегуминового препарата

Fig. 1. Effective diameter of the particles in the samples of the silicon humic preparation

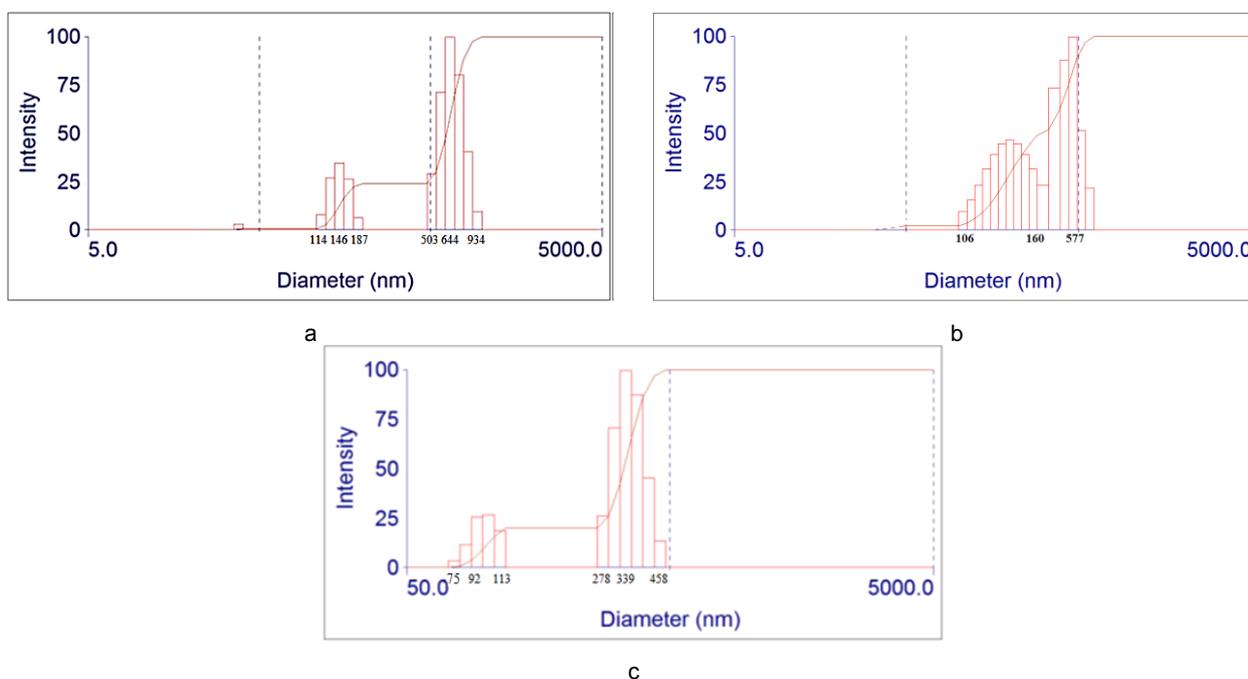


Рис. 2. Ширина распределения частиц по размерам (представлены результаты одного из определений):
 а – БоГум; б – кремнегуминовый образец 1 (время УЗ воздействия – 5 мин);
 с – кремнегуминовый образец 4 (время УЗ воздействия – 20 мин)

Fig. 2. Width of the particle size distribution (the results of one measurement are presented):
 а – BoHum; б – silicon humic sample 1 (ultrasonic exposure time 5 min);
 с – silicon humic sample 4 (ultrasonic exposure time 20 min)

Предполагается, что при обработке ультразвуком произошло расщепление гуминовых веществ на более короткие цепочки, в которые встроились ионы кремния с образованием устойчивых связей. Образование устойчивых кремнегуминовых соединений обсуждается в научных публикациях [22–25].

Образец 4, полученный при смешивании БоГум и метасиликата натрия в УЗ гомогенизаторе в течение 20 мин, обозначили НаноБоГум-С и совместно с БоГум и БоГум-С проанализировали на ряд показателей. Препараты в процессе хранения различались по внешнему виду: БоГум – темно-коричневая жидкость, практически прозрачная на протяжении всего периода наблюдения, в БоГум-С спустя 2 недели после его получения появились взвесь и хлопьевидный осадок, в НаноБоГум-С коагуляция частиц проявилась через 3 месяца после обработки ультразвуком. Уровень кислотности в образцах с метасиликатом натрия сместился в сторону щелочной реакции среды, что связано с распадом метасиликата натрия на оксид кремния и щелочь при растворении (табл. 1). Однако данное обстоятельство не окажет негативного влияния на почву и растения, поскольку препараты перед использованием разбавляются водой и значения pH рабочих растворов нейтральны.

Полагаясь, что содержание гуминовых кислот во всех исследуемых препаратах должно быть одинаковым, поскольку не происходило химического или физического воздействия на источник гуминовых кислот (торф), а исследования проводились с готовым гуминовым препаратом. Однако анализ БоГум-С показал, что содержание Гк в нем было ниже, чем в БоГум. Повидимому, часть гуминовых кислот связалась с ионами кремния и выпала в хлопьевидный осадок, который отфильтровывался перед началом определения. Содержание гуминовых кислот в

НаноБоГум-С, наоборот, увеличилось, здесь отмечали обратный эффект: после воздействия УЗ образовались кремнегуминовые соединения малых размеров, которые не отфильтровались, а перешли в раствор при определении Гк, при этом увеличение содержания гуминовых кислот обеспечили связанные с ними ионы кремния. Поэтому, несмотря на то что по результатам анализа количество гуминовых кислот в НаноБоГум-С составило $8,24 \pm 0,11$ г/л, в наноразмерном кремнегуминовом препарате содержание Гк следует считать равным $7,85 \pm 0,13$ г/л, как в БоГум.

Количество всех микроорганизмов, как и предполагалось, уменьшилось в препарате БоГум-С вследствие увеличения уровня pH. Титр микроорганизмов в наноразмерном кремнегуминовом образце также понизился относительно БоГум, но в меньшей степени. Большее содержание микрофлоры в НаноБоГум-С по сравнению с БоГум-С связано, возможно, с тем, что при воздействии УЗ образовались доступные наноразмерные фрагменты гуминовых веществ, послужившие дополнительным источником для их питания.

Апробирование кремнегуминовых препаратов на посадках картофеля показало, что максимальная прибавка урожайности отмечена в варианте с обработкой семян (ОС) НаноБоГум-С в разбавлении 1 : 50 + некорневая обработка (НО) – урожайность товарных корнеплодов увеличилась на 17,6%, общая – на 18,7% относительно контроля (табл. 2).

Анализ почвы перед закладкой опыта на наличие кремния показал высокодефицитное содержание монокремниевых кислот и среднедефицитное – поликремниевых [21], составив 7,6 и 113,0 мг/кг соответственно, поэтому применение полученных кремнегуминовых препаратов было актуальным.

Таблица 1. Характеристика препаратов

Table 1. Characteristics of preparation

Препарат	pH	Гк, г/л	Аммониф. м-о, КОЕ/мл	Амилолит. м-о, КОЕ/мл	Энтеробакт., КОЕ/мл
БоГум	$7,9 \pm 0,1$	$7,85 \pm 0,13$	$1,27 \pm 0,17 \cdot 10^8$	$2,9 \pm 0,2 \cdot 10^{13}$	$1,7 \pm 0,1 \cdot 10^7$
БоГум-С	$10,1 \pm 0,1$	$7,30 \pm 0,11$	$0,13 \pm 0,01 \cdot 10^6$	$2,6 \pm 0,1 \cdot 10^{10}$	690 ± 23
НаноБоГум-С	$10,0 \pm 0,1$	$8,24 \pm 0,11$	$0,25 \pm 0,02 \cdot 10^6$	$1,5 \pm 0,1 \cdot 10^{11}$	$4,5 \pm 0,3 \cdot 10^3$

Примечание. Указаны среднееарифметические значения показателей со стандартным отклонением, $n = 3$.

Таблица 2. Урожайность картофеля сорта Скарб

Table 2. Potato yield of the Skarb variety

Вариант опыта	Урожайность, г/куста			
	товарная	± к контр., %	общая	± к контр., %
Без обработки	352	–	428	–
БоГум (ОС 1:100 + НО)	370	5,1	465	8,6
БоГум-С (ОС 1:100 + НО)	389	10,5	494	15,4
НаноБоГум-С (ОС 1:200 + НО)	368	4,5	459	7,2
НаноБоГум-С (ОС 1:100 + НО)	364	3,4	469	9,6
НаноБоГум-С (ОС 1:50 + НО)	414	17,6	508	18,7
НСР ₀₅	29	–	37	–

К фазе цветения в основном отмечали уменьшение в почве поликремниевых кислот и рост монокремниевых. Частичное растворение поликремниевых кислот с образованием монокремниевых обусловлено постоянно протекающими биохимическими и микробиологическими процессами, проходящими под воздействием применяемых препаратов.

Повышение монокремниевых кислот в почве отмечается также в исследованиях А.Х. Куликовой с соавторами [26]. Содержание кремния в дерново-подзолистой почве под посевом озимой пшеницы по отношению к контролю было в 1,6–2,3 раза выше при применении для предпосевной обработки семян и опрыскивания посевов различными препаратами кремния (Крезацин, Мивал-Агро, Силиплант, Энергия-М) [26]. Прирост в содержании монокремниевых кислот на 10–20% показано и при использовании кремнийсодержащего нанопрепарата с частицами размером до 100 нм для обработки семян и вегетирующих растений [19].

Не во всех вариантах наблюдалось накопление монокремниевых кислот по сравнению с его исходным содержанием. В почве контрольного

варианта опыта его количество снизилось в 1,8 раза, при этом здесь отмечалось наибольшее содержание поликремниевых кислот (табл. 3). Это можно связать с низкой биологической активностью почвы и, следовательно, с медленным переходом поликремниевых кислот в монокремниевые, поэтому на формирование урожая картофеля в контрольном варианте расходовались в основном монокремниевые кислоты.

Также низкое содержание монокремниевых кислот отмечали в варианте с обработкой семян раствором НаноБоГум-С в концентрации 1 : 50. Но здесь наблюдали и максимальное снижение поликремниевых кислот, что связано с высоким приростом урожайности данного варианта и, следовательно, с большим выносом соединений кремния из почвы. Данная взаимосвязь подтверждается отрицательным значением коэффициента корреляции – $r = -0,95$ ($p \leq 0,05$; число пар переменных – 6). Вместе с тем применение кремнегуминовых препаратов способствовало увеличению содержания SiO_2 в ботве картофеля в среднем на 0,96% абс. (табл.3).

Таблица 3. Содержание кремния в почве и ботве растений картофеля в фазу цветения

Table 3. Silicon content in the soil and potato plants tops in the flowering period

Вариант опыта	Содержание в почве, мг/кг		Содержание в ботве, %
	монокремниевые кислоты	поликремниевые кислоты	
Без обработки	4,2±0,2	66,7±0,7	1,87±0,06
БоГум (ОС 1:100 + НО)	9,7±0,4	63,6±1,2	1,83±0,04
БоГум-С (ОС 1:100 + НО)	11,8±0,3	54,8±0,8	2,79±0,06
НаноБоГум-С (ОС 1:200 + НО)	11,5±0,4	59,3±1,4	2,86±0,03
НаноБоГум-С (ОС 1:100 + НО)	10,0±0,4	63,0±1,0	2,75±0,05
НаноБоГум-С (ОС 1:50 + НО)	5,7±0,3	51,4±0,7	2,94±0,05

Примечание. Указаны среднеарифметические значения показателей со стандартным отклонением, $n = 4$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение метода ультразвукового диспергирования позволило получить кремнегуминовый препарат с наноразмерными частицами, минимальный размер которых составил 81 ± 8 нм. Полученный препарат характеризуется стабильным агрегатным состоянием, в его состав входят два действующих вещества – гуминовые кислоты (~7,85 г/л) и SiO_2 (0,1%), известных своим стимулирующим влиянием на произрастание сельскохозяйственных культур.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жемчужин С.Г., Спиридонов Ю.Я., Клейменова И.Ю., Босак Г.С. Нанотехнологии и пестициды (дайджест публикаций за 2011–2017 гг.) // Агрохимия. 2019. N 5. С. 89–96.
2. Nanotechnology for Agriculture: Crop Production & Protection. Eds.: Panpatte D.G., Jhala Y.K. Singapore: Springer, 2019. 337 p. <https://doi.org/10.1007/978-981-32-9374-8>
3. Кадырова А.И., Колесникова В.Г. Применение микроудобрений в наноформе в технологии возделывания овса // Вестник Ижевской государственной сельскохозяйственной академии. 2016.

Обработка клубней картофеля перед посадкой наноразмерным кремнегуминовым препаратом в разбавлении 1 : 50 и последующая некорневая обработка вегетирующих растений в дозе 1 л/га способствовали прибавке урожайности картофеля на 18,7%. Выявлены изменения в перераспределении подвижных форм кремния в почве (переход поликремниевых кислот в монокремниевые), послужившие дополнительным источником питания для растений картофеля.

- N 4 (49). С. 3–12.
4. Yazdpoor H., Noormohamadi G., Madani H., Heidari H., Abad Sh., Mobasser H.R., et al. Role of nano-silicon and other silicon resources on straw and grain protein, phosphorus and silicon contents in Iranian rice cultivar (*Oryza sativa* cv. Tarom) // International Journal of Biosciences. 2014. Vol. 5. Issue 12. P. 449–456. <https://doi.org/10.12692/ijb/5.12.449-456>
5. Панова Г.Г., Семенов К.Н., Шилова О.А., Корнюхин Д.Л., Шпанев А.М., Аникина Л.М. [и др.]. Влияние углеродных и кремнезольных наноматериалов на устойчивость ярового ячменя к заболе-

ванию корневыми гнилями // *Агрофизика*. 2018. N 3. С. 48–58. <https://doi.org/10.25695/AGRPH.2018.03.09>

6. Lakzian A., Bayat M., Gadzhikurbanov A., Zargar M. The role of nanotechnology for improving crop production // *RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries*. 2019. Vol. 14. Issue 4. P. 297–305. <https://doi.org/10.22363/2312-797X-2019-14-4-297-305>

7. Силкин С.В., Куликов Е.Е., Попов И.А. Исследование управляемого ультразвукового диспергирования торфа и бурого угля в воде // *Труды Московского физико-технического института*. 2018. Т. 10. N 3 (39). С. 86–95.

8. Алферова Е.Ю., Проценко Е.П., Косолапова Н.И. Определение влияния органического удобрения (диспергированного торфа) на биометрические показатели растений [Электронный ресурс] // *Auditorium*. 2016. N 4 (12). С. 14–19. URL: <https://auditorium.kursksu.ru/#index> (16.07.2020).

9. Косолапова Н.И., Проценко Е.П., Проценко А.А., Неведров Н.П., Алферова Е.Ю., Мирошниченко О.В. Некоторые протекторные свойства инновационного экологически безопасного агропрепарата «Cavita bioscomplex» // *Проблемы региональной экологии*. 2016. N 3. С. 24–30.

10. Денисюк Е.А., Митрофанов Р.А., Кузнецова И.А. Технологии получения гуминовых веществ // *Вестник НГИЭИ*. 2014. N 2 (33). С. 66–80.

11. Rastogi A., Tripathi D.K., Yadav S., Chauhan D.K., Živčák M., Ghorbanpour M., et al. Application of silicon nanoparticles in agriculture // *3 Biotech*. 2019. Vol. 9. Issue 3. Article number 90. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1626-7>

12. Хлебцов Б.Н., Ханадеев В.А., Пылаев Т.Е., Хлебцов Н.Г. Метод динамического рассеяния света в исследованиях силикатных и золотых наночастиц // *Известия Саратовского университета*. Новая серия. Серия: Физика. 2017. Т. 17. N 2. С. 71–84. <https://doi.org/10.18500/1817-3020-2017-17-2-71-84>

13. Мофа Н.Н., Жапекова А.О., Садыков Б.С., Баккара А.Е., Сахан М.Г., Бекентаева А.Д. [и др.]. Комплексное использование механохимической и ультразвуковой обработки для получения высокодисперсного диоксида кремния специального назначения // *Горение и плазмохимия*. 2019. N 17. С. 123–132.

14. Патент № 2508963, Российская Федерация. Способ диспергирования наноразмерного порошка диоксида кремния ультразвуком / Н.С. Хитерхеева, А.В. Номоев, С.П. Бардаханов, С.С. Уладаева; патентообладатель ФГБОУ ВПО «Бурятский государственный университет»; заявл. 18.05.2012; опубл. 10.03.2014.

15. Аминова Е.В., Мушинский А.А., Короткова А.М., Дергилёва Т.Т. Воздействие ультрадисперсных частиц диоксида кремния на биохимические показатели растений *Solanum tuberosum* // *Животноводство и кормопроизводство*. 2019. Т. 102. N 4. С. 33–42. <https://doi.org/10.33284/2658-3135-102-4-33>

16. Fraceto L.F., Grillo R., de Medeiros G.A., Scognamiglio V., Rea G., Bartolucci C.

Nanotechnology in agriculture: which innovation potential does it have? // *Frontiers in Environmental Science*. 2016. Vol. 4. Article number 20. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2016.00020>

17. Martin-Ortigosa S., Peterson D.J., Valenstein J.S., Lin V.S.-Y., Trewyn B.G., Lyznik L.A., et al. Mesoporous silica nanoparticle-mediated intracellular cre protein delivery for maize genome editing via loxP site excision // *Plant Physiology*. 2014. Vol. 164. Issue 2. P. 537–547. <https://doi.org/10.1104/pp.113.233650>

18. Bao-shan L., Shao-qi D., Chun-hui L., Li-jun F., Shu-chun Q., Min Y. Effect of TMS (nanosized silicon dioxide) on growth of Changbai larch seedlings // *Journal of Forest Research*. 2004. Vol. 15. Issue 2. P. 138–140. <https://doi.org/10.1007/BF02856749>

19. Забегалов Н.В., Дабахова Е.В. Влияние кремнийсодержащего нанопрепарата на урожайность и содержание кремния в зерновых культурах // *Достижения науки и техники АПК*. 2011. N 12. С. 22–24.

20. Рабинович Г.Ю., Смирнова Ю.Д., Васильева Е.А., Фомичева Н.В. Инновационная технология для решения проблем агроэкологии // *Региональная экология*. 2015. N 6 (41). С. 32–40.

21. Матыченков И.В., Хомяков Д.М., Пахненко Е.П., Бочарникова Е.А., Матыченков В.В. Подвижные кремниевые соединения в системе почва–растение и методы их определения // *Вестник Московского университета*. Серия 17: Почвоведение. 2016. N 3. С. 37–46.

22. Офицеров Е.Н., Рябов Г.К., Убасыкина Ю.А., Климовский А.Б., Фетюхина Е.Г. Кремний и гуминовые кислоты: моделирование взаимодействий в почве // *Известия Самарского научного центра РАН*. 2011. Т. 13. N 4-2. С. 550–557.

23. Патент № 2529151, Российская Федерация. Кремнегуминовый регулятор роста растений и его применение / И.В. Перминова, Н.А. Куликова, О.Н. Филиппова; патентообладатель ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; заявл. 17.12.2012; опубл. 27.09.2014.

24. Камбалина М.Г., Скворцова Л.Н., Мазурова И.С., Гусева Н.В., Бакебаев А.А. Исследование форм нахождения кремния в природных водах с высоким содержанием растворенных органических веществ // *Известия Томского политехнического университета*. Химия и химические технологии. 2014. Т. 325. N 3. С. 64–70.

25. Zhang M., Li D., Ye Z., Wang S., Xu N., Wang F., et al. Effect of humic acid on the sedimentation and transport of nanoparticles silica in water-saturated porous media // *Journal of Soils and Sediments*. 2019. Vol. 20. Issue 2. P. 911–920. <https://doi.org/10.1007/s11368-019-02444-x>

26. Куликова А.Х., Козлов А.В., Смывалов В.С. Влияние кремнийсодержащих материалов на свойства почвы, состояние посевов и урожайность зерновых культур в условиях среднего Поволжья // *Агрохимия*. 2019; N 4. С. 60–69. <https://doi.org/10.1134/S0002188119040082>

REFERENCES

1. Zhemchuzhin SG, Spiridonov YuYa, Kleimeno-va IYu, Bosak GS. Nanotechnology and pesticides (digest publications for 2011–2017). *Agrokimiya*. 2019;5:89–96. (In Russian)
2. *Nanotechnology for Agriculture: Crop Production & Protection*. Panpatte DG, Jhala YK. (eds.) Singapore: Springer; 2019. 337 p. <https://doi.org/10.1007/978-981-32-9374-8>
3. Kadyrova AI, Kolesnikova VG. Appliance of micronutrients in nanofarm in oats cultivation technology. *Vestnik Izhevskoi gosudarstvennoi sel'skokhozyaistvennoi akademii = The Bulletin of Izhevsk State Agricultural Academy*. 2016;4:3–12. (In Russian)
4. Yazdpour H, Noormohamadi G, Madani H, Heidari H, Abad Sh, Mobasser HR, et al. Role of nanosilicon and other silicon resources on straw and grain protein, phosphorus and silicon contents in Iranian rice cultivar (*Oryza sativa* cv. Tarom). *International Journal of Biosciences*. 2014;5(12):449–456. <https://doi.org/10.12692/ijb/5.12.449-456>
5. Panova GG, Semenov KN, Shilova OA, Kornuhin DL, Shpanev AM, Anikina LM, et al. Impact of carbon and silica sol nanostructures on spring barley resistance to the root rot infestation. *Agrofizika = Agrophysica*. 2018;3:48–58. (In Russian) <http://dx.doi.org/10.25695/AGRP.2018.03.09>
6. Lakzian A, Bayat M, Gadzhikurbanov A, Zargar M. The role of nanotechnology for improving crop production. *RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries*. 2019;14(4):297–305. <https://doi.org/10.22363/2312-797X-2019-14-4-297-305>
7. Silkin SV, Kulikov EE, Popov IA. Investigation of the controlled ultrasonic dispersion of peat and brown coal in water. *Trudy Moskovskogo fiziko-tekhnicheskogo instituta = Proceedings of Moscow Institute of Physics and Technology*. 2018;10(3):86–95. (In Russian)
8. Alferova EYu, Protsenko EP, Kosolapova NI. Determination of the effect of organic fertilizer (dispersed peat) on the biometric parameters of plants. *Auditorium*. 2016;4:14–19. Available from: <https://auditorium.kursku.ru/#index> [Accessed 16th July 2020]. (In Russian)
9. Kosolapova NI, Protsenko EP, Protsenko AA, Nevedrov NP, Alferova EYu, Miroshnichenko OV. Some protective features of innovative ecology-safe agricultural preparation "Cavita biocomplex". *Problemy regional'noi ekologii = Regional Environmental Issues*. 2016;3:24–30. (In Russian)
10. Denisyk EA, Mitrofanov RA, Kuznetsova IA. Technology of obtaining of humic substances. *Vestnik NGIEI = Bulletin NGIEI*. 2014;2:66–80. (In Russian)
11. Rastogi A, Tripathi DK, Yadav S, Chauhan DK, Živčák M, Ghorbanpour M, et al. Application of silicon nanoparticles in agriculture. *3 Biotech*. 2019;9(3). Article number 90. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1626-7>
12. Khlebtsov BN, Khanadeev VA, Pylaev TE, Khlebtsov NG. Dynamic light scattering method in studies of silica and gold nanoparticles. *Izvestiya Saratovskogo universiteta. Novaya seriya. Seriya: Fizika = Izvestiya of Saratov University. Physics*. 2017;17(2):71–84. (In Russian) <https://doi.org/10.18500/1817-3020-2017-17-2-71-84>
13. Mofa NN, Zhapekova AO, Sadykov BS, Bakara AYe, Sakhan MG, Bekentaeva AD, et al. Complex use of mechanochemical and ultrasonic processing to obtain highly dispersed silicon dioxide for special purposes. *Gorenje i plazmokhimiya*. 2019;17:123–132. (In Russian)
14. Khiterkheeva NS, Nomoev AV, Bardakhanov SP, Uladaeva SS. *Method of dispersion of nanosized silicon dioxide powder by ultrasound*. Patent RF, no. 2508963; 2012. (In Russian)
15. Aminova EV, Mushinsky AA, Korotkova AM, Dergileva TT. Exposure of ultrafine silica particles on biochemical indicators of plants *Solanum tuberosum*. *Zhivotnovodstvo i kormoproizvodstvo = Animal Husbandry and Fodder Production*. 2019;102(4):33–42. (In Russian) <https://doi.org/10.33284/2658-3135-102-4-33>
16. Fraceto LF, Grillo R, de Medeiros GA, Scognamiglio V, Rea G, Bartolucci C. Nanotechnology in agriculture: which innovation potential does it have? *Frontiers in Environmental Science*. 2016;4. Article number 20. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2016.00020>
17. Martin-Ortigosa S, Peterson DJ, Valenstein JS, Lin VS-Y, Trewyn BG, Lyznik LA, et al. Mesoporous silica nanoparticle-mediated intracellular cre protein delivery for maize genome editing via loxP site excision. *Plant Physiology*. 2014;164(2):537–547. <https://doi.org/10.1104/pp.113.233650>
18. Bao-shan L, Shao-qi D, Chun-hui L, Li-jun F, Shu-chun Q, Min Y. Effect of TMS (nanostructured silicon dioxide) on growth of Changbai larch seedlings. *Journal of Forest Research*. 2004;15(2):138–140. <https://doi.org/10.1007/BF02856749>
19. Zabegalov NV, Dabakhova EV. Studying of influence of a siliceous nanocomposite preparation on productivity and silicon content in crops. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK = Achievements of Science and Technology in Agro-Industrial Complex*. 2011;12:22–24. (In Russian)
20. Rabinovich GYu, Smirnova YuD, Vasilieva EA, Fomicheva NV. An innovative technology to solve the problems of agroecology. *Regional'naya ekologiya = Regional ecology*. 2015;6:32–40. (In Russian)
21. Matychenkov IV, Khomiakov DM, Pakhnenko EP, Bocharnikova EA, Matychenkov VV. The mobile Si-rich compounds in the soil-plant system and methods for their determination. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 17: Pochvovedenie = Bulletin of the Moscow University. Series 17. Soil Science*. 2016;3:37–46. (In Russian)
22. Ofitserov EN, Rjabov GK, Ubaskina JA, Klimovsky AB, Fetjulina EG. Silicon and humic acids: modelling of interactions in soil. *Izvestiya Samarskogo NTs RAN = Izvestia of Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*. 2011;13(4):550–557. (In Russian)
23. Perminova IV, Kulikova NA, Filippova ON. *Silicon humic plant growth regulator and its application*. Patent RF, no. 2529151; 2012. (In Russian)
24. Kambalina MG, Skvortsova LN, Mazurova IS, Guseva NV, Bakibaev AA. Research of the sili-

con aqueous forms in organic-rich natural water. *Izvestiya Tomskogo politekhnicheskogo universiteta. Khimiya i khimicheskie tekhnologii = Bulletin of the Tomsk Polytechnic University. Geo Assets Engineering*. 2014;325(3):64–70. (In Russian)

25. Zhang M, Li D, Ye Z, Wang S, Xu N, Wang F, et al. Effect of humic acid on the sedimentation and transport of nanoparticles silica in water-saturated porous media. *Journal of Soils and Sediments*.

2019;20(2):911–920. <https://doi.org/10.1007/s11368-019-02444-x>

26. Kulikova AKh, Kozlov AV, Smyvalov VS. Influence of silicon-containing materials on soil properties, crop condition and yield of grain crops in the conditions of middle Volga region. *Agrokhimiya*. 2019;4:60–69. (In Russian) <https://doi.org/10.1134/S0002188119040082>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Смирнова Юлия Дмитриевна,

к.б.н., заместитель директора по науке, ВНИИМЗ – филиал ФИЦ «Почвенный институт им. В.В. Докучаева», 170530, Тверская обл., Калининский р-н, п. Эммаус, 27, Российская Федерация, ✉ e-mail: ulayad@yandex.ru

Рабинович Галина Юрьевна,

д.б.н., профессор, заведующая отделом биотехнологий, ВНИИМЗ – филиал ФИЦ «Почвенный институт им. В.В. Докучаева», 170530, Тверская обл., Калининский р-н, п. Эммаус, 27, Российская Федерация, e-mail: 2016vniimz-noo@list.ru

Фомичева Наталья Викторовна,

к.б.н., заведующая лабораторией микробиологии и экологической биотехнологии, ВНИИМЗ – филиал ФИЦ «Почвенный институт им. В.В. Докучаева», 170530, Тверская обл., Калининский р-н, п. Эммаус, 27, Российская Федерация, e-mail: nvfomi@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 24.02.2021.
Одобрена после рецензирования 30.05.2021.
Принята к публикации 30.08.2021.*

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Yulia D. Smirnova,

Cand. Sci. (Biology), Deputy Director for Science, VNIIMZ – branch of FRC V.V. Dokuchaev Soil Science Institute, 27, Emmauss Village, Kalininsky District, 170530, Tver Region, Russian Federation, ✉ e-mail: ulayad@yandex.ru

Galina Yu. Rabinovich,

Dr. Sci. (Biology), Professor, Head of the Department of Biotechnology, VNIIMZ – branch of FRC V.V. Dokuchaev Soil Science Institute, 27, Emmauss Village, Kalininsky District, 170530, Tver Region, Russian Federation, e-mail: 2016vniimz-noo@list.ru

Natalia V. Fomicheva,

Cand. Sci. (Biology), Head of the Laboratory of Microbiology and Environmental Biotechnology, VNIIMZ – branch of FRC V.V. Dokuchaev Soil Science Institute, 27, Emmauss Village, Kalininsky District, 170530, Tver Region, Russian Federation, e-mail: nvfomi@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 24.02.2021.
Approved after reviewing 30.05.2021.
Accepted for publication 30.08.2021.*

Оригинальная статья / Original article

УДК 579.26:579.22:579.64

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-430-440>



Особенности влияния штамма *Bacillus thuringiensis* 888 на содержание эфирного масла, антиоксидантов и флавоноидов в растениях *Origanum vulgare* L.

© А.В. Крыжко*, У.М. Буджурова*, Э.Д. Аметова*,
И.А. Новиков*, Е.Е. Соболева*, Н.Н. Смаглий*,
Г.В. Решетник**

*Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма,
г. Симферополь, Российская Федерация

**Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского,
г. Симферополь, Российская Федерация

Резюме: Цель работы – исследовать особенности влияния культуры штамма *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* 888 на качество вегетативной массы *Origanum vulgare* по количеству антиоксидантов и флавоноидов, выходу и компонентному составу эфирного масла. Материалом исследований служила жидкая споровая культура штамма *B. thuringiensis* 888, образцы душицы обыкновенной: образец № 2-4, содержащий в эфирном масле 52,0% карвакрола; № 2, содержащий 59,85% α -терпинеола; № 1 с преимущественным содержанием гермакрена D (21,5%) и β -кариофиллена (19,4%). Определение растворимых углеводов в растениях проводили по методу М.С. Дюбойса, флавоноидов – спектрофотометрически при 420 нм по методу Р.А. Бубенчикова. Определение общего содержания антиоксидантов осуществляли по восстановлению хлорного железа (III) до хлористого железа (II). Определение содержания эфирного масла *Origanum vulgare* проводили гидродистилляцией по А.С. Гинзбергу. Компонентный состав эфирного масла определяли методом газовой хроматографии. Установлено, что обработка споровой культурой штамма *B. thuringiensis* 888 образцов *O. vulgare* не оказывает существенного влияния на накопление в листьях терпеноидных хинонов, токохроманолов и водорастворимых антиоксидантов. Показано, что обработка душицы обыкновенной жидкой споровой культурой штамма *B. thuringiensis* 888 способствует формированию стойкой тенденции к накоплению редуцирующих сахаров в вегетативной массе растений – до 30,8% по сравнению с контролем. Обработка растений культурой штамма *B. Thuringiensis* 888 способствовала увеличению содержания эфирного масла в растениях *O. vulgare* образца № 1 в 2,4 раза по сравнению с контролем и не оказывала существенного влияния на эфиромасличность образцов № 2 и № 2-4. Наиболее устойчивым к обработке энтомопатогенными бактериями оказался образец № 2-4, в эфирном масле которого наблюдали уменьшение содержания линалоола и кариофилленоксида соответственно на 44,6 и 37,1% и линалилацетата в 4,3 раза по сравнению с контролем, а также накопление α -терпинеола на 86,1%.

Ключевые слова: *Origanum vulgare* L., *Bacillus thuringiensis*, эфирное масло, флавоноиды, антиоксиданты, штамм

Благодарности: Работа выполнена в рамках госзадания Министерства образования и науки РФ АААА16-116022610119-2.

Для цитирования: Крыжко А.В., Буджурова У.М., Аметова Э.Д., Новиков И.А., Соболева Е.Е., Смаглий Н.Н., Решетник Г.В. Особенности влияния штамма *Bacillus thuringiensis* 888 на содержание эфирного масла, антиоксидантов и флавоноидов в растениях *Origanum vulgare* L. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2021. Т. 11. N 3. С. 430–440. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-430-440>

Features of the *Bacillus thuringiensis* 888 strain's influence on the content of essential oil, antioxidants and flavonoids in *Origanum vulgare* L.

Anastasiia V. Kryzhko*, Uryane M. Budzhurova*, Elmira D. Ametova*,
Ilya A. Novikov*, Elena E. Soboleva*, Natalia N. Smagliy*,
Galina V. Reshetnik**

*Research Institute of Agriculture of Crimea, Simferopol, Russian Federation

**V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russian Federation

Abstract: This article aims to study the influence of the culture of the *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* 888 on the quality of the vegetative mass of *Origanum vulgare* in terms of the number of antioxidants and flavonoids, yield and composition of the essential oil. The research material included a liquid spore culture of the *B. thuringiensis* 888 strain, samples of oregano: sample no. g-4, containing 52.0% carvacrol in essential oil; No. 2 containing 59.85% α -terpineol; No. 1 with a predominant content of germacrene D (21.5%) and β -caryophyllene (19.4%). Soluble carbohydrates in the plants were determined using M.S. Dubois's method, flavonoids – spectrophotometrically at 420 nm following R.A. Bubenchikov's method. The total content of antioxidants was determined using the reduction of iron(III) chloride to iron(II) chloride. The essential oil content of *Origanum vulgare* was determined by using hydrodistillation following A.S. Ginsberg. Gas chromatography was used to determine component composition of the essential oil. The results show that treating the *O. vulgare* samples with the spore culture of *B. thuringiensis* 888 strain culture does not significantly affect the accumulation of terpenoid quinones, tochromanols and water-soluble antioxidants in leaves. It has been shown that treating oregano with an ordinary liquid spore culture of the *B. thuringiensis* 888 strain promotes the formation of a persistent tendency towards the accumulation of reducing sugars in the vegetative mass of plants — up to 30.8% compared to the control. Treating plants with a culture of *B. Thuringiensis* 888 strain promoted an increase in the essential oil content in *O. vulgare* plants of the sample no. 1 by 2.4 times, as compared to the control and did not significantly affect the essential oil content of the samples no. 2 and no. g-4. The sample no. g-4 was the most resistant to treatment with entomopathogenic bacteria, and the content of linalool and caryophyllene oxide in essential oils decreased by 44.6 and 37.1%, respectively, and linalyl acetate by 4.3 times compared with the control, as well as the accumulation of α -terpineol by 86.1%.

Keywords: *Origanum vulgare* L., *Bacillus thuringiensis*, essential oil, flavonoids, antioxidants, strain

Acknowledgments: The work was performed within the state assignment of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation no. AAAA16-116022610119-2.

For citation: Kryzhko AV, Budzhurova UM, Ametova ED, Novikov IA, Soboleva EE, Smaglli NN, Reshetnik GV. Features of the *Bacillus thuringiensis* 888 strain's influence on the content of essential oil, antioxidants and flavonoids in *Origanum vulgare* L. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(3):430–440. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-430-440>

ВВЕДЕНИЕ

Одной из перспективных эфиромасличных и лекарственных культур издавна считается душица обыкновенная (*Origanum vulgare* L.). Растение содержит широкий спектр физиологически активных веществ: фенольные глюкозиды, флавоноиды, дубильные вещества, стерины и терпеноиды. Последние часто экстрагируются гидродистилляцией, в результате чего образуется эфирное масло, богатое монотерпенами (карвакрол, тимол, линалилацетат) и/или сесквитерпенами ((E)- β -кариофиллен, гермакрен D, бициклогермакрен, β -кариофилленоксид) [1]. Эфирное масло *O. vulgare* L. находит применение в косметологии и дерматологии, так как обладает противовоспалительными [2], тканевыми ремодулирующими, иммуномодулирующими и противоопухолевыми свойствами благодаря входящему в его состав карвакролу [3]. В ветеринарии и животноводстве оно применяется как нематодцидное средство и пищевая добавка [4–5].

Известны ларвицидные и овицидные свойства таких компонентов эфирного масла душицы, как карвакрол и терпинен-4-ол относительно представителей родов *Anopheles* и *Culex* [6], пцимена, γ -терпинена против личинок *Helicoverpa armigera* [7]. Эфирное масло *O. vulgare* L. обла-

дает выраженными антибактериальными свойствами относительно большого числа патогенных бактерий [8, 9], антифунгальной активностью против грибов рода *Aspergillus* [10], *Botrytis cinerea* [11], *Malassezia furfur* [12]. Эфирное масло с преимущественным содержанием α -терпинеола и тимола способно подавлять рост дрожжей рода *Candida* за счет значительного снижения продукции фермента фосфолипазы, продуцируемого штаммами *Candida albicans* [13]. Традиционно трава душицы обыкновенной используется при производстве полутвердых сыров [14] и как приправа к мясу не только за счет антиоксидантной активности, но и благодаря эффективному замедлению окисления липидов [15].

Важной проблемой при возделывании душицы обыкновенной остается защита от вредителя, относящегося к группе эриофиидных клещей – *Eriophye* ssp. [16]. В качестве биоагента защиты может быть использована бактерия *Bacillus thuringiensis* как широко известный энтомопатоген, применяющийся в качестве биоагента препаратов для защиты сельскохозяйственных культур против листогрызущих насекомых и некоторых видов клещей. В настоящее время именно на основе *B. thuringiensis* выпускается около 90–95% биопестицидов на мировом рынке

[17]. *B. thuringiensis* формирует при споруляции параспоральные кристаллические включения белковой природы, обуславливающие главным образом ее инсектицидную активность в дозах, рекомендованных для биоконтроля насекомых-вредителей. В то же время она безвредна для теплокровных животных, рыб, пчел и энтомофагов и может быть использована в защите лекарственных растений [18].

Цель исследований – изучить особенности влияния культуры штамма *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* 888 на качество сырья душицы обыкновенной по выходу и компонентному составу эфирного масла, количеству антиоксидантов и флавоноидов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследования были проведены на базе лаборатории молекулярной генетики, протеомики и биоинформатики в сельском хозяйстве отдела сельскохозяйственной микробиологии ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма» (НИИСХ Крыма). Материалом исследования послужил штамм *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* 888 Крымской коллекции микроорганизмов НИИСХ Крыма, зарегистрированной в Каталоге центров коллективного пользования научным оборудованием и уникальных научных установок (<http://www.ckp-rf.ru>) под номером 507484. Жидкую споровую культуру штамма получали при культивировании бактерий на технологических качалках в питательной среде на основе соевой муки и кукурузного крахмала в колбах объемом 750 мл с 50 мл питательной среды. Для изучения влияния штамма *B. thuringiensis* 888 на накопление эфирных масел, антиоксидантов и флавоноидов в листьях и соцветиях душицы растения обрабатывали жидкой споровой культурой с титром спор $0,4 \cdot 10^9$ в фазе бутонизации. В качестве контроля использовали растения, обработанные водой. В исследованиях использовались следующие образцы *Origanum vulgare* L., различающиеся по компонентному составу эфирного масла: образец № г-4, содержащий 52,04% карвакрола; образец № 2, содержащий 59,85% α -терпинеола; образец № 1 с преимущественным содержанием гермакрена D (21,5%) и β -кариофиллена (19,4%). Все биохимические показатели в сырье определяли в фазу цветения.

Экстракцию антиоксидантов проводили в водно-этанольных экстрактах с детергентом мембранных структур тритоном X-100 в течение 24 ч. Определение общего содержания антиоксидантов осуществляли по восстановлению хлорного железа (III) до хлористого железа (II), количество которого определялось спектрофотометрически при 505 нм по интенсивности

окраски при добавлении о-фенантролина¹. Флавоноиды экстрагировали кипячением сухого сырья в 70%-м этаноле. Содержание флавоноидов определялось спектрофотометрически при 420 нм. В качестве стандарта использовался рутин [19]. Содержание эфирного масла в растениях определяли методом гидродистилляции по Гинзбергу. При отгонке по данному методу используется отдельный приемник (приемник Гинзберга), находящийся в реакционной зоне, т.е. температура приемника Гинзберга равна температуре паров воды и масла внутри колбы. Параметры анализа по определению массовой доли эфирного масла в растительном сырье душицы следующие: объем колбы – 1000 мл, навеска сырья – 100 г, объем воды – 250 мл, длительность перегонки – 45 мин, интенсивность перегонки – 45–50 капель в минуту [20]. Компонентный состав эфирного *O. Vulgare* определяли методом газовой хроматографии на приборе Кристалл 5000.2 с пламенно-ионизационным детектором. Для идентификации и полного разделения основных компонентов эфирного масла были подобраны следующие условия хроматографирования: колонка капиллярная кварцевая длиной 30 м с внутренним диаметром 0,32 мм и толщиной фазы 0,5 мкм.

Для разделения компонентов эфирного масла использовалась капиллярная кварцевая колонка с жидкой неподвижной фазой CR-WAXms. Температура термостата колонки программировалась в следующем режиме: 75 °С продолжительностью 1 мин, далее – до 210 °С со скоростью 4 °С/мин. Температура инжектора – 230 °С, детектора – 250 °С. Скорость потока газ-носителя (гелий) составила 1,9 мл/мин, деление потока – 1/20 [21]. Большинство компонентов эфирного масла было идентифицировано с помощью газовой хроматографии путем сравнения их индексов удерживания по Ковачу, либо с литературными данными, либо с помощью стандартных веществ, имеющихся в лаборатории. Индексы удерживания Ковача определялись по отношению к гомологическому ряду *n*-алканов (C₈–C₄₀) в тех же рабочих условиях [22].

Достоверность разницы между опытными и контрольными вариантами оценивали по критерию Стьюдента. В работе использовались современные методы статистических исследований с применением программ Microsoft Excel и ППП Statistica 7 [23].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

За счет окислительно-восстановительных реакций, происходящих с участием молекулярного кислорода и катализирующихся ферментами в живых организмах, происходит большинство процессов регуляции роста и развития, ответа на неблагоприятные воздействия, заживле-

¹Рогожин В.В., Рогожина Т.В. Практикум по физиологии и биохимии растений: учеб. пособие. СПб.: ГИОРД, 2013. 352 с.

ние повреждений. Некоторые окислительно-восстановительные реакции связаны со спонтанными превращениями, приводящими к окислительным повреждениям важнейших биологических молекул. Равновесие и единство антиоксидантов и прооксидантов рассматриваются как неотъемлемое условие поддержания внутренней среды живых клеток².

Антиоксидантные функции в растительном организме выполняет огромное количество веществ разной химической природы. Рассматриваемая в эксперименте группа терпеноидных хинонов и токохроманолов, включающая токоферолы, токотриенолы и жирорастворимые хиноны входит в состав клеточных биомембран. Антиоксидантная активность этих веществ обусловлена их способностью переходить в форму феноксильного радикала [24].

В эксперименте с образцами душицы обыкновенной № 1 и № г-4, обработанными споровой культурой штамма *B. thuringiensis* 888, существенного влияния на накопление терпеноидных хинонов и токохроманолов отмечено не было (табл. 1). Исключение составил образец № 2, после обработки которого на 10-е сутки наблюдали уменьшение общего количества антиоксидантов на 7,5%, а на 20-е сутки – их увеличение на 9,6%.

Поскольку токохроманолы в растительном организме способны влиять на углеводный обмен, было проведено изучение влияния жидкой культуры штамма 888 на содержание сахаров в листьях и соцветиях душицы обыкновенной. Анализируя полученные результаты, необходимо отметить, что обработка душицы обыкновенной жидкой споровой культурой штамма *B. thuringiensis* 888 способство-

вала формированию стойкой тенденции к накоплению редуцирующих сахаров в стеблях и листьях (рисунок). Так, при обработке образца № 1 количество сахаров увеличивалось на 15,8% на 10-е сутки и достигало 30,8% к 20-ым. Активнее всего углеводы аккумулировались в надземной массе образца № 2 – на 10-е сутки наблюдали увеличение их содержания на 28,9%, а на 20-е – на 37,2% по сравнению с контролем. Обработка вегетативной массы душицы обыкновенной образца № г-4 культурой штамма *B. thuringiensis* 888 существенного влияния на накопление редуцирующих сахаров не оказывала.

Таким образом, обнаруженное увеличение содержания редуцирующих сахаров в листьях образца № 2 в течение всего периода наблюдений может быть связано с участием в метаболизме токохроманолов. Известно, что токохроманолы снижают синтез жасмоновой кислоты у растений и тем самым изменяют их гормональный баланс. Гормоны в свою очередь влияют на синтез ферментов, контролирующих токоферолообразование, и имеют АБК-респонсивный эффект [25].

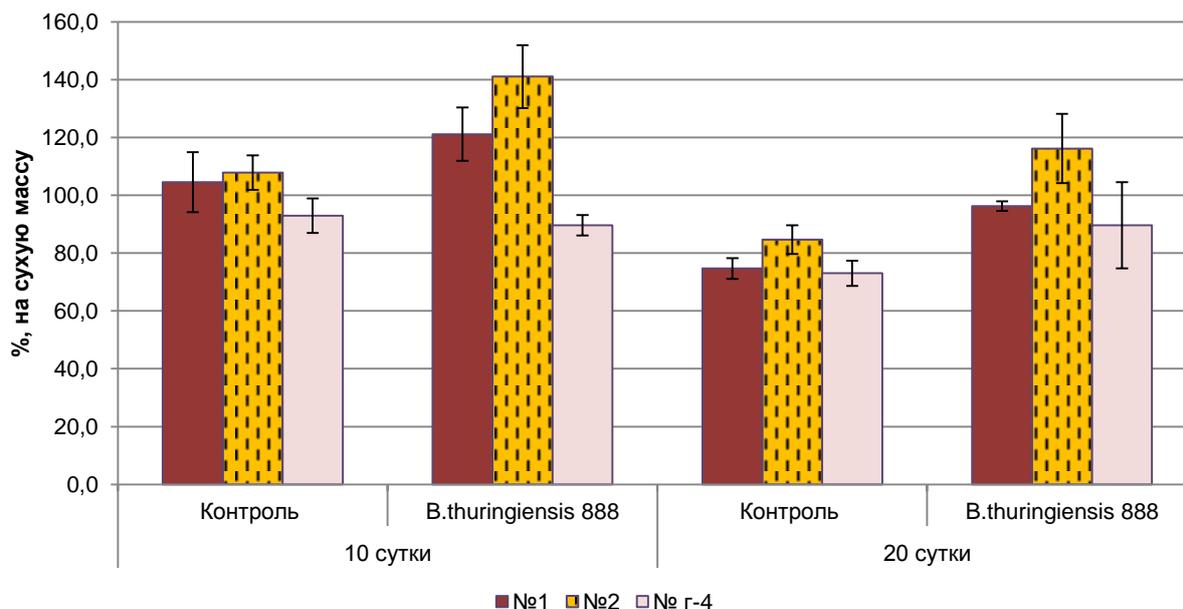
Изучение влияния обработки жидкой споровой культурой штамма *B. thuringiensis* 888 душицы обыкновенной различных образцов показало, что существенное накопление водорастворимых антиоксидантов (на 6,8% к контролю) отмечали лишь в листьях образца № г-4 на 10-е сутки после обработки (см. табл. 1). На основании этого можно заключить, что обработка культурой штамма *B. thuringiensis* 888 душицы обыкновенной не оказывает существенного влияния на естественно сложившиеся условия нормального метаболизма и свободнорадикального окисления.

Таблица 1. Содержание антиоксидантов и флавоноидов в растениях *O. Vulgare* L.

Table 1. Content of antioxidants and flavonoids in *O. vulgare* L.

Вариант опыта	Общие антиоксиданты, мг/г сырой массы	Водорастворимые антиоксиданты, мг/г сырой массы	Флавоноиды, мкг/г сухой массы
	Анализ на 10-е сутки после обработки		
№ 1	8,62±0,19	4,70±0,08	1,98±0,03
№ 1 + <i>B. thuringiensis</i> 888	8,49±0,16	4,92±0,24	2,65±0,04
№ 2	8,04±0,11	4,53±0,05	3,47±0,02
№ 2 + <i>B. thuringiensis</i> 888	7,40±0,25	4,39±0,06	4,19±0,05
№ г-4	7,85±0,11	4,39±0,11	1,96±0,03
№ г-4 + <i>B. thuringiensis</i> 888	8,23±0,11	4,70±0,17	2,04±0,05
Анализ на 20-е сутки после обработки			
№ 1	8,87±0,06	4,89±0,06	4,29±0,07
№ 1 + <i>B. thuringiensis</i> 888	8,36±0,06	4,77±0,12	4,64±0,03
№ 2	8,30±0,12	5,11±0,14	3,75±0,33
№ 2 + <i>B. thuringiensis</i> 888	9,06±0,06	5,01±0,14	4,61±0,06
№ г-4	7,98±0,16	4,64±0,18	3,92±0,05
№ г-4 + <i>B. thuringiensis</i> 888	8,23±0,11	4,89±0,08	4,04±0,12

²Окунцев М.М., Аксенова О.Ф., Вертоухова Г.С., Чупахина Г.Н., Роньжина О.А. Специальный практикум по биохимии и физиологии растений. 2-е изд., перераб. и доп. Томск : Изд-во Томского ун-та, 1974. 114 с.



Влияние штамма *B. Thuringiensis* 888 на содержание редуцирующих сахаров в листьях *O. Vulgare* L. различных образцов

B. thuringiensis strain 888 effect on the reducing sugars content in *O. vulgare* L. leaves of various samples

Флавоноиды являются полифенольными соединениями, обладающими противовоспалительными, антиаллергическими, антивирусными и антиканцерогенными свойствами [26]. Известно, что флавоноиды, содержащиеся в траве *O. vulgare*, перспективны при лечении диабета [27].

Исследование влияния культуры штамма *B. thuringiensis* 888 на содержание флавоноидов в сырье душицы обыкновенной позволили обнаружить накопление флавоноидов во всех изученных образцах *O. vulgare* (см. табл. 1). Наиболее существенно содержание флавоноидов увеличивалось в варианте с образцом № 1 на 10-е сутки после обработки штаммом *B. thuringiensis* 888 – на 33,8% к контролю. Однако на 20-е сутки значительного изменения в содержании флавоноидов отмечено не было. Стойкое, в среднем до 4,4 мкг/г (на 21,8% к контролю) накопление флавоноидов в течение всего эксперимента установлено в варианте с обработанным образцом № 2. При обработке образца № г-4 культурой штамма 888 наблюдали тенденцию к увеличению содержания флавоноидов как на 10-е, так и на 20-е сутки эксперимента (до

4,08% к контролю).

Максимальное количество эфирного масла у большинства представителей рода *Origanum*, как правило, накапливается в фазу цветения [28]. Поэтому исследования проводились именно в эту фазу. Исследуемые образцы *O. vulgare* № 1 и № 2 на фазе цветения содержали 0,22–0,71% эфирного масла от сухой массы растений (табл. 2). Обработка растений споровой культурой штамма *B. thuringiensis* 888 не оказала достоверного влияния на эфиромасличность образцов № 2 и № г-4. Однако после обработки образца № 1 наблюдали увеличение содержания эфирного масла в 2,4 раза по сравнению с контролем (до 0,59% от сухой массы).

Определение компонентного состава эфирного масла душицы обыкновенной методом газожидкостной хроматографии позволило обнаружить 90 компонентов, из которых было идентифицировано 22, 6 из них обладают бактерицидным действием: л-цимен, эвкалиптол, γ-терпинен, α-терпинеол, тимол, карвакрол (табл. 3).

Таблица 2. Содержание эфирного масла в образцах *O. vulgare* L.

Table. 2. Content of essential oil in *O. vulgare* L.

Вариант опыта	Массовая доля эфирного масла	
	% от сырой массы	% от сухой массы
№ 1	0,10±0,009	0,24±0,01
№ 1 + <i>B. thuringiensis</i> 888	0,24±0,01	0,59±0,01
№ 2	0,09±0,004	0,22±0,003
№ 2 + <i>B. thuringiensis</i> 888	0,09±0,006	0,23±0,01
№ г-4	0,29±0,01	0,71±0,009
№ г-4 + <i>B. thuringiensis</i> 888	0,26±0,006	0,64±0,005

Таблица 3. Влияние жидкой споровой культуры штамма *B. thuringiensis* 888 на компонентный состав эфирного масла в образцах *O. vulgare*

Table 3. Effect of *B. thuringiensis* strain 888 liquid spore culture on the component composition of essential oil in *O. vulgare* samples

Компонент	Концентрация компонента, % от цельного масла образцов <i>O. vulgare</i>					
	№ 1	№ 1 + <i>B. thuringiensis</i> 888	№ 2	№ 2 + <i>B. thuringiensis</i> 888	№ г-4	№ г-4 + <i>B. thuringiensis</i> 888
α-Пинен	0,06±0,008	0,05±0,002	0,13±0,008	0,06±0,003	0,66±0,05	0,79±0,11
Сабинен	—	—	0,03±0,002	—	0,09±0,005	0,09±0,01
β-Пинен	0,10±0,004	0,09±0,001	2,70±0,28	1,07±0,02	0,17±0,006	0,20±0,02
β-Мирцен	0,18±0,003	0,13±0,005	0,52±0,001	0,26±0,01	1,63±0,03	1,66±0,12
α-Терпинен	0,27±0,01	0,21±0,008	0,45±0,001	0,20±0,03	1,29±0,08	1,33±0,09
Лимонен	0,06±0,001	0,05±0,004	0,19±0,003	0,09±0,005	0,17±0,02	0,17±0,01
Эвкалиптол	0,22±0,003	0,05±0,009	2,75±0,36	1,31±0,03	1,81±0,09	2,01±0,05
γ-Терпинен	2,85±0,01	2,00±0,34	10,64±0,06	5,20±0,57	19,17±1,09	20,54±0,97
п-Цимен	0,75±0,02	0,53±0,12	1,49±0,02	0,63±0,18	10,06±0,63	8,04±0,34
3-Гексенол-1	0,14±0,007	0,18±0,02	0,87±0,006	0,64±0,04	0,06±0,003	0,07±0,01
1-Октен-3-ол	0,37±0,001	0,34±0,003	0,38±0,012	0,22±0,01	1,07±0,02	0,97±0,03
Камфора	0,05±0,006	0,09±0,045	0,12±0,001	0,22±0,005	0,06±0,01	0,05±0,004
Линалоол	0,84±0,09	1,00±0,004	0,66±0,02	2,50±1,20	2,91±0,84	1,61±0,05
Линалилацетат	0,82±0,20	1,68±0,006	0,43±0,004	2,97±1,38	1,66±0,80	0,38±0,14
Кариофиллен	10,95±0,07	7,28±0,04	18,16±1,09	20,04±0,86	3,47±0,10	3,76±0,30
α-Хумулен	2,10±0,04	1,47±0,008	3,36±0,009	3,73±0,14	0,39±0,01	0,43±0,02
α-Терпинеол	24,21±0,70	22,76±0,41	0,84±0,003	2,43±0,27	0,36±0,05	0,67±0,33
Гермакрен Д	6,60±0,16	6,47±0,05	21,47±0,27	22,57±0,63	2,31±0,09	2,59±0,07
β-Циклогермакрен	2,09±0,07	1,50±0,006	3,00±0,17	3,32±0,17	0,93±0,04	0,95±0,04
Кариофилленоксид	0,68±0,03	0,54±0,003	3,94±0,24	5,17±0,26	0,70±0,06	0,44±0,05
Тимол	0,26±0,08	0,10±0,001	0,60±0,008	0,55±0,004	0,22±0,02	0,22±0,007
Карвакрол	22,91±0,14	29,72±0,57	5,29±0,26	3,95±0,38	41,06±2,43	43,38±0,51

По результатам анализа влияния обработки жидкой споровой культурой штамма *B. thuringiensis* 888 на компонентный состав эфирного масла образцов *O. vulgare* было установлено, что наиболее устойчивым к обработке энтомопатогенными бактериями оказался образец № г-4 (см. табл. 3). Наблюдали уменьшение содержания линалоола и кариофилленоксида соответственно на 44,6 и 37,1% и линалилацетата в 4,3 раза по сравнению с контролем. При этом происходило накопление α-терпинеола на 86,1% к контролю. Поскольку повышенное содержание α-терпинеола и α-терпинена связывают с репеллентной активностью против представителей рода *Citex* [29], возможно, обработкой штаммом 888 позволит получить эфирное масло обладающее инсектицидным свойством. Обработка штаммом 888 образца № 1, напротив, способствовала увеличению содержания в эфирном масле душицы обыкновенной линалоола на 19,0% и линалилацетата в 2,0 раза к контролю. При этом отмечали уменьшение количества β-мирцена, α-терпинена, эвкалиптола и β-циклогермакрена в среднем на 23,6%, а также тимола в 2,6 раза к контролю. Наименее устойчивым к обработке жидкой споровой культурой штамма *B. thuringiensis* 888 оказался образец № 2. В данном варианте наблюдали уменьшение содержания в эфирном масле α- и β-пинена, β-мирцена, α- и γ-терпинена, лимонена, эвкалиптола, п-цимена в среднем на 53,3% к контролю, а

также отсутствие сабинена. Однако содержание камфоры и кариофилленоксида увеличивалось соответственно на 83,3 и 31,2% к контролю, а линалоола, линалилацетата и α-терпинеола соответственно в 3,7; 6,9 и 2,8 раза. Увеличение содержания камфоры, обладающей антиоксидантными и антифунгальными свойствами против микромицетов родов *Aspergillus*, *Penicillium*, может свидетельствовать о повышении устойчивости душицы обыкновенной образца № 2, обработанной культурой штамма *B. thuringiensis* 888, к данным фитопатогенам [30].

ВЫВОДЫ

Установлено, что действие споровой культуры штамма *B. thuringiensis* 888 образцов *O. vulgare* не оказывает существенного влияния на накопление в листьях терпеноидных хинонов, токохроманолов и водорастворимых антиоксидантов.

Показано, что обработка душицы обыкновенной жидкой споровой культурой штамма *B. thuringiensis* 888 способствует формированию стойкой тенденции к накоплению редуцирующих сахаров в вегетативной массе – до 30,8% к контролю.

Отмечено, что обработка растений споровой культурой штамма *B. thuringiensis* 888 способствовала увеличению содержания эфирного масла в растениях *O. vulgare* образца № 1 в 2,4 раза по сравнению с контролем, и не оказывала существенного влияния на эфиромасличность образцов № 2 и № г-4.

Установлено, что наиболее устойчивым к обработке энтомопатогенными бактериями оказался образец № г-4, в эфирном масле которого наблюдали уменьшение содержания линалоола и ка-

риофилленоксида соответственно на 44,6 и 37,1% и линалилацетата – в 4,3 раза по сравнению с контролем, и накопление α -терпинеола на 86,1%.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Morshedloo M.R., Craker L.E., Salami A., Nazeri V., Sang H., Maggi F. Effect of prolonged water stress on essential oil content, compositions and gene expression patterns of mono- and sesquiterpene synthesis in two oregano (*Origanum vulgare* L.) subspecies // Plant Physiology and Biochemistry. 2017. Vol. 111. P. 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.11.023>
2. Avola R., Granata G., Geraci C., Napoli E., Graziano A.C.E., Cardile V. Oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil provides anti-inflammatory activity and facilitates wound healing in a human keratinocytes cell model // Food and Chemical Toxicology. 2020. Vol. 144. P. 111586. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111586>
3. Han X., Parker T. L. Anti-inflammatory, tissue remodeling, immunomodulatory, and anticancer activities of oregano (*Origanum vulgare*) essential oil in a human skin disease model // Biochimie Open. 2017. Vol. 4. P. 73–77. <https://doi.org/10.1016/j.bioopen.2017.02.005>
4. Migliorini M.J., Boiago M.M., Roza L.F., Barreta M., Arno A., Robazza W.S., et al. Oregano essential oil (*Origanum vulgare*) to feed laying hens and its effects on animal health // Anais da Academia Brasileira de Ciencias. 2019. Vol. 91. Issue 1. e20170901. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920170901>
5. Bampidis V., Azimonti G., de Lourdes Bastos M., Christensen H., Dusemund B., Kouba M., et al. Safety of an essential oil from *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (Link) letsw. var. Vulkan when used as a sensory additive in feed for all animal species // In EFSA journal // European Food Safety Authority. 2019. Vol. 17. Issue 7. e05794. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5794>
6. Govindarajan M., Rajeswary M., Hoti S.L., Benelli G. Larvicidal potential of carvacrol and terpinen-4-ol from the essential oil of *Origanum vulgare* (Lamiaceae) against *Anopheles stephensi*, *Anopheles subpictus*, *Culex quinquefasciatus* and *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae) // Research in Veterinary Science. 2016. Vol. 104. P. 77–82. <https://doi.org/pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26850541/>
7. Gong X., Ren Y. Larvicidal and ovicidal activity of carvacrol, p-cymene, and γ -terpinene from *Origanum vulgare* essential oil against the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) // Environmental Science and Pollution Research International. 2020. Vol. 27. Issue 15. P. 18708–18716. <https://doi.org/pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32207008/>
8. Castronovo L.M., Calonico C., Ascrizzi R., del Duca S., Delfino V., Chioccioli S., et al. The cultivable bacterial microbiota associated to the medicinal plant *Origanum vulgare* L.: from antibiotic resistance to growth-inhibitory properties // Frontiers in Microbiology. 2020. Vol. 11. P. 862. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00862>
9. Di Vito M., Cacaci M., Barbanti L., Martini C., Sanguinetti M., Benvenuti S., et al. *Origanum vulgare* essential oil vs. a commercial mixture of essential oils: *in vitro* effectiveness on *Salmonella* spp. from poultry and swine intensive livestock // Antibiotics. 2020. Vol. 9. Issue 11. P. 763. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110763>
10. Císarová M., Tančinová D., Medo J., Kačániová M. The *in vitro* effect of selected essential oils on the growth and mycotoxin production of *Aspergillus* species // Journal of Environmental Science and Health. Part B: pesticides, food contaminants, and agricultural wastes. 2016. Vol. 51. Issue 10. P. 668–674. <https://doi.org/10.1080/03601234.2016.1191887>
11. Hou H., Zhang X., Zhao T., Zhou L. Effects of *Origanum vulgare* essential oil and its two main components, carvacrol and thymol, on the plant pathogen *Botrytis cinerea* // PeerJ. 2020. Vol. 8. P. e9626. <https://doi.org/10.7717/peerj.9626>
12. Vinciguerra V., Rojas F., Tedesco V., Giusiano G., Angiolella L. Chemical characterization and antifungal activity of *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* essential oils and carvacrol against *Malassezia furfur* // Natural Product Research. 2019. Vol. 33. Issue 22. P. 3273–3277. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1468325>
13. Pradebon Brondani L., Alves da Silva Neto T., Antonio Freitag R., Guerra Lund R. Evaluation of anti-enzyme properties of *Origanum vulgare* essential oil against oral *Candida albicans* // Journal de Mycologie Medicale. 2018. Vol. 28. Issue 1. P. 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.12.001>
14. Marcial G.E., Gerez C.L., de Kairuz M.N., Araoz V.C., Schuff C., de Valdez G.F. Influence of oregano essential oil on traditional Argentinean cheese elaboration: Effect on lactic starter cultures // Revista Argentina de Microbiologia. 2016. Vol. 48. Issue 3. P. 229–235. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.04.006>
15. Hać-Szymańczuk E., Cegiełka A., Karkos M., Gniewosz M., Piwowarek K. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of oregano (*Origanum vulgare* L.) preparations during storage of low-pressure mechanically separated meat (BAADER meat) from chickens // Food Science and Biotechnology. 2019. Vol. 28. Issue 2. P. 449–457. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0491-1>
16. Tuttolomondo T., Martinelli F., Mariotti L., Leto C., Maggio A., La Bella S. Agronomic, metabolic and lipidomic characterisation of Sicilian Ori-

ganum vulgare (L.) ecotypes // Natural Product Research. 2016. Vol. 30. Issue 9. P. 1103–1107. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1104672>

17. Deshayes C., Siegwart M., Pauron D., Froger J.-A., Lapied B., Apaire-Marchais V. Microbial pest control agents: Are they a specific and safe tool for insect pest management? // Current Medicinal Chemistry. 2017. Vol. 24. Issue 27. P. 2959–2973. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170314144311>

18. Rubio-Infante N., Moreno-Fierros L. An overview of the safety and biological effects of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins in mammals // Journal of Applied Toxicology. 2016. Vol. 36. Issue 5. P. 630–648. <https://doi.org/10.1002/jat.3252>

19. Moghrovyan A., Sahakyan N., Babayan A., Chichoyan N., Petrosyan M., Trchounian A. Essential oil and ethanol extract of oregano (*Origanum vulgare* L.) from Armenian flora as a natural source of terpenes, flavonoids and other phytochemicals with anti-radical, antioxidant, metal chelating, tyrosinase inhibitory and antibacterial activity // Current Pharmaceutical Design. 2019. Vol. 25. Issue 16. P. 1809–1816. <https://doi.org/10.2174/1381612825666190702095612>

20. Биохимические методы анализа эфиромасличных растений и эфирных масел: сборник науч. трудов / сост.: А.Н. Карпачева, К.Г. Персидская, Л.Н. Лиштванова. Симферополь, 1972. 107 с.

21. Мягких Е.Ф., Марченко М.П., Новиков И.А. Сравнительный анализ гибридов *Origanum vulgare* L. по комплексу признаков // Таврический вестник аграрной науки. 2018. № 2 (14). С. 89–95.

22. Jennings W., Shibamoto T. Qualitative analysis of flavor and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography. N.-Y.: Academic Press, 1980. 240 p. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384250-3.x5001-6>

23. Халафян А.А. Современные статистические методы медицинских исследований: монография. 3-е изд. М.: Ленанд, 2014. 320 с.

24. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rob-

ers P.A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // Analytical Chemistry. 1956. Vol. 28. P. 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>

25. Witkowicz R., Biel W., Skrzypek E., Chlopicka J., Glen-Karolczyk K., Krupa M., et al. Microorganisms and biostimulants impact on the antioxidant activity of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) sprouts // Antioxidants. 2020. Vol. 9. Issue 7. P. 584. <https://doi.org/10.3390/antiox9070584>

26. Bojić M., Maleš Ž., Antolić A., Babić I., Tomičić M. Antithrombotic activity of flavonoids and polyphenols rich plant species // Acta Pharmaceutica. 2019. Vol. 69. Issue 4. P. 483–495. <https://doi.org/10.2478/acph-2019-0050>

27. Bower A.M., Real Hernandez L.M., Berhow M.A., de Mejia E.G. Bioactive compounds from culinary herbs inhibit a molecular target for type 2 diabetes management, dipeptidyl peptidase IV // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2014. Vol. 62. Issue 26. P. 6147–6158. <https://doi.org/10.1021/jf500639f>

28. Fikry S., Khalil N., Salama O. Chemical profiling, biostatic and biocidal dynamics of *Origanum vulgare* L. essential oil // AMB Express. 2019. Vol. 9. Issue 1. Article number 41. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0764-y>

29. Sharififard M., Alizadeh I., Jahanifard E., Wang C., Azemi M.E. Chemical composition and repellency of *Origanum vulgare* essential oil against *Cimex lectularius* under laboratory conditions // Journal of Arthropod-Borne Diseases. 2018. Vol. 12. Issue 4. P. 387–397.

30. Elansary H.O., Abdelgaleil S.A.M., Mahmoud E.A., Yessoufou K., Elhindi K., El-Hendawy S. Effective antioxidant, antimicrobial and anticancer activities of essential oils of horticultural aromatic crops in northern Egypt // BMC Complementary and Alternative Medicine. 2018. Vol. 18. Issue 1. Article number 214.

REFERENCE

1. Morshedloo MR, Craker LE, Salami A, Nazeri V, Sang H, Maggi F. Effect of prolonged water stress on essential oil content, compositions and gene expression patterns of mono- and sesquiterpene synthesis in two oregano (*Origanum vulgare* L.) subspecies. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2017;111:119–128. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.11.023>

2. Avola R, Granata G, Geraci C, Napoli E, Graziano ACE, Cardile V. Oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil provides anti-inflammatory activity and facilitates wound healing in a human keratinocytes cell model. *Food and Chemical Toxicology*. 2020;144:111586. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111586>

3. Han X, Parker T. L. Anti-inflammatory, tissue remodeling, immunomodulatory, and anticancer activities of oregano (*Origanum vulgare*) essential oil

in a human skin disease model. *Biochimie Open*. 2017;4:73–77. <https://doi.org/10.1016/j.biopen.2017.02.005>

4. Migliorini MJ, Boiago MM, Roza LF, Barreta M, Arno A, Robazza WS, et al. Oregano essential oil (*Origanum vulgare*) to feed laying hens and its effects on animal health. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2019;91(1):e20170901. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920170901>

5. Bampidis V, Azimonti G, de Lourdes Bastos M, Christensen H, Dusemund B, Kouba M, et al. Safety of an essential oil from *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (Link) letsw. var. Vulkan when used as a sensory additive in feed for all animal species // In EFSA journal. *European Food Safety Authority*. 2019;17(7): e05794. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5794>

6. Govindarajan M, Rajeswary M, Hoti SL, Benelli G. Larvicidal potential of carvacrol and terpinen-

4-ol from the essential oil of *Origanum vulgare* (Lamiaceae) against *Anopheles stephensi*, *Anopheles bipunctatus*, *Culex quinquefasciatus* and *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae). *Research in Veterinary Science*. 2016;104:77–82. <https://doi.org/pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26850541/>

7. Gong X, Ren Y. Larvicidal and ovicidal activity of carvacrol, p-cymene, and γ -terpinene from *Origanum vulgare* essential oil against the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Environmental Science and Pollution Research International*. 2020;27(15):18708–18716. <https://doi.org/pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32207008/>

8. Castronovo LM, Calonico C, Ascrizzi R, del Duca S, Delfino V, Chioccioli S, et al. The cultivable bacterial microbiota associated to the medicinal plant *Origanum vulgare* L.: from antibiotic resistance to growth-inhibitory properties. *Frontiers in Microbiology*. 2020;11:862. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00862>

9. Di Vito M, Cacaci M, Barbanti L, Martini C, Sanguinetti M, Benvenuti S, et al. *Origanum vulgare* essential oil vs. a commercial mixture of essential oils: *in vitro* effectiveness on *Salmonella* spp. from poultry and swine intensive livestock. *Antibiotics*. 2020;9(11):763. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110763>

10. Cisarová M, Tančinová D, Medo J, Kačaniová M. The *in vitro* effect of selected essential oils on the growth and mycotoxin production of *Aspergillus* species. *Journal of Environmental Science and Health. Part B: pesticides, food contaminants, and agricultural wastes*. 2016;51(10):668–674. <https://doi.org/10.1080/03601234.2016.1191887>

11. Hou H, Zhang X, Zhao T, Zhou L. Effects of *Origanum vulgare* essential oil and its two main components, carvacrol and thymol, on the plant pathogen *Botrytis cinerea*. *PeerJ*. 2020;8:e9626. <https://doi.org/10.7717/peerj.9626>

12. Vinciguerra V, Rojas F, Tedesco V, Giusiano G, Angiolella L. Chemical characterization and antifungal activity of *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* essential oils and carvacrol against *Malassezia furfur*. *Natural Product Research*. 2019;33(22):3273–3277. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1468325>

13. Pradebon Brondani L., Alves da Silva Neto T., Antonio Freitag R., Guerra Lund R. Evaluation of anti-enzyme properties of *Origanum vulgare* essential oil against oral *Candida albicans*. *Journal de Mycologie Medicale*. 2018;28(1):94–100. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.12.001>

14. Marcial GE, Gerez CL, de Kairuz MN, Araoz VC, Schuff C, de Valdez GF. Influence of oregano essential oil on traditional Argentinean cheese elaboration: Effect on lactic starter cultures. *Revista Argentina de Microbiología*. 2016;48(3):229–235. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.04.006>

15. Hać-Szymańczuk E, Cegiełka A, Karkos M, Gniewosz M, Piwowarek K. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of oregano (*Origanum*

vulgare L.) preparations during storage of low-pressure mechanically separated meat (BAADER meat) from chickens. *Food Science and Biotechnology*. 2019;28(2):449–457. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0491-1>

16. Tuttolomondo T, Martinelli F, Mariotti L, Leto C, Maggio A, La Bella S. Agronomic, metabolomic and lipidomic characterisation of Sicilian *Origanum vulgare* (L.) ecotypes. *Natural Product Research*. 2016;30(9):1103–1107. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1104672>

17. Deshayes C, Siegwart M, Pauron D, Froger J-A, Lapied B, Apaire-Marchais V. Microbial pest control agents: Are they a specific and safe tool for insect pest management? *Current Medicinal Chemistry*. 2017;24(27):2959–2973. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170314144311>

18. Rubio-Infante N, Moreno-Fierros L. An overview of the safety and biological effects of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins in mammals. *Journal of Applied Toxicology*. 2016;36(5):630–648. <https://doi.org/10.1002/jat.3252>

19. Moghrovyan A, Sahakyan N, Babayan A, Chichoyan N, Petrosyan M, Trchounian A. Essential oil and ethanol extract of oregano (*Origanum vulgare* L.) from Armenian flora as a natural source of terpenes, flavonoids and other phytochemicals with antiradical, antioxidant, metal chelating, tyrosinase inhibitory and antibacterial activity. *Current Pharmaceutical Design*. 2019;25(16):1809–1816. <https://doi.org/10.2174/1381612825666190702095612>

20. *Biochemical methods for the analysis of essential oil plants and essential oils*: Collection of scientific papers. Simferopol'; 1972. 107 p. (In Russian)

21. Myagkih EF, Marchenko MP, Novikov IA. Comparative analysis of *origanum vulgare* L. hybrids according to the complex of characteristics. *Tavrisheskii vestnik agrarnoi nauki*. 2018;2:89–95. (In Russian)

22. Jennings W, Shibamoto T. *Qualitative analysis of flavor and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography*. N.-Y.: Academic Press; 1980. 240 p. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384250-3.x5001-6>

23. Khalafyan AA. *Modern statistical methods of medical research*. Moscow: Lenand; 2014. 320 p. (In Russian)

24. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Robers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 1956;28:350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>

25. Witkowicz R, Biel W, Skrzypek E, Chlopicka J, Glen-Karolczyk K, Krupa M, et al. Microorganisms and biostimulants impact on the antioxidant activity of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) sprouts. *Antioxidants*. 2020;9(7):584. <https://doi.org/10.3390/antiox9070584>

26. Bojić M, Maleš Ž, Antolić A, Babić I, Tomičić

M. Antithrombotic activity of flavonoids and polyphenols rich plant species. *Acta Pharmaceutica*. 2019;69(4):483–495. <https://doi.org/10.2478/acph-2019-0050>

27. Bower AM, Real Hernandez LM, Berhow MA, de Mejia EG. Bioactive compounds from culinary herbs inhibit a molecular target for type 2 diabetes management, dipeptidyl peptidase IV. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014;62(26):6147–6158. <https://doi.org/10.1021/jf500639f>

28. Fikry S, Khalil N, Salama O. Chemical profiling, biostatic and biocidal dynamics of *Origanum vulgare* L. essential oil. *AMB Express*. 2019;9(1).

Article number 41. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0764-y>

29. Sharififard M, Alizadeh I, Jahanifard E, Wang C, Azemi ME. Chemical composition and repellency of *Origanum vulgare* essential oil against *Cimex lectularius* under laboratory conditions. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*. 2018;12(4):387–397.

30. Elansary HO, Abdelgaleil SAM, Mahmoud EA, Yessoufou K, Elhindi K, El-Hendawy S. Effective antioxidant, antimicrobial and anticancer activities of essential oils of horticultural aromatic crops in northern Egypt. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2018;18(1). Article number 214.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

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,
295453, г. Симферополь, ул. Киевская, 150,
Российская Федерация,
✉ e-mail: solanum@ukr.net

Буджурова Урьяне Меметовна,
лаборант лаборатории молекулярной
и клеточной биологии,
Научно-исследовательский институт сельского
хозяйства Крыма,
295453, г. Симферополь, ул. Киевская, 150,
Российская Федерация,
e-mail: ubudzhurova@mail.ru

Новиков Илья Александрович,
научный сотрудник лаборатории селекции,
Научно-исследовательский институт сельского
хозяйства Крыма,
295453, г. Симферополь, ул. Киевская, 150,
Российская Федерация,
e-mail: i.nowikow2012@mail.ru

Аметова Эльмира Джипаровна,
заведующая сектором биохимических
анализов,
Научно-исследовательский институт сельского
хозяйства Крыма,
295453, г. Симферополь, ул. Киевская, 150,
Российская Федерация,
e-mail: e-ametova@mai.ua

Соболева Елена Евгеньевна,
младший научный сотрудник,
Научно-исследовательский институт сельского
хозяйства Крыма,
295453, г. Симферополь, ул. Киевская, 150,
Российская Федерация,
e-mail: onelarozas81@gmail.com

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

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,
✉ e-mail: solanum@ukr.net

Uryane M. Budzhurova,
Laboratory Assistant,
Laboratory of Molecular and Cellular Biology,
Research Institute of Agriculture of Crimea,
150, Kievskaya St., Simferopol, 295453,
Russian Federation,
e-mail: ubudzhurova@mail.ru

Ilya A. Novikov,
Researcher,
Laboratory of Breeding,
Research Institute of Agriculture of Crimea,
150, Kievskaya St., Simferopol, 295453,
Russian Federation,
e-mail: i.nowikow2012@mail.ru

Elmira D. Ametova,
Head of the Biochemical Analyses Sector,
Research Institute of Agriculture of Crimea,
150, Kievskaya St., Simferopol, 295453,
Russian Federation,
e-mail: e-ametova@mai.ua

Elena E. Soboleva,
Researcher,
Laboratory of Breeding,
Research Institute of Agriculture of Crimea,
150, Kievskaya St., Simferopol, 295453,
Russian Federation,
e-mail: onelarozas81@gmail.com

Смаглий Наталья Николаевна,
лаборант лаборатории молекулярной
и клеточной биологии,
Научно-исследовательский институт сельского
хозяйства Крыма,
295453, г. Симферополь, ул. Киевская, 150,
Российская Федерация,
e-mail: scarletsun7991@mail.ru

Решетник Галина Васильевна,
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: gvresh@ukr.net

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 18.04.2021.
Одобрена после рецензирования 21.06.2021.
Принята к публикации 30.08.2021.*

Natalia N. Smagliy,
Laboratory Assistant,
Laboratory of Molecular and Cellular Biology,
Research Institute of Agriculture of Crimea,
150, Kievskaya St., Simferopol, 295453,
Russian Federation,
e-mail: scarletsun7991@mail.ru

Galina V. Reshetnik,
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: gvresh@ukr.net

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 18.04.2021.
Approved after reviewing 21.06.2021.
Accepted for publication 30.08.2021.*

Оригинальная статья / Original article

УДК 602.4:561.23

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-441-448>



Изучение скорости биодеструкции амфотерного сурфактанта кокамидопропилбетаина бактериями рода *Pseudomonas* и активным илом

© А.С. Бурлаченко, О.В. Салищева, Л.С. Дышлюк

Кемеровский государственный университет,
г. Кемерово, Российская Федерация

Резюме: Целью работы являлось исследование скорости процесса биодеструкции кокамидопропилбетаина бактериями рода *Pseudomonas* и активного ила. В качестве штаммов-деструкторов были взяты микроорганизмы: *Pseudomonas fluorescens* TR (ВКПМ В-4881), *Pseudomonas putida* ТП-19 (В-6582), *Pseudomonas stutzeri* Т (В-4904), *Pseudomonas putida* ТШ-18 (В-2950), *Pseudomonas putida* ТО (В-3959), *Pseudomonas mendocina* 2S (В-4710), *Pseudomonas oleovorans* TF4-1L (В-8621) и активный ил, полученный с аэротенков действующего предприятия Кузбасса. Биоокисление ПАВ проводили в стеклянных колбах объемом 250 см³, помещенных в шейкер-инкубатор, в условиях постоянной температуры 30 °С для чистых культур и 18 °С – для активного ила. Штамм-деструктор должен обладать способностью за минимальный временной интервал снижать концентрацию сурфактанта до безопасных значений. Штаммы *Pseudomonas stutzeri* Т (В-4904) и *Pseudomonas fluorescens* TR (В-4881) показали наименьший период полураспада сурфактанта – 2,5 и 2,6 суток соответственно. Несколько большие периоды показали штаммы *Pseudomonas putida* ТО (В-3959), *Pseudomonas putida* ТШ-18 (В-2950) и *Pseudomonas oleovorans* TF4-1L (В-8621) – 3,0; 4,5 и 4,9 суток соответственно. Наибольший период полураспада ПАВ показали микроорганизмы *Pseudomonas mendocina* 2S (В-4710) – 5,5 суток, и *Pseudomonas putida* ТП-19 (В-6582) – 6,0 суток. Максимальная степень биодеструкции сурфактанта наблюдалась при действии биоценоза микроорганизмов. За 14 суток концентрация кокамидопропилбетаина снизилась до 0,27% от его начальной концентрации. Показана эффективность использования бактерий рода *Pseudomonas* в качестве деструкторов сурфактантов. Бактерии данного рода имеют короткое время генерации, высокую скорость наращивания биомассы по сравнению с бактериями-деструкторами других родов и меньший период адаптации к ПАВ по сравнению с активным илом. Были подобраны штаммы микроорганизмов *Pseudomonas*, способных за минимальный временной интервал снижать концентрацию ПАВ до безопасных значений для последующей разработки технологии получения эффективного биопрепарата, предназначенного для очистки сточных вод от амфотерных сурфактантов.

Ключевые слова: поверхностно-активные вещества, кокамидопропилбетаин, бактерии рода *Pseudomonas*, активный ил, биодеструкция

Для цитирования: Бурлаченко А.С., Салищева О.В., Дышлюк Л.С. Изучение скорости биодеструкции амфотерного сурфактанта кокамидопропилбетаина бактериями рода *Pseudomonas* и активным илом. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2021. Т. 11. N 3. С. 441–448. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-441-448>

Study into biodegradation of cocamidopropyl betaine, an amphoteric surfactant, by *Pseudomonas* bacteria and activated sludge

Anastasia S. Burlachenko, Olesya V. Salishcheva, Lyubov S. Dyshlyuk

Kemerovo State University,
Kemerovo, Russian Federation

Abstract: The paper examines the biodegradation rate of cocamidopropyl betaine by bacteria of the genus *Pseudomonas* and activated sludge. The following microorganisms were taken as destructor strains: *Pseudomonas fluorescens* TR (VKPM В-4881), *Pseudomonas putida* TP-19 (В-6582), *Pseudomonas stutzeri* Т (В-4904), *Pseudomonas putida* TSh-18 (В-2950), *Pseudomonas putida* TO (В-3959), *Pseudomonas mendocina* 2S (В-4710), *Pseudomonas oleovorans* TF4-1L (В-8621) and activated sludge obtained at activated sludge reactors of a Kuzbass plant. Biooxidation of surfactant samples was carried out in 250 cm³ glass

flasks, placed into an incubator shaker, at a constant temperature of 30°C for pure cultures and 18°C for activated sludge. The destructor strain should reduce the surfactant concentration to safe values within a minimum time interval. *Pseudomonas stutzeri* T (B-4904) and *Pseudomonas fluorescens* TR (B-4881) strains provided the shortest half-life of the surfactant under study – 2.5 and 2.6 days, respectively. For *Pseudomonas putida* TO (B-3959), *Pseudomonas putida* TSh-18 (B-2950) and *Pseudomonas oleovorans* TF4-1L (B-8621) strains, these values amounted to 3.0, 4.5 and 4.9 days, respectively. The maximum half-life of the surfactant under study was demonstrated by *Pseudomonas mendocina* 2S (B-4710) and *Pseudomonas putida* TP-19 (B-6582) microorganisms – 5.5 and 6.0 days, respectively. The maximum biodegradation of the surfactant was observed under its exposure to the biocenosis of microorganisms. Over 14 days, the concentration of cocamidopropyl betaine decreased to 0.27% of its initial concentration. The efficiency of *Pseudomonas* bacteria as destructors of surfactants was demonstrated. Bacteria of this genus exhibit a shorter generation time and a higher rate of biomass growth when compared to other strains and a shorter period of adaptation to surfactants when compared to activated sludge. Capable of reducing surfactant concentrations to safe values in a minimum time interval, *Pseudomonas* strains can be used as an effective agent in the development of technologies for wastewater purification from amphoteric surfactants.

Keywords: surfactants, cocamidopropyl betaine, *Pseudomonas* bacteria, activated sludge, biodegradation

For citation: Burlachenko AS, Salishcheva OV, Dyshlyuk LS. Study into biodegradation of cocamidopropyl betaine, an amphoteric surfactant, by *Pseudomonas* bacteria and activated sludge. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(3):441–448. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-441-448>

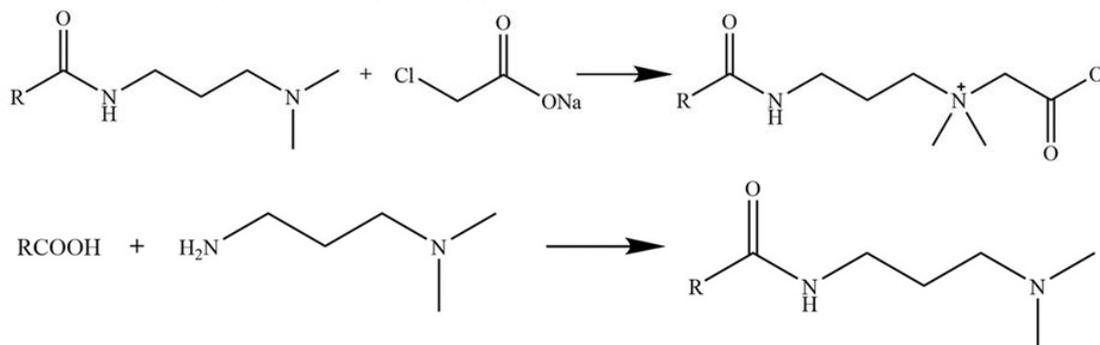
ВВЕДЕНИЕ

Поверхностно-активные вещества (ПАВ) – распространенные органические соединения, которые благодаря своему дипольному строению способны понижать энергетические взаимодействия на границе фаз. Очень важным аспектом является то, что ПАВ легко адсорбируются полимерами. Также сурфактанты способны проникать через цитоплазматические мембраны клеток, нарушая их физиологические процессы, тем самым проявляя ярко выраженные антимикробные свойства, что является причиной токсического действия сурфактантов, а также их негативного влияния на окружающую среду и накопление этих веществ в экосистеме [1–3].

В то же время каждому типу ПАВ присущи как достоинства, так и недостатки. Для компенсации недостатков одного сурфактанта достоинствами другого эмпирическим путем подбирается оптимальный состав композиции из ионогенных и неионогенных ПАВ. На данном этапе развития индустрии сурфактантов наиболее предпочтительными в использовании являются амфотерные ПАВ благодаря широкому спектру их

действия. В настоящее время во всем мире отмечается тенденция применения био-ПАВ. Достоинством биосурфактантов являются низкие значения токсичности для пресноводных, морских и наземных экосистем. Недостатки их применения – низкая устойчивость к действию некоторых абиотических факторов и высокая стоимость, что существенно сказывается на объеме их потребления по сравнению с синтетическими ПАВ. Вместе с тем большое число исследований направлено на улучшение биоразложения нефти, а также на увеличение нефтеотдачи с помощью био-ПАВ [4, 5].

Кокаמידопропилбетаин (САРВ) – алкиламидобетаиновый ПАВ, представляющий коммерчески самый важный класс амфотерных сурфактантов, который используется в производстве средств личной гигиены в огромных масштабах. Он представляет собой продукт реакции конденсации жирных кислот ($R = C_7-C_{17}$) и 3,3-диметиламинопропиламина после взаимодействия промежуточного продукта кокаמידопропилдиметиламина с монохлоруксусной кислотой [6]:



Известны работы, посвященные исследованию токсичных свойств САРВ, которые демонстрируют его способность нарушать фотосинте-

тические процессы в клетках водорослей [7], а также подавлять цветение водорослей, т.е. вызывать лизис клеток живых организмов [8].

Не так давно была обнаружена способность кокамидопропилбетаина проявлять мощные антисептические свойства. Авторы работа [9] предложили использовать его в качестве составного 0,075%-го раствора в физиологической сыворотке для гигиенического процесса интубации.

Изучению процессов биодеструкции кокамидопропилбетаина посвящено ограниченное число работ. Так, например, в исследованиях по биодеструкции структурно похожего вещества оксида кокамидопропиламина (АО-Сосоамидо) показано, что способность микроорганизмов к разрыву связи С–N является решающим фактором, характеризующим способность штамма к осуществлению процесса биодеструкции ПАВ [10, 11]. Известны микроорганизмы, которые при взаимодействии могут практически полностью утилизировать кокамидопропилбетаин за 4 суток [12], но только в среде, богатой низкомолекулярными неорганическими азотсодержащими соединениями, так как штаммы практически не могут ассимилировать азот из сурфактанта. Это микроорганизмы *Pseudomonas sp.* FV ССМ 8810 и *Rhizobium sp.* ССМ 8811. Бактерия рода *Pseudomonas* осуществляет первичную биодеструкцию и разрушает алкильный радикал, в то время как штамм *Rhizobium sp.* ССМ 8811 является утилизатором алкиламидопропилбетаинового остатка. Для осуществления быстрого и полного процесса биодеструкции этим микроорганизмам необходим доступный источник азота. При проведении эксперимента в суспензии, не содержащей минеральных компонентов, продолжительность биодеструкции составляет 29 суток, что является достаточно долгим периодом. В этом направлении требуются дальнейшие исследования.

Известно, что представители рода *Pseudomonas* обладают способностью к быстрой деградации углеводов [13]. Это объясняется наличием у данных бактерий комплекса оксидаз – ферментов, окисляющих углеводороды. Также они имеют повышенный уровень гидрофобности клеточной стенки при росте на углеводородах и способность синтезировать поверхностно-активные вещества, повышающие биодоступность гидрофобных веществ. Данный род бактерий содержит генетический материал, необходимый для трансляции ряда ферментов, осуществляющих деградацию различных органических веществ. Благодаря этим особенностям бактерии рода *Pseudomonas* активно исследуются учеными всего мира с целью использования их в экологических биотехнологиях. Так, в работе [14] рассмотрено влияние композиций ПАВ на рост и ферментативную активность углеводородокисляющей микрофлоры месторождений вязких парафинистых нефтей. Усиленный рост микрофлоры (на 3–4 порядка) сопровождался повышением активности окислительно-восстанови-

тельных ферментов в 3–14 раз. После биодеструкции в составе вязких парафинистых нефтей накапливались промежуточные продукты окисления углеводородов – кислоты, альдегиды, спирты, кетоны, эфиры, обладающие поверхностно-активными свойствами, что позволяет им эмульгировать нефть и способствовать снижению межфазного натяжения в системе нефть–вода–порода. А в работе [15] представлены результаты исследования влияния низкочастотного ультразвука на деградацию неионогенных синтетических ПАВ различной молекулярной структуры, полученные на основе фотокolorиметрических и вискозиметрических измерений.

Полифункциональность действия синтетических ПАВ, а также биорезистентность большинства из них приводят к снижению степени очистки промышленных стоков. Интенсивное пенообразование в аэротенках, обусловленное даже малыми концентрациями ПАВ, приводит к нарушению поступления кислорода и созданию неблагоприятных условий для развития биоценоза активного ила [15]. В результате формируется неадаптированный биоценоз микроорганизмов, не способный ассимилировать специфические загрязняющие вещества. Как результат, наблюдается несоответствие качества очищенных стоков нормативным требованиям по токсичным и биорезистентным поллютантам, особенно в случаях аномальных сбросов на химических предприятиях.

Цель настоящей работы заключалась в подборе штаммов микроорганизмов, способных за минимальный временной интервал снижать концентрацию кокамидопропилбетаина до безопасных значений для последующей разработки технологии получения эффективного биопрепарата, предназначенного для очистки сточных вод от амфотерных сурфактантов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектами исследования являлись штаммы-деструкторы, приобретенные во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов Национального биоресурсного центра (БРЦ ВКПМ) НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИ-генетика: *Pseudomonas fluorescens* TR (ВКПМ В-4881), *Pseudomonas putida* ТП-19 (В-6582), *Pseudomonas stutzeri* Т (В-4904), *Pseudomonas putida* ТШ-18 (В-2950), *Pseudomonas putida* ТО (В-3959), *Pseudomonas mendocina* 2S (В-4710), *Pseudomonas oleovorans* TF4-1L (В-8621). А также активный ил, полученный с аэротенков действующего предприятия Кемеровской области, амфотерный ПАВ кокамидопропилбетаин (сосоamidopropylbetaine, CAPB) производства Италии.

Для каждого микроорганизма готовили суспензию на основе физиологического раствора (0,9%-й раствор NaCl) с конечной концентрацией 10^7 – 10^8 КОЕ/мл. Далее микроорганизм культивировали при 30 °С в жидкой питательной среде,

приготовленной в соответствии с паспортом штамма, в течение 24 ч. Состав среды, г/л: дрожжевой экстракт – 5,0; пептон – 15,0; NaCl – 5,0; агар – 15,0; вода дистиллированная – 1,0 л.

Численность колоний определяли с помощью денситометра DEN-1 по мутности клеточных суспензий в пределах значения 0,5 единиц Мак-Фарланда ($1 \cdot 10^8$ КОЕ/мл).

Концентрацию, ингибирующую рост микроорганизмов, определяли макрометодом, готовили 10 растворов путем последовательного двукратного разбавления водных растворов ПАВ. Начальная концентрация сурфактанта составила $0,7304$ моль/дм³. В каждую пробирку добавляли суспензию штамма-деструктора по 1 см³. Через 24 ч измеряли светорассеяние при длине волны 980 нм с помощью спектрофотометра UV 1800 (Shimadzu, Япония). Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) соответствовала минимальному содержанию ПАВ в растворе, при котором происходит сдерживание видимого роста тест-культур.

Биоокисление ПАВ проводили в стеклянных колбах объемом 250 см³, помещенных в шейкер-инкубатор LSI-3016A/LSI-3016R (Daihan Labtech, Южная Корея), в условиях постоянной температуры: 30 °С – для чистых культур, 18 °С – для активного ила. Начальная концентрация сурфактанта была выбрана с условием определения минимальной ингибирующей концентрации.

Степень биодеструкции определяли посредством измерения остаточной концентрации ПАВ в растворе. Для этого ежедневно отбирали пробы каждого из образцов, центрифугировали и измеряли значения оптической плотности на фоне натрий-фосфатного буфера в присутствии индикатора – эриохрома черного Т, который образует комплексное соединение с CAPB. На спектрофотометрической кривой раствор комплекса показывал максимум поглощения при длине волны 659 нм [16].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Предварительно было установлено значение минимальной ингибирующей концентрации кокамидопропилбетаина.

Согласно полученным данным, полное подавление роста микроорганизмов штамма *Pseudomonas putida* TO (B-3959) происходило при концентрации сурфактанта свыше $0,0228$ моль/дм³. Активный рост биомассы испытуемого штамма наблюдалось при низких концентрациях (рис. 1). Таким образом, для дальнейших исследований была взята концентрация сурфактанта в 4 раза меньше, чем минимальная ингибирующая концентрация.

Результаты изучения скорости процесса биодеструкции представлены на рис. 2.

Штамм-деструктор должен обладать способностью за минимальный временной интервал

снижать концентрацию сурфактанта до безопасных значений. В ходе эксперимента по биодеструкции ПАВ получены следующие результаты:

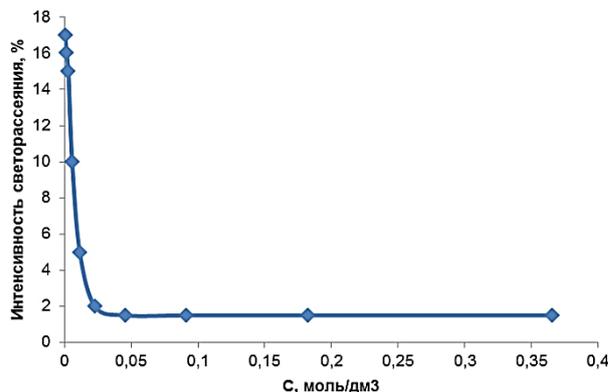


Рис. 1. Зависимость интенсивности рассеяния света от концентрации кокамидопропилбетаина в растворе суспензий штамма *Pseudomonas putida* TO (B-3959)

Fig. 1. Light scattering intensity versus cocamidopropylbetaine concentration in a solution of the *Pseudomonas putida* TO (B-3959) suspensions

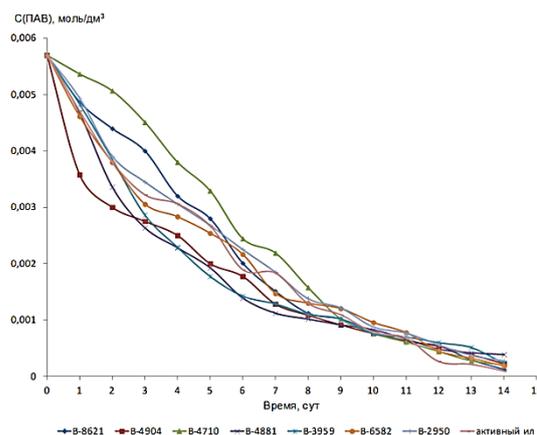


Рис. 2. Зависимость концентрации кокамидопропилбетаина от продолжительности инкубации для исследуемых штаммов рода *Pseudomonas*

Fig. 2. Relationship between the cocamidopropylbetaine concentration and the incubation duration for the studied strains of the genus *Pseudomonas*

штаммы *Pseudomonas stutzeri* T (B-4904) и *Pseudomonas fluorescens* TR (B-4881) продемонстрировали наименьший период полураспада вещества – 2,5 и 2,6 суток соответственно. Несколько большие периоды показали штаммы *Pseudomonas putida* TO (B-3959), *Pseudomonas putida* ТШ-18 (B-2950) и *Pseudomonas oleovorans* TF4-1L (B-8621) – 3,0; 4,5 и 4,9 суток соответственно. Микроорганизмы *Pseudomonas mendocina* 2S (B-4710) и *Pseudomonas putida* ТП-19 (B-6582) – наибольший период полураспада – 5,5 и 6,0 суток соответственно (таблица). Полученные результаты связаны, вероятно, с продолжительностью периода адаптации штаммов-деструкторов к неизвестному ранее субстрату,

Данные исследования скорости процесса биодеструкции кокаמידопропилбетаина чистыми культурами рода *Pseudomonas*

Biodegradation rate of cocamidopropylbetaine by pure cultures of the genus *Pseudomonas*

Параметр	Вид штамма-деструктора рода <i>Pseudomonas</i>						
	B-8621	B-4904	B-4710	B-4881	B-3959	B-6582	B-2950
Концентрация ПАВ, ммоль/дм ³ : начальная	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7
по истечении 14 суток	0,121	0,223	0,203	0,385	0,233	0,182	0,278
Степень разложения ПАВ, %	97,9±1,2	96,4±0,6	96,4±0,8	93,2±0,9	95,9±1,1	96,8±1,3	95,1±0,9
Период полураспада ПАВ $t_{1/2}$, сут.	4,9±0,1	2,5±0,2	5,5±0,4	2,6±0,05	3,0±0,2	6,0±0,3	4,5±0,2

с реакцией на токсическое действие кокаמידопропилбетаина. Немаловажным фактором является и особенность периферийного метаболизма микроорганизмов, то есть осуществление начального этапа метаболизма ксенобиотика. Также нельзя исключать возможность использования микробными клетками внутренних запасов питательных веществ, полученных ими во время активации на классических средах.

Полученные данные подтверждают эффективность использования бактерий рода *Pseudomonas* в качестве деструкторов сурфактантов, поскольку они имеют короткое время генерации, высокую скорость наращивания биомассы по сравнению с бактериями-деструкторами других родов, а также легко культивируются в лабораторных условиях [17, 18].

По истечении 21 суток был выполнен посев всех чистых культур, которые культивировались в стерильном растворе ПАВ без добавления в среду минеральных компонентов. Активный прирост биомассы наблюдался уже в первые сутки эксперимента. Результат посева не показал признаков угнетения жизнедеятельности микроорганизмов ни для одного штамма, и поскольку для всех штаммов единственным источником азота был CAPB, это свидетельствовало, что все испытываемые штаммы способны ассимилировать азот из сурфактанта и практически полностью утилизировать ПАВ за 14 суток. В работе [12] описаны штаммы, утилизирующие CAPB за 29 суток без добавления в среду легкоусвояемого азота, что вдвое дольше, чем утилизация ПАВ штаммами, рассматриваемыми в данной работе.

Параллельно проводили исследования по биодеструкции CAPB активным илом – биоценозом, где симбиотически сосуществуют бактерии и простейшие [19]. Согласно известным данным о составе консорциума, предполагаемыми деструкторами кокаמידопропилбетаина являются бактерии семейства *Pseudomonadaceae* (50–80%), бактерии рода *Mycobacterium* (5–15%), основной функцией которых является окисление углеводов, а также микроорганизмы рода *Bacte-*

rium, к биохимическим особенностям которых относится окисление нефти, нефтепродуктов, фенолов, альдегидов, жирных кислот.

Активный ил показал максимальную степень биодеструкции кокаמידопропилбетаина на 14-е сутки эксперимента, концентрация ПАВ составила 0,91 ммоль/дм³, что соответствует 15,9% от начальной концентрации.

Таким образом, в консорциуме штаммов наблюдалась почти полная деградация CAPB. Однако скорость биодеструкции по сравнению с самыми эффективными штаммами (*Pseudomonas stutzeri* T (B-4904), *Pseudomonas fluorescens* TR (B-4881), *Pseudomonas putida* TO (B-3959)) была ниже. Кроме того, в безазотистой среде первичные биодеструкторы обеспечивают поступление азота как в свой собственный метаболизм, так и в метаболизм своих микробных партнеров, которые обеспечивают вторичную биодеградацию. Известно, что для повышения эффективности биодеградации нефти и нефтепродуктов чаще всего используются смешанные культуры, состоящие из двух и более микроорганизмов [20, 21].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследуемая ассоциация углеводородокисляющих микроорганизмов, а также чистые культуры начали активный рост уже в первые сутки эксперимента без периода адаптации в среде, содержащей кокаמידопропилбетаин в качестве единственного источника углерода и азота. Это свидетельствует о том, что испытываемые штаммы сразу начинают окислять сурфактант. Кроме того, многие *Pseudomonas* наряду с хромосомной ДНК имеют дополнительный генетический материал в виде плазмид биодеградации, которые играют важную роль в адаптации бактерий к изменяющимся условиям окружающей среды.

В результате проведенного исследования отобраны самые эффективные штаммы – деструкторы кокаמידопропилбетаина: *Pseudomonas stutzeri* T (B-4904), *Pseudomonas fluorescens* TR (B-4881), *Pseudomonas putida* TO (B-3959), работа которых характеризуется меньшим пери-

одом адаптации к поллютанту, что является существенным преимуществом для процесса очистки стоков в реальных производственных условиях. Дальнейшие исследования будут

направлены на разработку биодеструктивного препарата сурфактантов, в состав которого будут включены данные штаммы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hamouda T., Myc A., Donovan B., Shih A.Y., Reuter J.D., Baker J.R. A novel surfactant nanoemulsion with a unique non-irritant topical antimicrobial activity against bacteria, enveloped viruses and fungi // *Microbiological Research*. 2001. Vol. 156. Issue 1. P. 1–7. <https://doi.org/10.1078/0944-5013-00069>
2. Reijmar K., Schmidtchen A., Malmsten M. Bactericidal and hemolytic properties of mixed LL-37/surfactant systems // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2007. Vol. 17. Issue 4. P. 293–297. [https://doi.org/10.1016/S1773-2247\(07\)50098-5](https://doi.org/10.1016/S1773-2247(07)50098-5)
3. Salishcheva O.V., Prosekov A.Y. Antimicrobial activity of mono- and polynuclear platinum and palladium complexes // *Foods and Raw Materials*. 2020. Vol. 8. Issue 2. P. 298–311. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2020-2-298-311>
4. Finnerty W.R. Biosurfactants in environmental biotechnology // *Current Opinion in Biotechnology*. 1994. Vol. 5. Issue 3. P. 291–295. [https://doi.org/10.1016/0958-1669\(94\)90031-0](https://doi.org/10.1016/0958-1669(94)90031-0)
5. Souza E.C., Vessoni-Penna T.C., de Souza Oliveira R.P. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview // *International Biodeterioration and Biodegradation*. 2014. Vol. 89. P. 88–94. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.01.007>
6. Shao W., Zhang J., Wang K., Liu C., Cui S. Cocamidopropyl betaine-assisted foam separation of freshwater microalgae *Desmodesmus brasiliensis* // *Biochemical Engineering Journal*. 2018. Vol. 140. P. 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.09.006>
7. Vonlanthen S., Brown M.T., Turner A. Toxicity of the amphoteric surfactant, cocamidopropyl betaine, to the marine macroalga, *Ulva lactuca* // *Ecotoxicology*. 2018. Vol. 20. Issue 1. P. 202–207. <https://doi.org/10.1007/s10646-010-0571-3>
8. Sun X.-X., Han K.-N., Choi J.-K., Kim E.-K. Screening of surfactants for harmful algal blooms mitigation // *Marine Pollution Bulletin*. 2004. Vol. 48. Issue 9-10. P. 937–945. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2003.11.021>
9. Nogales L.M., Jiménez L.L., Abarca L.E., Gil M.M., López-Nieves M. Cocamidopropyl Betaine Surfactant 0.075% Solution in Physiological Serum for Hygiene Process of COVID-19 Intubated Patients // *International Journal of Pharmaceutical Compounding*. 2020. Vol. 24. Issue 5. P. 358–364.
10. Garcia M.T., Campos E., Ribosa I. Biodegradability and ecotoxicity of amine oxide based surfactants // *Chemosphere*. 2007. Vol. 69. Issue 10. P. 1574–1578. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.05.089>
11. Rios F., Lechuga M., Fernandez-Serrano M., Fernandez-Arteaga A. Aerobic biodegradation of amphoteric amine-oxide-based surfactants: effect of molecular structure, initial surfactant concentration and pH // *Chemosphere*. 2017. Vol. 171. P. 324–331. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.070>
12. Mervova M., Zalesak M., Ringlova E., Julinova M., Ruzicka J. Degradation of the surfactant Cocamidopropyl betaine by two bacterial strains isolated from activated sludge // *International Biodeterioration and Biodegradation*. 2018. Vol. 127. P. 236–240. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.12.006>
13. Коршунова Т.Ю., Кузина Е.В., Рафикова Г.Ф., Логинов О.Н. Бактерии рода *Pseudomonas* для очистки окружающей среды от нефтяного загрязнения // *Экобиотех.* 2020. Т. 3, N 1. С. 18–32. <https://doi.org/10.31163/2618-964X-2020-3-1-18-32>
14. Филатов Д.А., Овсянникова В.С., Алтунина Л.К., Сваровская Л.И. Влияние композиций на основе ПАВ на биодеструкцию вязких парафинистых нефтей // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2012. N 1(2). С. 106–112.
15. Закиров Р.К., Ахмадуллина Ф.Ю., Балымова Е.С. Перспективы сонохимической обработки сточных вод, содержащих синтетические поверхностно-активные вещества // *Теоретическая и прикладная экология*. 2020. N 4. С. 111–116. <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2020-4-111-116>
16. Gholami A., Golestaneh M., Andalib Z. A new method for determination of cocamidopropyl betaine synthesized from coconut oil through spectral shift of Eriochrome Black T // *Spectrochimica Acta – Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2018. Vol. 192. P. 122–127. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.11.007>
17. Asabina E.A., Chetverikov S.P., Loginov O.N. Optimization of biosynthesis of phytopathogen growth inhibitors by bacteria of *Pseudomonas* genus // *Biotechnology in Russia*. 2009. Issue 3. P. 81–89.
18. Анохина Т.О., Сиунова Т.В., Сизова О.И., Захарченко Н.С., Кочетков В.В. Ризосферные бактерии рода *Pseudomonas* в современных агробиотехнологиях // *Агрохимия*. 2018. N 10. С. 54–66. <https://doi.org/10.1134/S0002188118100034>
19. Сибиева Л.М., Дегтярева И.А., Сироткин А.С., Бабынин Э.В. Состав микробного сообщества активного ила в процессах совместной биологической и реагентной очистки сточных вод // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2019. Т. 9. N 2. С. 302–312. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-2-302-312>
20. Кобзев Е.Н., Петрикевич С.Б., Шкидченко А.Н. Исследование устойчивости ассоциации микроорганизмов-нефтедеструкторов в открытой системе // *Прикладная биохимия и микробиоло-*

гия. 2001. Т. 37. N 4. С. 413–417.

21. Шкидченко А.Н., Аринбасаров М.У. Изучение нефтеструктивной активности микро-

флоры прибрежной зоны Каспийского моря // Прикладная биохимия и микробиология. 2002. Т. 38. N 5. С. 509–512.

REFERENCES

1. Hamouda T, Myc A, Donovan B, Shih AY, Reuter JD, Baker JR. A novel surfactant nanoemulsion with a unique non-irritant topical antimicrobial activity against bacteria, enveloped viruses and fungi. *Microbiological Research*. 2001;156(1):1–7. <https://doi.org/10.1078/0944-5013-00069>
2. Reijmar K, Schmidtchen A, Malmsten M. Bactericidal and hemolytic properties of mixed LL-37/surfactant systems. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2007;17(4):293–297. [https://doi.org/10.1016/S1773-2247\(07\)50098-5](https://doi.org/10.1016/S1773-2247(07)50098-5)
3. Salishcheva OV, Prosekov AY. Antimicrobial activity of mono- and polynuclear platinum and palladium complexes. *Foods and Raw Materials*. 2020;8(2):298–311. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2020-2-298-311>
4. Finnerty WR. Biosurfactants in environmental biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*. 1994;5(3):291–295. [https://doi.org/10.1016/0958-1669\(94\)90031-0](https://doi.org/10.1016/0958-1669(94)90031-0)
5. Souza EC, Vessoni-Penna TC, de Souza Oliveira RP. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 2014;89:88–94. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.01.007>
6. Shao W, Zhang J, Wang K, Liu C, Cui S. Cocamidopropyl betaine-assisted foam separation of freshwater microalgae *Desmodesmus brasiliensis*. *Biochemical Engineering Journal*. 2018;140:38–46. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.09.006>
7. Vonlanthen S, Brown MT, Turner A. Toxicity of the amphoteric surfactant, cocamidopropyl betaine, to the marine macroalga, *Ulva lactuca*. *Ecotoxicology*. 2018;20(1):202–207. <https://doi.org/10.1007/s10646-010-0571-3>
8. Sun X-X, Han K-N, Choi J-K, Kim E-K. Screening of surfactants for harmful algal blooms mitigation. *Marine Pollution Bulletin*. 2004;48(9-10):937–945. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2003.11.021>
9. Nogales LM, Jiménez LL, Abarca LE, Gil MM, López-Nieves M. Cocamidopropyl Betaine Surfactant 0.075% Solution in Physiological Serum for Hygiene Process of COVID-19 Intubated Patients. *International Journal of Pharmaceutical Compound*. 2020;24(5):358–364.
10. Garcia MT, Campos E, Ribosa I. Biodegradability and ecotoxicity of amine oxide based surfactants. *Chemosphere*. 2007;69(10):1574–1578. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.05.089>
11. Rios F, Lechuga M, Fernandez-Serrano M, Fernandez-Arteaga A. Aerobic biodegradation of amphoteric amine-oxide-based surfactants: effect of molecular structure, initial surfactant concentration and pH. *Chemosphere*. 2017;171:324–331. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.070>
12. Merkova M, Zalesak M, Ringlova E, Julinova M, Ruzicka J. Degradation of the surfactant Cocamidopropyl betaine by two bacterial strains isolated from activated sludge. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 2018;127:236–240. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.12.006>
13. Korshunova TYu, Kuzina EV, Rafikova GF, Loginov ON. Using *pseudomonas* for cleaning the environment from oil contamination. *Ecobiotech = Ekobiotech*. 2020;3(1):18–32. (In Russian) <https://doi.org/10.31163/2618-964X-2020-3-1-18-32>
14. Filatov DA, Ovsyannikova VS, Altunina LK, Svarovskaya LI. The effect of surfactant-based systems on biodestruction of viscous waxy oils. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2012;1:106–112. (In Russian)
15. Zakirov RK, Akhmadullina FY, Balymova ES. Prospects for sonochemical treatment of wastewater containing synthetic surfactants. *Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya = Theoretical and Applied Ecology*. 2020;4:111–116. (In Russian) <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2020-4-111-116>
16. Gholami A, Golestaneh M, Andalib Z. A new method for determination of cocamidopropyl betaine synthesized from coconut oil through spectral shift of Eriochrome Black T. *Spectrochimica Acta – Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2018;192:122–127. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.11.007>
17. Asabina EA, Chetverikov SP, Loginov ON. Optimization of biosynthesis of phytopathogen growth inhibitors by bacteria of *Pseudomonas* genus. *Biotechnology in Russia*. 2009;3:81–89.
18. Anokhina TO, Siunova TB, Sizova OI, Zakharchenko NS, Kochetkov VV. Rhizospheric bacteria of the genus *Pseudomonas* in modern agrobiotechnology. *Agrokhimiya*. 2018;10:54–66. (In Russian) <https://doi.org/10.1134/S0002188118100034>
19. Sibieva LM, Degtyareva IA, Sirotkin AS, Babynin EV. Composition of activated sludge microbial community used in the combined biological and chemical wastewater treatment. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2019;9(2):302–312. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-2-302-312>
20. Kobzev EN, Petrikevich SB, Shkidchenko AN. Study of the stability association of oil-degrading microorganisms in an open system. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya = Applied Biochemistry and Microbiology*. 2001;37(4):413–417.
21. Shkidchenko AN, Arinbasarov MU. Study of petroleum-degrading activity of microflora from the

shoreline region of the Caspian sea. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya = Applied Biochemistry*

and Microbiology 2002;38(5):509-512. (In Russian)

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Бурлаченко Анастасия Сергеевна,
Кемеровский государственный университет,
650000, г. Кемерово, ул. Красная, 6,
Российская Федерация,
e-mail: nastya_sergeevna99@mail.ru

Салищева Олеся Владимировна,
к.х.н., доцент, доцент кафедры общей
и неорганической химии,
Кемеровский государственный университет
650000, г. Кемерово, ул. Красная, 6,
Российская Федерация,
✉ e-mail: salishchevaov@mail.ru

Дышлюк Любовь Сергеевна,
к.б.н., доцент кафедры бионанотехнологии,
Кемеровский государственный университет,
650000, г. Кемерово, ул. Красная, 6,
Российская Федерация,
e-mail: soldatovals1984@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 02.06.2021.
Одобрена после рецензирования 28.06.2021.
Принята к публикации 30.08.2021.*

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Anastasia S. Burlachenko,
Kemerovo State University,
6, Krasnaya Str., Kemerovo, 650000,
Russian Federation,
e-mail: nastya_sergeevna99@mail.ru

Olesya V. Salishcheva
Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Department of General and Inorganic Chemistry,
Kemerovo State University,
6, Krasnaya Str., Kemerovo, 650000,
Russian Federation,
✉ e-mail: salishchevaov@mail.ru

Lyubov S. Dyshlyuk,
Cand. Sci. (Biology), Associate Professor,
Department of Bionanotechnology,
Kemerovo State University,
6, Krasnaya Str., Kemerovo, 650000,
Russian Federation,
e-mail: soldatovals1984@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 02.06.2021.
Approved after reviewing 28.06.2021.
Accepted for publication 30.08.2021.*

Оригинальная статья / Original article

УДК 633.85: 663.437: 664.649

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-449-459>



Динамика макронутриентов в процессе кратковременного проращивания семян льна

© И.Э. Миневич*, А.П. Нечипоренко**, А.А. Гончарова*, В.Е. Ситникова**

*Федеральный научный центр лубяных культур, г. Тверь, Российская Федерация

**Национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

Резюме: Проращивание является экологичным и доступным способом для максимальной реализации биохимического потенциала растительного пищевого сырья. В результате биоактивации собственной ферментной системой происходит увеличение водорастворимых белковых фракций, накопление свободных аминокислот и жирных кислот, а также легкорастворимых редуцирующих сахаров, что приводит к повышению пищевой ценности сырья и улучшению функциональных свойств заключенного в нем белка. В качестве сырья использовали семена льна как источник эссенциальных полиненасыщенных жирных кислот, пищевых волокон, полноценного белка, полипептидов и лигнанов, которые поддерживают важнейшие физиологические функции организма человека. Цель работы состояла в исследовании динамики макронутриентов в процессе кратковременного проращивания семян льна химическими и спектроскопическими методами. Проращивание семян льна проводили в лабораторных условиях в специальных поддонах при температуре 18–20 °С. Семена проращивали в течение 5 суток при периодическом увлажнении. Были представлены визуальные изменения, происходящие с семенами льна на всех стадиях кратковременного проращивания. Показана периодичность в изменениях основных макронутриентов семян льна. Был сделан вывод, что в исследуемый период проращивания еще не протекает основной гидролитический распад запасных белков, приводящий к безвозвратному снижению, прежде всего, содержания белков и белкового азота. На основании изменения содержания липидов и кислотного числа, интенсивности пиков функциональных групп в области липидов, в частности полосы 1748 см⁻¹ валентных колебаний С=О-групп жирных кислот, предположено отсутствие расщепления запасных липидов на раннем этапе проращивания. Показано накопление растворимых веществ в исследуемый период проращивания, в том числе водорастворимых белковых соединений, а также водорастворимых полисахаридов и продуктов их гидролитического расщепления. Пророщенные семена льна являются ценным ингредиентом для создания продуктов здорового питания.

Ключевые слова: семена льна, белки, макронутриенты, ненасыщенные жирные кислоты, кратковременное проращивание, ИК-спектроскопия, ограниченный гидролиз

Для цитирования: Миневич И.Э., Нечипоренко А.П., Гончарова А.А., Ситникова В.Е. Динамика макронутриентов в процессе кратковременного проращивания семян льна. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2021. Т. 11. N 3. С. 449–459. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-449-459>

Dynamics of macronutrients during short-term germination of flax seeds

Irina E. Minevich*, Alla P. Nechiporenko**, Agatha A. Goncharova*, Vera E. Sitnikova

*Federal Scientific Center for Fiber Crops, Tver, Russian Federation

**National Research University of Information Technology, Mechanics and Optic, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract: Germination is an environmentally friendly and convenient approach to enhancing the biochemical potential of food plant raw materials. The nutritional value of raw materials and the functional properties of protein contained therein can be significantly improved by activating the inherent enzyme system. Bioactivation not only increases the amount of water-soluble protein fractions, but also promotes accumulation of free amino and fatty acids and easily soluble reducing sugars. We used flax seeds as a source of essential polyunsaturated fatty acids, dietary fibres, complete protein, polypeptides and lignans to support the most important physiological functions of the human body. The aim was to study the dynamics of macronutrients in the process of short-term germination of flax seeds by chemical and spectroscopic methods. Flax seeds were germinated in laboratory conditions in special trays at a temperature of 18–20 °C for 5 days with perio-

dic moistening. Visual changes occurring in flax seeds at all stages of short-term germination are demonstrated. The periodicity of changes in the main macronutrients of flax seeds is shown. It is concluded that, during the studied period of germination, the principal hydrolytic decomposition of seed storage proteins was incomplete, leading to a permanent decrease, first of all, in the content of proteins and protein nitrogen. Based on the changes in the lipid content and acid number, the intensity of the peaks associated with functional groups in the lipid region, in particular, the band at 1748 cm^{-1} assigned to stretching vibrations of C=O groups of fatty acids, no degradation of storage lipids at an early stage of germination was assumed. The accumulation of soluble substances during the studied germination period is demonstrated, including water-soluble protein compounds, as well as water-soluble polysaccharides and products of their hydrolytic degradation. Sprouted flax seeds are a valuable ingredient for producing healthy foods.

Keywords: flax seeds, proteins, macronutrients, unsaturated fatty acids, short-term germination, IR spectroscopy, limited hydrolysis

For citation: Minevich IE, Nechiporenko AP, Goncharova AA, Sitnikova VE. Dynamics of macronutrients during short-term germination of flax seeds. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(3):449–459. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-449-459>

ВВЕДЕНИЕ

Использование биологически активного растительного сырья для создания продуктов здорового питания является в последние годы одним из трендов коррекции пищевого статуса населения. Значимость этого направления как фактора профилактики алиментарно-зависимых заболеваний подтверждена в «Стратегии повышения качества пищевой продукции в Российской Федерации до 2030 года», (утвержденной распоряжением Правительства Российской Федерации от 29.06.2016 г. № 1364-р). Под термином «здоровое питание», в соответствии с Федеральным законом № 29, понимается питание, обеспечивающее рост, нормальное развитие и жизнедеятельность человека, отвечающее требованиям безопасности¹.

Исходя из принятого определения, пищевые продукты стали рассматривать как эффективное средство поддержания физического и психического здоровья, профилактики многих заболеваний. Большое значение для расширения ассортимента продуктов здорового питания имеет выбор сырья.

Для максимальной реализации потенциала растительного сырья широко используют биологические методы, которые условно можно разделить на три группы по способу модификации сырья:

- под действием микрофлоры;
- под действием внесенных извне ферментных препаратов;
- под действием собственных ферментных, преимущественно катаболических, систем [1].

В частности, биоактивация семян (зерна) проращиванием позволяет активизировать их ферментную систему. В результате протекания биохимических процессов в семенах происходит увеличение водорастворимых белковых фрак-

ций, накопление свободных аминокислот и жирных кислот, а также легкорастворимых редуцирующих сахаров, что приводит к повышению пищевой ценности сырья и улучшению функциональных свойств заключенного в нем белка [2–6]. Проращивание приводит также к деградации антиалиментарных факторов – α -галактозидных олигосахаридов, ингибиторов панкреатических протеиназ и липазы, фитогемагглютининов, таннидов, фитатов, цианогенных гликозидов [1, 6–10]. Ферментативная модификация семян и зерна способствует повышению их биологической активности за счет появления продуктов гидролитического распада биополимеров (белков, углеводов) – физиологически активных пептидов, моно- и олигосахаридов, нуклеотидов и пр. – потенциальных экзорегуляторов метаболизма. Например, олигосахариды оказывают регулирующее действие на микрофлору, многие из них являются бифидогенными факторами [11]. Так, пророщенные семена сои характеризуются улучшенными органолептическими свойствами: запахом и вкусом, в них определено значительное увеличение содержания сапонина, эстрогенных соединений и почти всех фитостероинов, особенно бета-ситостерина [6].

Изучение физиологических и протеомных изменений в зародыше и эндосперме во время проращивания семян позволило авторам работы [12] выявить сложные метаболические сети, участвующие в прорастании семян пшеницы (*Triticum aestivum* L.). Было установлено, что наибольшие протеомные изменения происходили в зародыше через 24 ч после набухания семян. Полученные данные позволяют по-новому взглянуть на молекулярные механизмы проращивания семян.

Была показана роль эндосперма в поддержке роста зародыша: он снабжает его питательными веществами, защищает зародыш и контролирует

¹О качестве и безопасности пищевых продуктов: федер. закон РФ от 02.01.2000 г. № 29-ФЗ (ред. от 13.07.2020 г.)

рост зародыша, действует как механический барьер во время развития и прорастания семян. Его структура и функция в зрелых сухих семенах различны и специфичны для разных видов культур [13]. Последние достижения в биологии семян показали, что эндосперм способен воспринимать сигналы окружающей среды, а также производить и секретировать сигналы, регулирующие рост зародыша. Таким образом, прорастание – системная реакция, включающая двуправленные взаимодействия между зародышем и эндоспермом.

Несмотря на исследования и значимые результаты в области биохимии прорастания семян, научный и практический интерес к этим процессам не ослабевает. В настоящее время на основе пророщенных зерновых культур в промышленности выпускаются хлопья, сухие завтраки, различные виды хлеба и мучных кондитерских изделий повышенной пищевой ценности. Расширяется ассортимент сырья, пищевую и биологическую ценность которого повышают путем проращивания. При этом практическое значение имеет определение продолжительности процесса, при котором конкретное сырье обладает повышенной биологической активностью за счет накопления продуктов гидролитического расщепления биополимеров. В связи с этим актуальны исследования динамики макроэлементов конкретного сырья в процессе проращивания.

Перспективным сырьем для биоактивации путем проращивания являются семена льна. Семена льна являются источником основных функциональных пищевых ингредиентов и биологически активных веществ, оказывающих благотворное влияние на организм человека. Они богаты эссенциальными полиненасыщенными жирными кислотами, пищевыми волокнами, полноценным белком, полипептидами и лигнанами, относящимся к классу фитоэстрогенов, которые поддерживают важнейшие физиологические функции организма человека [14, 15]. В настоящее время их используют в качестве функционального ингредиента для корректировки химического состава и пищевой ценности продуктов [16–18].

Цель работы состояла в исследовании динамики макроэлементов в процессе кратковременного проращивания семян льна химическими и спектроскопическими методами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектами исследования в данной работе являлись семена льна масличного (*Linum usitatissimum* L.) 2018 года производства. Пророщенные семена льна имели следующие характеристики: содержание, %: белка – 21,77; жира – 42,96; влаги – 3,65; зольность – 4,25%.

Определение параметров семян льна проводили на базе лаборатории переработки лубяных культур Федерального научного центра лубяных культур перед проведением проращивания.

Проращивание семян льна проводили в лабораторных условиях в специальных поддонах при температуре 18–20 °С при соотношении вода : семена 2 : 1. Семена проращивали в течение 5 суток при периодическом увлажнении.

Проросшие семена льна имели проростки длиной от 2 до 5 мм. Процесс проращивания семян прекращали сушкой до влажности семян не более 5%. Отбор проб пророщенных семян проводили каждые сутки. Продукты хранили при температуре 4 °С.

В работе определяли: кислотное число (ГОСТ 31700-2012), масличность (ГОСТ 10857-64), содержание белка (ГОСТ 10846-91), влажность (ГОСТ 10856-96), зольность (ГОСТ 10847-2019).

Фракционный состав белкового комплекса исходных и пророщенных семян льна определяли по методу Ермакова²: последовательной экстракцией дистиллированной водой, 7%-м раствором NaCl и 0,1 М раствором NaOH. Осаждение белков производили 5%-м раствором CCl_3COOH .

Колебательные спектры образцов (32 скана) получали методом ИК-спектроскопии НПВО (нарушенного полного внутреннего отражения) на спектрометре Tensor 37 (Bruker, Германия) с алмазным НПВО-элементом, управляемым программным пакетом OPUS со стандартными градуировочными возможностями, в диапазоне частот 4000–600 cm^{-1} в формате поглощения.

Белокполисахаридные комплексы (БПС) получали путем проведения водной экстракции измельченных семян льна (исходных и пророщенных) при следующих условиях: гидромодуль – 15; температура, T – 50 °С; продолжительность – 1 ч. Из экстракта БПС комплексы выделяли осаждением трехкратным избытком изопропилового спирта. Полисахаридные (ПС) комплексы получали путем проведения водной экстракции цельных семян льна (исходных и пророщенных) аналогично БПС. Целевые продукты сушили в микроволновой печи LG Intellowave (MS-1724U) при мощности печи 500 Вт в течение 1–3 мин.

Анализы проводили в 3-кратной повторности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно проведенным на сегодняшний день исследованиям представляется, что прорастание семян в общем виде запускается двумя основными процессами – активизацией метаболического аппарата и началом обмена веществ в результате поступления в семя воды. При увлажнении семян сразу же начинается их набухание, затем происходит активизация и синтез

²Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П. Методы биохимического исследования растений. 3-е изд., перераб. и доп. Л.: Агропромиздат, 1987. 430 с.

ферментов, определяющих начало гидролитических процессов. Эти и другие процессы (увеличение содержания осмотически активных веществ, подкисление оболочек клеток и др.) создают предпосылки для начала роста зародыша. На следующем этапе начинается рост зародышевых осей и выход корешка. При этом сначала используются собственные питательные вещества, а затем происходит мобилизация питательных веществ запасяющих органов (семядолей или эндосперма).

Визуальные изменения, происходящие в процессе кратковременного проращивания семян льна, представлены на рис. 1. Активное поглощение воды, набухание коллоидов, создание высокого осмотического давления внутри клеток, которое обусловлено растворимыми внутриклеточными веществами, приводит к увеличению объема семени. В среднем объем набухшего семени в 1,5 раза больше исходного. За 5 суток семена льна прошли все начальные этапы прорастания – от набухания до роста проростков.

Благодаря высокой влажности некоторые вещества семени (углеводы – сахара, пентозаны; азотистые и минеральные вещества) переходят в растворимое состояние и частично диффундируют в воду. Это способствует оживлению зародыша, который для своей жизнедеятельности начинает активно использовать по-

явившиеся растворимые и легко усваиваемые питательные вещества. Активизирующиеся гидролитические ферменты диффундируют в эндосперм, где начинают катализировать гидролиз части высокомолекулярных веществ и превращают их в растворимые соединения. С поглощением воды зародыш начинает потреблять накопленные в нем сахара и свободные аминокислоты еще до того, как соответствующие ферменты поступят в эндосперм и путем гидролиза дадут новые порции питательных веществ зародышу. Этим можно объяснить периодичность изменений показателей семян льна.

В табл. 1 представлены характеристики прорастающих семян льна, которые определяли каждые сутки.

Все изменения в семенах льна свидетельствуют о периодичности происходящих процессов в прорастающих семенах. В результате резкого повышения влажности (с 3,8 до 51,3%) запускаются процессы гидролиза азотистых соединений, особенно белков, до свободных аминокислот, которые затем расходуются на создание новых белковых соединений. Этим можно объяснить колебания показателя содержания общего азота при проращивании семян льна в первые пять суток. На каждой стадии прорастания протекают процессы, связанные с изменением состава и состояния питательных веществ в семени.

Этап проращивания	Время проращивания, сут.	Вид семян		
Исходный	0			
Набухание	1, 2			
Проклевывание	3, 4			
Рост проростков	5			

Рис. 1. Семена льна при кратковременном проращивании

Fig. 1. Flax seed during short-time germination

Таблица 1. Характеристика семян льна в процессе проращивания

Table 1. Characteristics of flax seeds during germination

Наименование образца	Продолжительность проращивания, сут.	Показатель				
		Общий азот, N, %	Сырой протеин, N*6,25, %	Масличность, %	Кислотное число, мг КОН на 1 г масла	Влажность, %
Исходные семена	0	3,48±0,17	21,77±1,09	42,96±2,15	3,14±0,16	3,80±0,19
ПР1	1	3,70±0,18	22,72±1,14	42,30±2,11	3,05±0,15	51,30±2,56
ПР2	2	4,57±0,23	28,56±1,43	32,00±1,60	3,26±0,16	54,10±2,71
ПР3	3	3,47±0,17	21,69±1,08	46,05±2,30	3,29±0,16	52,90±2,65
ПР4	4	4,28±0,21	26,75±1,34	29,82±1,49	3,26±0,16	57,27±2,86
ПР5	5	3,61±0,18	22,55±1,13	40,45±2,02	3,15±0,16	54,00±2,70

Содержание жира и значения кислотного числа также подвержены колебаниям в исследуемом временном интервале проращивания (см. табл. 1). Распад жиров, в отличие от протеолиза белков, является более сложным многостадийным процессом [19]. При проращивании масличных семян основным обменным процессом считается превращение липидов в сахара: протекает гидролиз триглицеридов с образованием свободных жирных кислот и глицерина, который через последовательность реакций гликолиза превращается в сахара. Однако на ранних стадиях проращивания липиды не подвергаются расщеплению, так как участвуют в других метаболических процессах [2]. Непосредственно расщепление запасного жира начинается после 4-х дней проращивания, а после 8-ми дней происходит максимальное его расходование³ [2, 19].

Анализ полученных нами результатов свидетельствует, что кислотное число в своем максимальном значении (на 3-й день проращивания) повышалось незначительно, на 4,78% (см. табл. 1). В этом случае повышение кислотного числа обусловлено, вероятно, гидролитическими процессами, протекающими в зародыше. Максимальное снижение масличности на 30,59% на 4-й день проращивания коррелировало с механизмом проращивания, описанным А.Б. Дьяковым [19]. Следует отметить, что биологическая ценность липидов в процессе кратковременного проращивания семян остается неизменной. Об этом свидетельствуют данные авторов работ [5, 20, 21], которые показали, что жирнокислотный профиль семян льна не изменялся в интервале 1, 4 и 8 суток проращивания.

На рис. 2 и 3 представлены ИК-спектры пророщенных семян льна и фрагменты протеиновой и углеводной областей этих ИК-спектров (обозначение образцов приведено в соответствии с указанными в табл. 1).

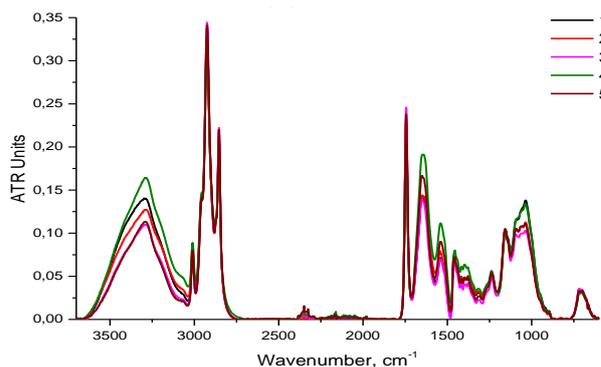


Рис. 2. ИК спектры пророщенных семян льна: 1 – ПР1; 2 – ПР2; 3 – ПР3; 4 – ПР4; 5 – ПР5

Fig. 2. IR spectra of germinated flax seeds: 1 – PR1; 2 – PR2; 3 – PR3; 4 – PR4; 5 – PR5

Структурированные полосы в белковой ($1700\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$) и углеводных областях ($1150\text{--}1030\text{ cm}^{-1}$) свидетельствуют, предположительно, о соединениях с разной длиной цепи, образующихся в результате гидролиза прежде всего белков, полипептидов и полисахаридов. Особенно выделяется структурированность в углеводной области, что, вероятно, можно объяснить разнообразием поли- и олигосахаридных структур. Интенсивные полосы в области $2950\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$ обязаны проявлению валентных асимметричных и симметричных колебаний C-H -групп преимущественно липидных и полисахаридных структур. Интенсивная полоса 1748 cm^{-1} валентных колебаний C=O -групп жирных кислот также подтверждает наличие значительного количества липидных компонентов. Присутствие полос 3008 и 722 cm^{-1} , характерных соответственно для валентных и деформационных колебаний C-H -групп при двойной связи $\text{C}=\text{C}$, свидетельствует о наличии в составе липидных компонентов ненасыщенных жирных кислот.

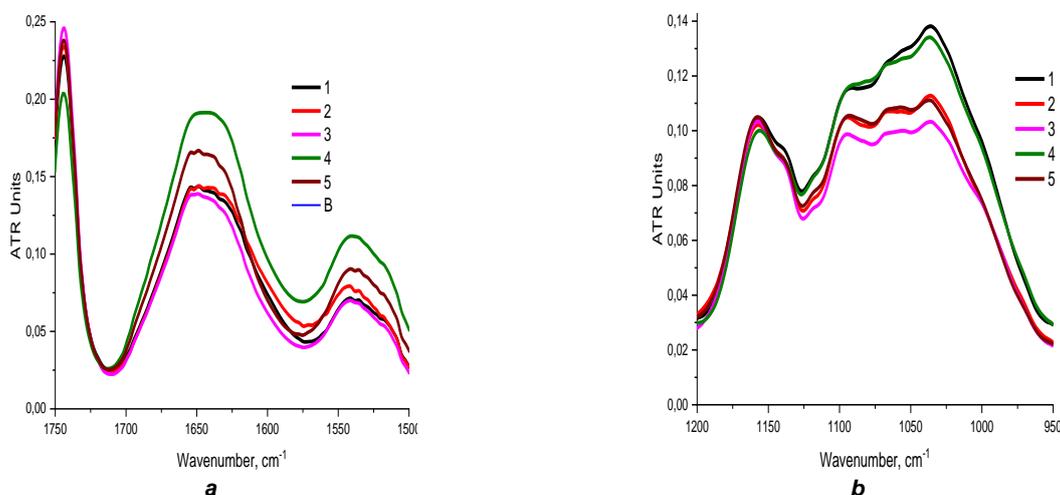


Рис. 3. Фрагменты протеиновой (а) и углеводной областей (б) ИК-спектров, представленных на рис. 2

Fig. 3. Fragments of the protein (a) and carbohydrate regions (b) of the IR spectra in Fig. 2

Таким образом, на представленных ИК-спектрах исследуемых семян льна (рис. 2 и 3) хорошо видны изменения расположения, интенсивности и формы основных функциональных групп, характеризующих белковый, углеводный и липидный комплексы.

Периодичность происходящих процессов отражается на изменении интенсивности пиков основных полос функциональных групп в зависимости от продолжительности проращивания, которые представлены на рис. 4. Интенсивно протекают процессы расщепления белковых и полисахаридных веществ. Периодичность в изменении интенсивности полос ИК-спектров функциональных групп белков, углеводов и общих липидов в общем коррелирует с данными химического анализа (см. таб. 1).

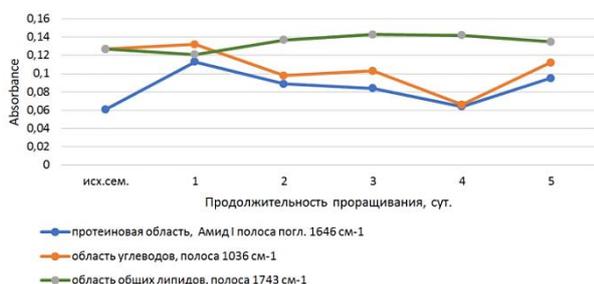


Рис. 4. Изменение интенсивности пиков основных полос, характеризующих функциональные группы белков, углеводов и липидов

Fig. 4. Change in the peaks intensity of the main bands characterizing the functional groups of proteins, carbohydrates and lipids

Набухание, гидролитические процессы, протекающие на стадиях проращивания, способствуют увеличению водорастворимых веществ, о содержании которых судили по результатам проведения водной экстракции исследуемых семян льна. Изменение сухого остатка водного экстракта в процессе проращивания семян льна представлено на рис. 5.

Как следует из полученных данных, резкого повышения количества водорастворимых веществ не наблюдается, идет плавное повышение с незначительными колебаниями. На 3-и сутки проращивания было определено максимальное количество

водорастворимых веществ в экстракте в исследуемом периоде времени.

Из водных экстрактов измельченных семян избытком изопропилового спирта осаждали белкополисахаридные комплексы (БПС). Результаты определения выхода и содержания в них белка представлены в табл. 2. Изменение содержания белка в комплексах БПС свидетельствует, что с увеличением продолжительности проращивания повышалось количество водорастворимых белковых веществ. При этом содержание водорастворимых белков в БПС возросло с 36,28 до 59,00% на 3-и сутки проращивания и до 65,50% – на 5-ые сутки проращивания.

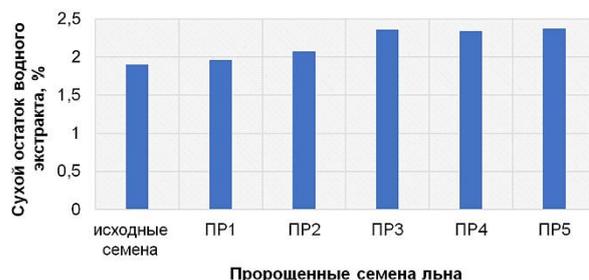


Рис. 5. Сухой остаток водных экстрактов семян льна при различных сроках проращивания, сут.: ПР1 – 1; ПР2 – 2; ПР3 – 3; ПР4 – 4; ПР5 – 5

Fig. 5. Dry residue of water extracts of flax seeds at different periods of germination, day: ПР1 – 1; ПР2 – 2; ПР3 – 3; ПР4 – 4; ПР5 – 5

Об изменении различных форм азотистых соединений в процессе проращивания семян льна судили по содержанию небелкового азота (рис. 6). Колебания в содержании небелкового азота позволяют предположить синтез аминокислот за счет гидролиза белков и активное потребление азотистых веществ зародышем.

В мобилизации белковых резервов участвуют многочисленные ферментные системы, различающиеся по специфичности к субстрату. При ограниченном протеолизе запасных белков от них отщепляется небольшое число низкомолекулярных пептидов, после чего белки становятся доступны действию протеаз [22, 23]. При этом

Таблица 2. Характеристика белкополисахаридных комплексов

Table 2. Characterization of protein-polysaccharide complexes

Продолжительность проращивания, сут.	Образец БПС	Выход БПС комплекса, %	Содержание белка в БПС комплексе, %
0	БПС 0	11,55±0,58	36,28±1,81
1	БПС 1	14,72±0,74	54,08±2,70
2	БПС 2	16,52±0,83	55,07±2,75
3	БПС 3	19,58±0,98	59,09±2,95
4	БПС 4	14,97±0,75	54,87±2,74
5	БПС 5	15,80±0,79	65,50±3,27

³Щербаков В.Г., Лобанов В.Г., Прудникова Т.Н., Федорова С.А. Биохимия растительного сырья: учебник для студентов вузов. М.: Колос, 1999. 376 с.



Рис. 6. Динамика общего и небелкового азота в семенах льна в процессе проращивания

Fig. 6. Dynamics of total and non-protein nitrogen in flax seeds during germination

считается, что ограниченный протеолиз протекает под действием SH-зависимой кислой эндопептидазы. Последующая гидролитическая фаза протекает при быстром росте проростка. К этому времени начинается активная мобилизация белков в запасующих органах семян и энергичный переток азотистых соединений из семядолей или других запасующих органов к растущим осевым частям. В ходе прорастания семян запасные белки распадаются до низкомолекулярных пептидов и аминокислот. Их соотношение определяется активностью различных ферментов и скоростью оттока продуктов гидролиза из запасующих тканей [23].

Исходя из анализа полученных данных, можно предположить, что в исследуемом интервале проращивания семян льна на фоне образования новых белков, сопровождающих рост проростков, не виден гидролитический распад белков, характеризующийся продолжительным (безвозвратным) снижением содержания белков и белкового азота. Соотношение белковых фракций в этот исследуемый период проращивания изменялось, как это показано на рис. 7.

Исходные семена характеризовались преобладающим содержанием глобулинов, и уже в первые сутки проращивания эта солерастворимая белковая фракция резко увеличивалась, а при всех колебаниях была наибольшей по сравнению с другими фракциями в исследуемый период. На рис. 8 представлены ИК-спектры белковых фракций пророщенных семян.

Протеиновые фракции пророщенных семян льна выделяли из растворов трихлоруксусной кислотой (ТХУК), которая является специфическим реагентом на белки. ТХУК необратимо осаждает белки, оставляя в растворе продукты их деструкции – полипептиды.

Во всех белковых фракциях помимо основных классических полос Амид I и Амид II присутствуют полосы, соответствующие липидным и углеводным фрагментам. Классические дуплеты Амид I и Амид II в протеиновой области ИК-спектров (1700–1500 см⁻¹) у белковых фракций

пророщенных семян отличаются различной интенсивностью. В составе белковых фракций присутствуют различные липидные, поли- и олигосахаридные фрагменты: область 2950–2850; 1748; 1300–1030 см⁻¹. При этом спектр щелочерастворимой фракции отличается интенсивностью и формой полос.

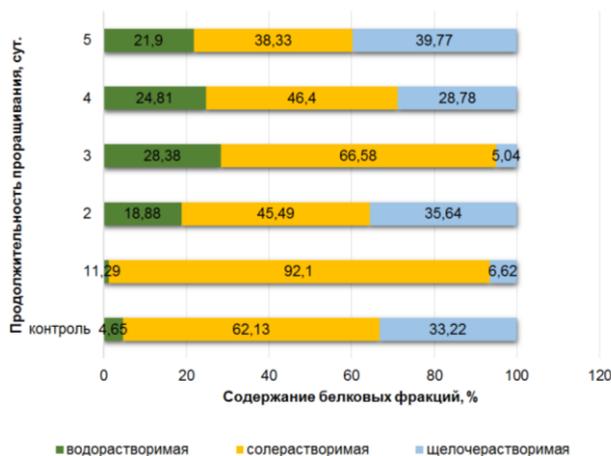


Рис. 7. Изменение фракционного состава белкового комплекса семян льна на ранних стадиях проращивания

Fig. 7. Changes in the fractional composition of the protein complex of flax seeds at the early stages of germination

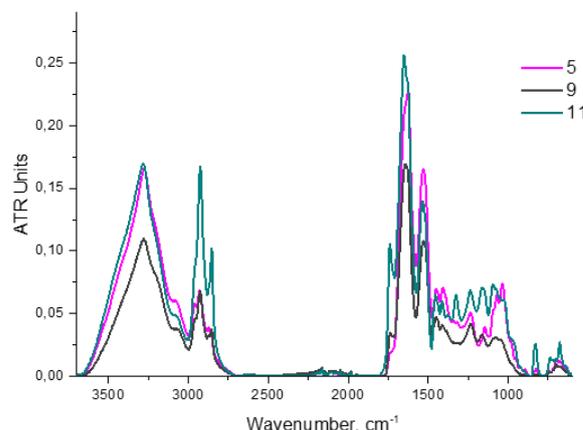


Рис. 8. ИК-спектры белковых фракций пророщенных семян льна:

5 – водорастворимая; 9 – солерастворимая; 11 – щелочерастворимая

Fig. 8. IR spectra of protein fractions of germinated flax seeds:

5 – water-soluble fraction; 9 – salt-soluble fraction; 11 – alkali-soluble fraction

С целью изучения изменений в полисахаридном составе семян льна в процессе проращивания определяли сумму полисахаридов (СумПС) и содержание в них высокомолекулярной фракции (ВМФр). Результаты исследований представлены в табл. 3. Полисахариды выделяли из водных экстрактов неразрушенных цельных семян льна (исходных и пророщенных) осаждением избытком изопропилового спирта.

Таблица 3. Сумма полисахаридов и содержание высокомолекулярной фракции относительно суммы полисахаридов в исходных и пророщенных семенах льна

Table 3. Polysaccharides sum and the content of the high molecular weight fraction relative to the polysaccharides sum in the original and germinated flax seeds

Продолжительность проращивания, сут.	Сухой остаток водного экстракта*, %	СумПС, %	ВМфр, %
Контроль	1,18±0,06	2,95±0,15	55,50±2,77
2	1,35±0,07	5,07±0,25	64,37±3,22
3	1,44±0,07	6,30±0,31	64,81±3,24
4	1,49±0,07	7,90±0,40	47,83±2,39
5	1,80±0,09	9,18±0,46	41,97±2,10

*Водный экстракт цельных (неизмельченных) семян.

С увеличением продолжительности проращивания протекают гидролитические процессы, способствующие повышению содержания водорастворимых веществ, в том числе сахаров, за счет расщепления полисахаридов и снижения количества высокомолекулярной фракции в составе полисахаридов. Так, содержание водорастворимых веществ к концу исследуемого временного периода увеличилось на 52,5% (по сухому остатку водного экстракта). Исходя из данных, представленных в табл. 3, можно предположить, что активное расщепление полисахаридов начинается на 4-й день прорастания и в результате этого процесса к концу исследуемого временного интервала содержание высокомолекулярной фракции в них снижалось на 24,4%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование биохимического состава семян льна в процессе кратковременного проращивания, проведенное спектральными и стандартными химическими методами, показало периодичность в изменениях соотношения основных макронутриентов семян льна. По результатам проведенной работы сделаны также следующие выводы:

– совокупность данных по изменению общего содержания белка, белкового азота, белковых фракций позволяет предположить, что в исследуемый период проращивания основной гидролитический распад запасных белков, приводящий к безвозвратному снижению, прежде всего, содержания белков и белкового азота, не происходит или не заметен на фоне появления новых

белков у растущих проростков;

– изменения таких показателей, как содержание жира и кислотного числа, интенсивности пиков функциональных групп в области липидов, свидетельствуют об отсутствии на раннем этапе проращивания расщепления запасных липидов, что коррелирует с данными отечественных исследований;

– повышение экстрактивных веществ в водных растворах семян льна как цельных, так и измельченных указывает на накопление растворимых веществ;

– о повышении водорастворимых белковых соединений свидетельствуют данные по преобладанию водо- и солерастворимых белковых фракций, а также увеличение содержания белка в водорастворимых белкополисахаридных (БПС) комплексах;

– анализ углеводной области ИК-спектров пророщенных семян льна, а также увеличение суммы водорастворимых полисахаридов и снижение в них высокомолекулярной фракции свидетельствуют об активном протекании гидролитического расщепления полисахаридов.

Таким образом, семена льна на раннем этапе проращивания содержат набор биологически активных веществ, обеспечивающий выход и прорастание проростка. Такие семена являются ценным ингредиентом для создания продуктов здорового питания с повышенным содержанием хорошо растворимых белков, свободных аминокислот и жирных кислот. Наличие указанных активных компонентов повышает питательную ценность и усвояемость целевой продукции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Браудо Е.Е., Даниленко А.Н., Дианова В.Т., Кроха Н.Г. Альтернативные подходы к получению растительных белковых продуктов В сб. ст.: Растительный белок: новые перспективы / под ред. Е.Е. Браудо. М.: Пищепромиздат, 2000. С. 6–23.
2. Самофалова Л.А., Симоненкова А.П., Сафронова О.В. Исследование структурообразования в экстрактах из прорастающих масличных семян по изменению функциональных свойств липидного комплекса // Вестник Технологического университета. 2017. Т. 20. N 4. С. 120–122.
3. Чумикина Л.В., Арабова Л.И., Мартынова И.В., Колпакова В.В. Изменение белкового ком-

плекса семян тритикале при прорастании // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. 2005. N 2-3. С. 51–54.

4. Казёнова Н.К., Шнейдер Д.В., Казёнов И.В. Изменение химического состава зерновых продуктов при проращивании // Хлебопродукты. 2013. N 10. С. 55–57.

5. Vellneuve S., Power K.A., Guévremont E., Mondor M., Tsao R., Wanasundara J.P.D., et al. Effect of a shot-time germination process on the nutrient composition, microbial counts and bread-making potential of whole flaxseed // Journal of Food Processing and Preservation. 2014. Vol. 39. Issue 6. P. 1574–

1586. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12385>

6. Bau H.M., Villaume C., Méjean L. Effects of soybean (*Glycine max*) germination on biologically active components, nutritional values of seeds, and biological characteristics in rats // *Nahrung*. 2000. Vol. 44. Issue 1. P. 2–6. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3803\(20000101\)44:1<2::AID-FOOD2>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3803(20000101)44:1<2::AID-FOOD2>3.0.CO;2-9)

7. Pimenta A.V., Verediano T.A., Carneiro J.C.S., Costa N.M.B., Costa A.G.V. Bioaccessibility and bioavailability of calcium in sprouted brown and golden flaxseed // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2021. Vol. 101. Issue 7. P. 2788–2798. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10908>

8. Kajla P., Sharma A., Sood D.R. Effect of germination on proximate principles, minerals and antinutrients of flaxseeds // *Asian Journal of Dairy and Food Research*. 2017. Vol. 36. Issue 1. P. 52–57. <https://doi.org/10.18805/ajdfr.v36i01.7459>

9. Сафронова О.В., Самофалова Л.А., Бобков С.В. Биологическая модификация семян сои и получение целевых напитков // *Вестник ВГУИТ*. 2013. N 2. С. 195–199. <https://doi.org/10.20914/2310-1202-2013-2-195-199>

10. Доценко С.М., Бибик И.В., Любимова О.И., Гужель Ю.А. Кинетика биохимического процесса прорастания семян сои // *Вестник КрасГАУ*. 2016. N 1 (112). С. 66–74.

11. Сычев И.А., Калинкина О.В., Лаксаева Е.А. Биологическая активность растительных полисахаридов // *Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова*. 2009. Т. 17. N 4. С. 143–148.

12. Liu Y., Han C., Deng X., Liu D., Liu N., Yan Y. Integrated physiology and proteome analysis of embryo and endosperm highlights complex metabolic networks involved in seed germination in wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Journal of Plant Physiology*. 2018. Vol. 229. P. 63–76. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.06.011>

13. Yan D., Duermeyer L., Leoveanu C., Nambara E. The functions of the endosperm during seed germination // *Plant and Cell Physiology*. 2014. Vol. 55. Issue 9. P. 1521–1533. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu089>

14. Goyal A., Sharma V., Upadhyay N., Gill S.,

Sihag M. Flax and flaxseed oil: an ancient medicine & modern functional food // *Journal of Food Science and Technology*. 2014. Vol. 51. Issue 9. P. 1633–1653. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1247-9>

15. Gutte K.B., Sahoo A.K., Ranveer R.C. Bioactive Components of Flaxseed and its Health Benefits // *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 2015. Vol. 31. Issue 1. P. 42–51.

16. Parikh M., Maddaford T.G., Austria J.A., Aliani M., Natticadan T., Pierce G.N. Dietary flaxseed as a strategy for improving human health // *Nutrients*. 2019. Vol. 11. Issue 5. P. 1171. <https://doi.org/10.3390/nu11051171>

17. Миневич И.Э. Функциональная значимость семян льна и практика их использования в пищевых технологиях // *Health, Food & Biotechnology*. 2019. Т. 1. N 2. С. 97–120. <https://doi.org/10.36107/hfb.2019.i2.s224>

18. Kajla P., Sharma A., Sood D.R. Flaxseed-a potential functional food source // *Journal of Food Science and Technology*. 2015. Vol. 52. Issue 4. P. 1857–1871. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1293-y>

19. Дьяков А.Б. Физиология и экология льна: монография. Краснодар: Изд-во ВНИИМК, 2006. 214 с.

20. Herchi W., Bahashwan S., Sebei K., Ben Saleh H., Kallel H., Boukhchina S. Effects of germination on chemical composition and antioxidant activity of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) oil // *Grasas y Aceites*. 2015. Vol. 66. Issue 1. P. e057. <https://doi.org/10.3989/gya.0463141>

21. Wanasundara P.K.J.P.D., Wanasundara U.N., Shahidi F. Changes in flax (*Linum usitatissimum* L.) seed lipids during germination // *Journal of The American Oil Chemists Society*. 1999. Vol. 76. P. 41–48.

22. Bewley J.D. Seed germination and dormancy // *The Plant Cell*. 1997. Vol. 9. Issue 7. P. 1055–1066. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.7.1055>

23. Awatif SA, Elozeiri AA. Metabolic processes during seed germination. In: Jimenes-Lopez JC (ed.) *Advances in Seed Biology*. UK: IntechOpen; 2017. P. 141–166. <https://doi.org/10.5772/intechopen.70653>

REFERENCES

1. Braudo EE, Danilenko AN, Dianova VT, Krokhina NG Alternative approaches to obtaining plant protein products. In: Braudo EE (ed.) *Vegetable protein: new perspectives*. Moscow: Pishchepromizdat; 2000. P. 6–23. (In Russian)

2. Samofalova LA, Simonenkova AP, Safronova OV. Investigation of structure formation in extracts from germinating oil seeds by changing the functional properties of the lipid complex. *Vestnik Tekhnologicheskogo universiteta = Bulletin of Technological University*. 2017;20(4):120–122. (In Russian)

3. Chumikina LV, Arabova LI, Martynova IV, Kolpakova VV. Changes in the protein complex of triticale seeds during germination. *Izvestiya vysshikh*

uchebnykh zavedenii. Pishchevaya tekhnologiya = News of institutes of higher education. Food Technology. 2005;2-3:51–54. (In Russian)

4. Kazennova NK, Shneider DV, Kazennov IV. Changes in the chemical composition of grain products during germination. *Khleboprodukty*. 2013;10:55–57. (In Russian)

5. Velleneuve S, Power KA, Guévremont E, Mondor M, Tsao R, Wanasundara JPD, et al. Effect of a shot-time germination process on the nutrient composition, microbial counts and bread-making potential of whole flaxseed. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2014;39(6):1574–1586. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12385>

6. Bau HM, Villaume C, Méjean L. Effects of soybean (*Glycine max*) germination on biologically active components, nutritional values of seeds, and biological characteristics in rats. *Nahrung*. 2000;44(1):2–6. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3803\(20000101\)44:1<2::AID-FOOD2>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3803(20000101)44:1<2::AID-FOOD2>3.0.CO;2-9)
7. Pimenta AV, Verediano TA, Carneiro JCS, Costa NMB, Costa AGV. Bioaccessibility and bioavailability of calcium in sprouted brown and golden flaxseed. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2021;101(7):2788–2798. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10908>
8. Kajla P, Sharma A, Sood DR. Effect of germination on proximate principles, minerals and antinutrients of flaxseeds. *Asian Journal of Dairy and Food Research*. 2017;36(1):52–57. <https://doi.org/10.18805/ajdr.v36i01.7459>
9. Safronova OV, Samofalova LA, Bobkov SV. Biological modification of soybean seeds and obtaining targeted drinks. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta inzhenernykh tekhnologii = Proceedings of the Voronezh State University of Engineering Technologies*. 2013;2:195–199. (In Russian) <https://doi.org/10.20914/2310-1202-2013-2-195-199>
10. Dotsenko SM, Bibik IV, Lyubimova OI, Guzhel' YA. Kinetics of biochemical processes of germination of soybean seeds. *Vestnik Krasnoyarskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta = The Bulletin of KrasGAU*. 2016;1:66–74. (In Russian)
11. Sytchev IA, Kalinkina OV, Lacksaeva EA. Biological activity of the vegetable polysaccharides. *Rossiiskii mediko-biologicheskii vestnik im. akad. I.P. Pavlova = I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald*. 2009;17(4):143–148. (In Russian)
12. Liu Y, Han C, Deng X, Liu D, Liu N, Yan Y. Integrated physiology and proteome analysis of embryo and endosperm highlights complex metabolic networks involved in seed germination in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Plant Physiology*. 2018;229:63–76. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.06.011>
13. Yan D, Duermeyer L, Leoveanu C, Nambara E. The functions of the endosperm during seed germination. *Plant and Cell Physiology*. 2014;55(9):1521–1533. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu089>
14. Goyal A, Sharma V, Upadhyay N, Gill S, Sihag M. Flax and flaxseed oil: an ancient medicine & modern functional food. *Journal of Food Science and Technology*. 2014;51(9):1633–1653. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1247-9>
15. Gutte KB, Sahoo AK, Ranveer RC. Bioactive Components of Flaxseed and its Health Benefit. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 2015;31(1):42–51.
16. Parikh M, Maddaford TG, Austria JA, Aliani M, Natticadan T, Pierce GN. Dietary flaxseed as a strategy for improving human health. *Nutrients*. 2019;11(5):1171. <https://doi.org/10.3390/nu11051171>
17. Minevich IE. Functional significance of flax seeds and practice of their use in food technologies. *Health, Food & Biotechnology*. 2019;1(2):97–120. (In Russian) <https://doi.org/10.36107/hfb.2019.i2.s224>
18. Kajla P, Sharma A, Sood DR. Flaxseed-a potential functional food source. *Journal of Food Science and Technology*. 2015;52(4):1857–1871. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1293-y>
19. D'yakov AB. *Flax physiology and ecology*. Krasnodar: Izdatel'stvo VNIIMK; 2006. 214 p. (In Russian)
20. Herchi W, Bahashwan S, Sebei K, Ben Saleh H, Kallel H, Boukhchina S. Effects of germination on chemical composition and antioxidant activity of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) oil. *Grasas y Aceites*. 2015;66(1):e057. <https://doi.org/10.3989/gya.0463141>
21. Wanasundara PKJPD, Wanasundara UN, Shahidi F. Changes in flax (*Linum usitatissimum* L.) seed lipids during germination. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1999;76:41–48.
22. Bewley JD. Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*. 1997;9(7):1055–1066. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.7.1055>
23. Awatif SA, Elozeiri AA. Metabolic processes during seed germination. In: Jimenes-Lopez JC (ed.) *Advances in Seed Biology*. UK: IntechOpen. 2017. P. 141–166. <https://doi.org/10.5772/intechopen.70653>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Миневич Ирина Эдуардовна,

к.т.н., ведущий научный сотрудник,
Федеральный научный центр лубяных культур,
170041, г. Тверь, Комсомольский пр-т, 17/56,
Российская Федерация,
✉ e-mail: irina_minevich@mail.ru

Нечипоренко Алла Павловна,

д.х.н., профессор,
Национальный исследовательский
университет информационных технологий,
механики и оптики,
197101, г. Санкт-Петербург,
Кронверкский пр-т, 49,

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Irina E. Minevich,

Cand. Sci. (Engineering), Leading Researcher,
Federal Scientific Center for Fiber Crops,
17/56, Komsomolskii Ave., Tver, 170041,
Russian Federation,
✉ e-mail: irina_minevich@mail.ru

Alla P. Nechiporenko,

Dr. Sci. (Chemistry), Professor,
National Research University of Information
Technologies, Mechanics and Optics,
49, Kronverkskii Ave., St. Petersburg, 197101,
Russian Federation,
e-mail: allanech2512@yandex.ru

Российская Федерация,
e-mail: allanech2512@yandex.ru

Гончарова Агата Анатольевна

младший научный сотрудник,
Федеральный научный центр лубяных культур,
170041, г. Тверь, Комсомольский пр-т, 17/56,
Российская Федерация,
e-mail: a.goncharova@fnclk.ru

Ситникова Вера Евгеньевна,

к.х.н., старший преподаватель,
Национальный исследовательский
университет информационных технологий,
механики и оптики,
197101, г. Санкт-Петербург,
Кронверкский пр-т, 49,
Российская Федерация,
e-mail: kresenka@gmail.com

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 21.05.2021.
Одобрена после рецензирования 15.07.2021.
Принята к публикации 30.08.2021.*

Agatha A. Goncharova

Junior Researcher,
Federal Scientific Center for Fiber Crops,
17/56, Komsomolskii Ave., Tver, 170041,
Russian Federation,
e-mail: a.goncharova@fnclk.ru

Vera E. Sitnikova,

Cand. Sci. (Chemistry), Senior Lecturer,
National research University of Information
Technologies, Mechanics and Optics,
49, Kronverkskii Ave., St. Petersburg, 197101,
Russian Federation,
e-mail: kresenka@gmail.com

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 21.05.2021.
Approved after reviewing 15.07.2021.
Accepted for publication 30.08.2021.*

Оригинальная статья / Original article

УДК 676.168

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-460-471>



Композиционная бумага из бактериальной наноцеллюлозы и хвойной целлюлозы

© Ю.А. Гисматулина*, В.В. Будаева*, А.Е. Ситникова*,
Н.В. Бычин*, Е.К. Гладышева*, Н.А. Шавыркина*,
Г.Ф. Миронова*, Ю.В. Севастьянова**

*Институт проблем химико-энергетических технологий СО РАН,
г. Бийск, Российская Федерация

**Северный (Арктический) федеральный университет им. М.В. Ломоносова,
г. Архангельск, Российская Федерация

Резюме: Масштабирование биосинтеза БНЦ позволило получить образцы композиционной бумаги с повышенной долей БНЦ. Целью работы являлось исследование образцов композиционной бумаги из БНЦ и сульфатной беленой хвойной целлюлозы (ХвЦ) с соотношением компонентов в широком диапазоне – 10:90, 30:70, 50:50, 60:40, 70:30, 90:10. Выбор метода изготовления бумаги осуществлен на основе результатов определения прочностных и деформационных показателей образцов композиционной бумаги с соотношением БНЦ:ХвЦ 20:80. Метод с поверхностным нанесением БНЦ на отливки ХвЦ позволил повысить показатели прочности (сопротивление раздиранию – на 37%, сопротивление продавливанию – на 17%) и деформационные показатели (жесткость при растяжении – на 66%, работу разрушения – на 8%, разрывную длину – на 4%) по сравнению с контролем. Во всех образцах подтверждено образование композиций. Методом растровой электронной спектроскопии установлено, что композиции бумаги состоят из переплетенных микроразмерных волокон ЦвХ и наноразмерных волокон БНЦ, причем по мере повышения в композициях доли БНЦ наблюдалось «уплотнение» структуры за счет увеличения доли сетчатых наноразмерных фрагментов. Данные ИК-спектроскопии свидетельствуют о сходстве целлюлозной структуры всех образцов. Установлено, что возрастание значений степени полимеризации образцов композиционной бумаги прямо пропорционально увеличению доли БНЦ в образцах. Изучена фильтрующая способность образцов композиционной бумаги по отношению к микроорганизмам культуральной жидкости продуцента *Medusomyces gisevii* Sa-12. Отмечено, что удерживание дрожжей достигается при содержании в композиционной бумаге 70% БНЦ. Представленные свойства нового материала обуславливают перспективы его использования для фильтрации микроорганизмов.

Ключевые слова: бактериальная наноцеллюлоза, хвойная целлюлоза, композиционная бумага, фильтрующая способность

Благодарности: Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 17-19-01054).

Для цитирования: Гисматулина Ю.А., Будаева В.В., Ситникова А.Е., Бычин Н.В., Гладышева Е.К., Шавыркина Н.А., Миронова Г.Ф., Севастьянова Ю.В. Композиционная бумага из бактериальной наноцеллюлозы и хвойной целлюлозы. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2021. Т. 11. N 3. С. 460–471. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-460-471>

Bacterial nanocellulose and softwood pulp for composite paper

Yulia A. Gismatulina*, Vera V. Budaeva*, Anastasia E. Sitnikova*,
Nikolay V. Bychin*, Evgenia K. Gladysheva*, Nadezhda A. Shavyrkinina*,
Galina F. Mironova*, Yulia V. Sevastyanova**

* Institute for Problems of Chemical and Energetic Technologies of the SB RAS,
Biysk, Russian Federation

** Northern (Arctic) Federal University named after M.V. Lomonosov,
Arkhangelsk, Russian Federation

Abstract: Scaling biosynthesis of bacterial nanocellulose (BNC) allowed samples of composite paper with an increased proportion of BNC to be obtained. This work aims to study BNC samples and bleached soft-

wood kraft pulp (BSKP) composite paper with a ratio of components varying across a wide range: 10:90, 30:70, 50:50, 60:40, 70:30, 90:10. The method of paper manufacturing was chosen based on the determinations of strength and deformation properties of composite samples with the BNC:BSKP ratio of 20:80. Surface application of BNT on BSKP handsheet provided for an increase in the strength values (tear resistance – by 37%, burst index – by 17%) and deformation characteristics (tension stiffness – by 66%, fracture work – by 8%, breaking length – by 4%) compared to a reference sample. The formation of composites is confirmed in all samples. Scanning electron spectroscopy revealed that paper composites comprise interlaced micro BSKP and nano BNC fibres. As the proportion of BNC in composites elevated, densification of the structure was observed due to an increased fraction of cross-linked nanosized elements. IR spectroscopy indicated the resemblance of cellulose structure in all samples. It was found that an increase in the degree of polymerisation of composite paper is directly proportional to an increase in the BNC amount in the samples. The filtering ability of composite paper samples against microorganisms in the culture liquid of the *Medusomyces gisevii* Sa-12 producer was studied. It should be noted that yeast retention is achieved with 70% BNC in the paper composite. The presented properties of the new material determine prospects for its use in filtering microorganisms.

Keywords: bacterial nanocellulose, softwood pulp, composite paper, filtering ability

Acknowledgement: The research was funded by the Russian Science Foundation (grant no. 17-19-01054).

For citation: Gismatulina YuA, Budaeva VV, Sitnikova AE, Bychin NV, Gladysheva EK, Shavyrkina NA, Mironova GF, Sevastyanova YuV. Bacterial nanocellulose and softwood pulp for composite paper. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(3):460–471. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-460-471>

ВВЕДЕНИЕ

Бактериальная наноцеллюлоза (БНЦ) – это химически чистая целлюлоза с уникальной нанофибрилярной структурой, характеризующаяся рядом специфических свойств, не присущих целлюлозе растительного происхождения (высокая влагоудерживающая способность, прозрачность, проницаемость для газов и жидкостей, высокая механическая прочность и др.) [1–5]. В связи с этим БНЦ востребована в различных отраслях, как традиционных для растительной целлюлозы (целлюлозно-бумажная и химическая промышленность) [6], так и новейших (биотехнологическая промышленность, биомедицина, электроника, получение композиционных материалов) [7–9].

Высокую актуальность имеют исследования, посвященные изучению бумагообразующих свойств БНЦ. Эти исследования можно разделить на следующие группы: бумага из БНЦ; композиционная бумага из традиционных компонентов с включением БНЦ; композиционная бумага с добавлением компонентов, обеспечивающих особые свойства бумаги (биоактивность, антимикробная активность, электропроводность, электроизоляция и др.); композиционная бумага с включением функционализированной БНЦ. Отдельно обсуждаются области применения новых видов композиционной бумаги.

Авторами работы [10] изучалось влияние плотности и скорости деформации на растяжение нанобумаги из исходной БНЦ.

Российскими учеными (Е.Г. Смирнова с коллегами) впервые была проведена успешная реставрация старинных рукописей (работы в этом направлении будут продолжены при наличии достаточного количества БНЦ) [11]. Аналогичные работы позднее были проведены и за рубежом [12].

Результаты оценки бумагообразующих свойств исходной БНЦ по сравнению с сульфатной беленой хвойной целлюлозой (ХвЦ) марки ХБ-1 изложены в работе [13]. Авторами названной монографии также были приготовлены образцы бумаги из смеси БНЦ и ХвЦ и было установлено, что основные показатели механической прочности смесевой бумаги мало отличаются от показателей бумаги, полученной из ХвЦ. В то же время бумага, состоящая из смеси БНЦ и ХвЦ, обладает чрезвычайно высоким сопротивлением излому – в 30 раз большим, чем у бумаги из ХвЦ. Исследования, проведенные по устойчивости к старению бумаги, полученной с включением БНЦ, показали, что она является более долговечным материалом в сравнении с хвойной бумагой. Введение БНЦ в композицию восполняющей бумажной массы повышает прочность шва примерно на 30% перед началом старения, и по завершении процесса старения этот показатель сохраняется на более высоком уровне, чем при применении восполняющей бумажной массы, не содержащей БНЦ.

Авторами работ [14, 15] получена композиционная бумага с добавками оксидов металлов, обладающая антимикробной активностью. В работе [16] показана перспективность использования БНЦ в качестве компонента упаковочных материалов, в частности, для упаковки пищевых продуктов, в работе [17] описано получение биоактивной бумаги в качестве нового упаковочного материала. В работе [18] сообщается о создании гибкой, сверхпрочной и высокопроводящей бумаги из графена и БНЦ, полученной новым методом распыления графена на поверхность питательной среды. Полученная бумага демонстрирует значительно улучшенную прочность на

растяжение и электропроводность по сравнению с исходной бумагой БНЦ, сохраняя при этом превосходную гибкость. Показана перспективность применения БНЦ в композиции электроизоляционной бумаги, поскольку при этом происходит повышение электрической и механической прочности целлюлозных диэлектриков, а также их устойчивости к длительному воздействию повышенной температуры по сравнению с промышленной электроизоляционной бумагой [19, 20].

В последнее время за рубежом было описано получение бумаги из функционализированной БНЦ в виде тонких листов, сочетающих характеристики нановолокон с жесткостью и физическими свойствами обычной древесной бумаги [14, 21]. Кроме того, этот материал является подходящей матрицей для иммобилизации биологически активных молекул путем физической адсорбции с получением биоактивной бумаги [17, 22].

Перспективным направлением оказалось применение БНЦ в качестве фильтрующего материала. Описано использование БНЦ во влажном виде в качестве фильтра для удаления микроорганизмов и очистки сточных вод [2], а авторы работы [5] применили БНЦ в сухом виде с добавлением Ag для фильтрации воздуха от твердых частиц и микроорганизмов.

Несмотря на актуальность и многообразие исследований по получению композиционной бумаги, отсутствие БНЦ в требуемых количествах сдерживает развитие этого направления (массовая доля БНЦ в композициях не превышает 20% [2]). Нами был масштабирован биосинтез БНЦ, в результате чего образцы БНЦ были получены в достаточном количестве [23, 24], что позволило увеличить долю БНЦ в образцах композиционной бумаги.

Целью данной работы являлось исследование образцов композиционной бумаги из БНЦ и ХвЦ с соотношением компонентов в широком диапазоне – 10:90, 30:70, 50:50, 60:40, 70:30, 90:10.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Хвойная целлюлоза марки ХБ-1 была предоставлена АО «Группа «ИЛИМ», филиал в г. Коряжма».

Образец исходной гель-пленки БНЦ с влажностью 99% был получен с помощью симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* Sa-12 по методике [23] с масштабированием процесса согласно [24].

Получение композиционной бумаги из БНЦ и ХвЦ проводилось на приборной базе Инновационно-технологического центра «Современные технологии переработки биоресурсов Севера» Северного (Арктического) федерального университета имени М.В. Ломоносова (ИТЦ СТПБС САФУ им. М.В. Ломоносова, г. Архангельск).

Образцы композиционной бумаги были получены двумя методами:

– метод № 1 заключался в выдерживании смеси БНЦ и ХвЦ без перемешивания в течение суток и последующем изготовлении образцов на листоотливном аппарате Rapid-Köthen (Австрия) с высушиванием в сушильной камере при температуре 100 °С;

– метод № 2 – в нанесении валиком суспензии БНЦ на готовые отливки ХвЦ с двух сторон также с последующим высушиванием в сушильной камере при температуре 100 °С.

Определение прочностных и деформационных показателей композиционной бумаги проводилось в ИТЦ СТПБС САФУ им. М.В. Ломоносова по стандартным методам [13].

Образцы композиционной бумаги из БНЦ и ХвЦ с соотношением компонентов в широком диапазоне, полученные методом № 2, исследованы с помощью растровой электронной микроскопии (РЭМ), ИК-спектроскопии. Были определены их степень полимеризации (СП) и фильтрующая способность по отношению к микроорганизмам культуральной жидкости продуцента *Medusomyces gisevii* Sa-12.

Морфология поверхности композиционной бумаги и исходной БНЦ изучалась методом РЭМ на сканирующем электронном микроскопе Jeol GSM 840 (Япония) после напыления Pt толщиной слоя 1–5 нм.

ИК-спектроскопия образцов композиционной бумаги проводилась на спектрометре Инфралюм-801 (Россия) в диапазоне частот 4000–500 см⁻¹. Для съемки спектров прессовали таблетки в бромиде калия в соотношении с KBr 1:150.

СП исходной ХвЦ, образцов композиционной бумаги и исходной БНЦ определялась методом, основанным на растворении навески образца в кадоксене и последующей вискозиметрии полученного раствора [25, 26]. Полуширина доверительного интервала определена при уровне значимости 0,05 и составляет ±50.

Фильтрующая способность шести образцов композиционной бумаги из БНЦ и ХвЦ с соотношением компонентов 10:90, 30:70, 50:50, 60:40, 70:30, 90:10 в сравнении с исходными ХвЦ и гель-пленкой БНЦ определялась вакуумной фильтрацией культуральной жидкости продуцента *Medusomyces gisevii* Sa-12. Продуцент представляет собой симбиотическую культуру, состоящую из 8–10 родов уксуснокислых бактерий, среди которых наиболее значимым является *Komagataibacter*, и 15–30 родов дрожжей – *Zygosaccharomyces*, *Candida*, *Kloeckera* и др. (видовой состав культуры детально приведен в работах [27, 28]). Культуральная жидкость получена на полусинтетической питательной среде согласно [26] при дозировке инокулята 10%, возраст – 9 сут. Численность клеток определялась методом прямого подсчета с использованием камеры Горяева (микроскоп Optika B-150, Италия).

Получение БНЦ, исследование композиционной

бумаги методами РЭМ и ИК-спектроскопии, определение СП и фильтрующей способности выполнено при использовании оборудования Бийского регионального центра коллективного пользования СО РАН (Институт проблем химико-энергетических технологий СО РАН, г. Бийск, Россия).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В табл. 1 представлены результаты определения прочности и деформативности образцов композиционной бумаги, полученной двумя методами в соотношении БНЦ:ХвЦ 20:80, в сравнении с ХвЦ.

Установлено, что при получении композиционной бумаги методом № 1 (суспензионный метод с выдержкой) добавка БНЦ приводит к изменению показателей в пределах погрешности по сравнению с контролем, за исключением увеличения сопротивления раздиранию на 24% (930 мН против 745 мН) и жесткости при растяжении на 12% (510 кН/м против 455 кН/м).

При использовании метода № 2 (с поверхностным нанесением БНЦ на подготовленные отливки ХвЦ) установлен факт повышения основных показателей прочности: сопротивление раздиранию – на 37% (1090 против 795 мН), сопротивление продавливанию – на 17% (440 против 375 кПа). Деформационные показатели также увеличиваются по сравнению с контролем: жесткость при растяжении – на 66% (736 против 443 кН/м), работа разрушения – на 8% (135,9 против 125,7 Дж/м²), разрывная длина – на 4% (7870 против 7530 м).

Полученные данные свидетельствуют о преимуществе метода с поверхностным нанесением БНЦ на отливки из ХвЦ и согласуются с результатами исследований, представленными в работах [3, 6, 9, 13], где добавление БНЦ в бумагу позволило увеличить прочностные и деформационные показатели. В литературе описано увеличение прочностных характеристик внесением волокон БНЦ в количестве до 20% в композиционную бумагу, но отсутствуют результаты визуализации

процесса взаимодействия микро- и наноразмерных волокон целлюлозы. Поэтому нами были исследованы методом РЭМ образцы бумаги, изготовленные в широком диапазоне соотношения БНЦ и ХвЦ. Результаты приведены в табл. 2 в сравнении с РЭМ исходной БНЦ. Исследование РЭМ было проведено при увеличении от 200 до 10000 раз (ранее нами было показано что структуру БНЦ необходимо фиксировать только при увеличении не менее чем в 1000 раз [29]).

На всех фотографиях наблюдается образование композиции из переплетенных наноразмерных волокон БНЦ (ширина волокон от 20 до 80 нм) и микроразмерных волокон ХвЦ (ширина волокон от 20 до 140 мкм). По мере увеличения содержания БНЦ от 10 до 90%, «паутинка» наноразмерных волокон на фото при увеличении x1000 все заметнее визуализируется при микроскопировании. Тонко переплетенная сеть гладких волокон БНЦ [10] «заполняет» крупные поры в древесной целлюлозе, снижая в целом пористость композиционной бумаги. Фото с увеличением x10000 подтверждает наличие наноразмерных волокон БНЦ во всех образцах. Таким образом, можно предположить, что видимое наполнение композиций ультратонкой трехмерной структурой БНЦ [5] может привести в целом к увеличению фильтрующей способности.

На рисунке представлены ИК-спектры образцов композиционной бумаги из БНЦ и ХвЦ с различным соотношением компонентов.

Сравнение ИК-спектров композиционной бумаги из БНЦ и ХвЦ с различным соотношением компонентов, представленных на рис. 1, позволяет установить, что все образцы бумаги, независимо от процентного соотношения компонентов, характеризуются близкими значениями валентных колебаний, соответствующих колебаниям целлюлозы [30], что свидетельствует об одинаковой целлюлозной структуре представленных образцов¹ [4, 29–31]. Конкретно: полосы поглощения при 3434 см⁻¹ обусловлены валентными колебаниями ОН-групп, полосы поглощения при

Таблица 1. Показатели прочности и деформативности образцов композиционной бумаги

Table 1. Strength and deformability indicators of composite paper samples

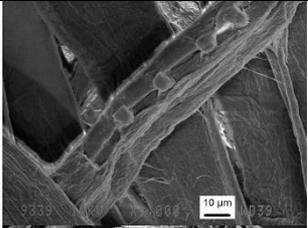
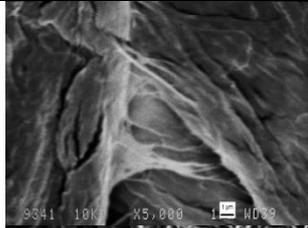
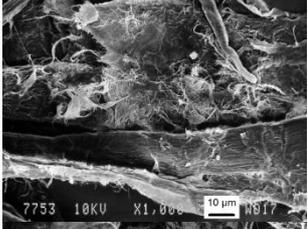
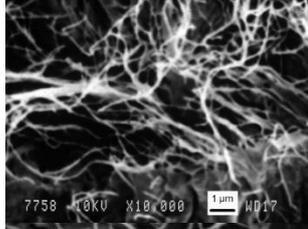
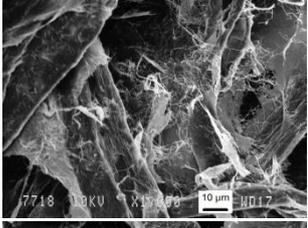
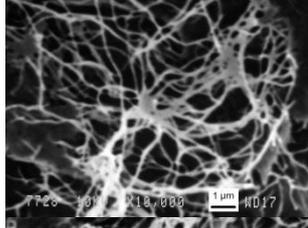
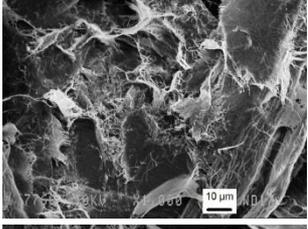
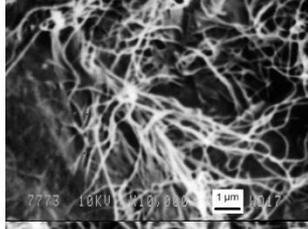
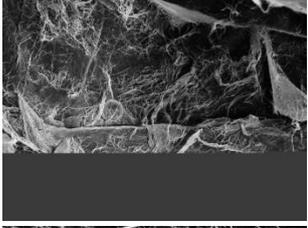
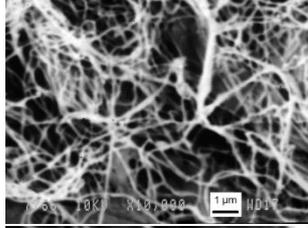
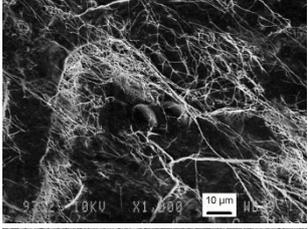
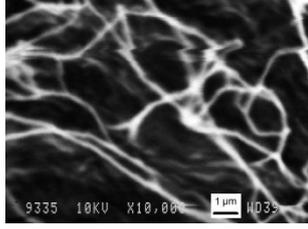
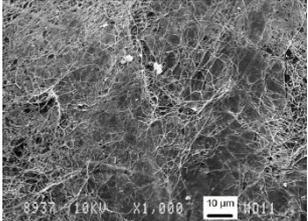
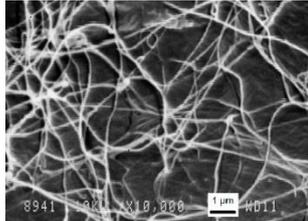
Соотношение компонентов БНЦ:ХвЦ	Степень помола, °ШР	ρ , г/см ³	δ , мкм	Прочностные показатели		Деформационные показатели		
				R, мН	П, кПа	S _t , кН/м	TEA, Дж/м ²	L, м
<i>Метод № 1</i>								
ХвЦ	32	0,718	96,5	745	380	455	116,2	7600
БНЦ:ХвЦ (20:80)		0,706	108,3	930	400	510	106,0	7450
<i>Метод № 2</i>								
ХвЦ	37	0,629	109,3	795	375	443	125,7	7530
БНЦ:ХвЦ (20:80)		0,772	125,0	1090	440	736	135,9	7870

Примечание. ρ – плотность; δ – средняя толщина; R – сопротивление раздиранию; П – сопротивление продавливанию; S_t – жесткость при растяжении; TEA – работа разрушения; L – разрывная длина.

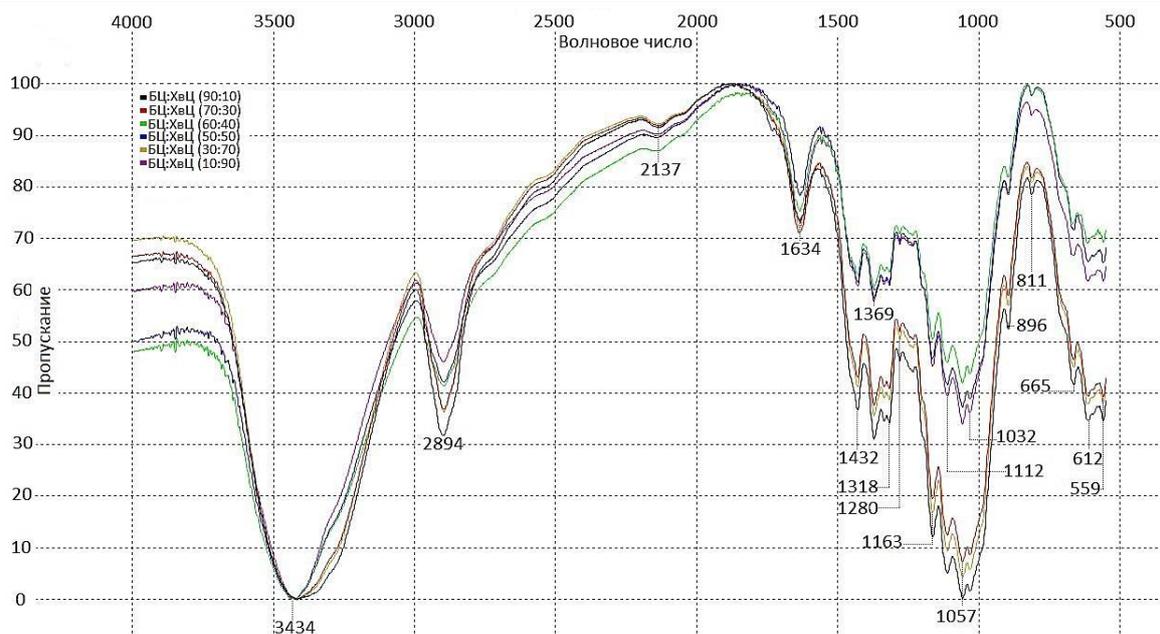
¹Новый справочник химика и технолога. Сырье и продукты промышленности органических и неорганических веществ. Ч. II. Спб.: АНО НПО «Профессионал», 2005, 2007. 1142 с.

Таблица 2. Фотографии РЭМ образцов композиционной бумаги из бактериальной наноцеллюлозы и хвойной целлюлозы с различным соотношением компонентов и исходной бактериальной наноцеллюлозе

Table 1. SEM photographs of composite paper from bacterial nanocellulose and coniferous cellulose with different components ratio and original bacterial nanocellulose

Соотношение БНЦ и ХвЦ	Увеличение x1000	Увеличение x10000
10:90		
30:70		
50:50		
60:40		
70:30		
90:10		
Исходная БНЦ		

Примечание. Фотографии РЭМ образца композиционной бумаги с соотношением БНЦ:ХвЦ 10:90 представлены при увеличении x1000 и x5000.



ИК-спектры образцов композиционной бумаги из бактериальной наноцеллюлозы и хвойной целлюлозы с соотношением компонентов 10:90, 30:70, 50:50, 60:40, 70:30, 90:10

IR spectra of composite paper samples from bacterial nanocellulose and coniferous cellulose with components ratio 10:90, 30:70, 50:50, 60:40, 70:30, 90:10

2894 cm^{-1} – валентными колебаниями CH_2 , CH -групп. Полосы поглощения при 1634 cm^{-1} характеризуют деформационные колебания OH -групп прочно связанной воды. Полосы поглощения в области 1432–1369 cm^{-1} указывают на деформационные колебания CH_2 , CH -групп. Полосы поглощения в области 1318 cm^{-1} указывают на деформационные колебания первичной спиртовой группы OH , в области 1280 cm^{-1} – на деформационные колебания спиртовой группы CH_2 , в области 1163 cm^{-1} – на валентные колебания спиртовых групп C-O-C и C-O . Полосы поглощения при 896 cm^{-1} подтверждают наличие β -1,4-гликозидных связей между молекулами глюкозы. Полученные результаты соответствуют опубликованным данным БНЦ [4].

Значения СП для исходных компонентов и образцов композиционных бумаг приведены в табл. 3.

Значения СП исходных компонентов – БНЦ (4900) и ХвЦ (1350), отличаются в 3,6 раза, поэтому смешение компонентов с самого малого соотношения (10:90) приводит к увеличению СП от 1350 до 1700. Далее наблюдается значительный рост значений СП в соответствии с увеличением содержания БНЦ в композиционной бумаге. Наличие необходимого количества БНЦ позволило получить композиции с долей БНЦ 70 и 90, степень полимеризации которых составила 3800 и 4500, что больше СП исходной ХвЦ в 2,8 и 3,3 раза соответственно. Данные ИК-спектроскопии об одинаковой целлюлозной структуре исследованных образцов бумаги и установление изменения в них СП в соответствии с увеличением

доли БНЦ подтверждают образование композиционной бумаги из двух видов целлюлозы.

Таблица 3. Степень полимеризации исходных компонентов и образцов композиционной бумаги с различным соотношением бактериальной наноцеллюлозы и хвойной целлюлозы

Table 3. Degree of polymerization of the initial components and composite paper with different ratios of bacterial nanocellulose and coniferous cellulose

Соотношение БНЦ и ХвЦ	Степень полимеризации
Исходная ХвЦ	1350
10:90	1700
30:70	2400
50:50	3150
60:40	3500
70:30	3800
90:10	4500
Исходная БНЦ	4900

Результаты оценки фильтрующей способности исходной ХвЦ, образцов композиционной бумаги и исходной гелевой пленки БНЦ по отношению к микроорганизмам в культуральной жидкости, содержащей дрожжевые клетки (8,5 млн КОЕ/мл) и уксуснокислые бактерии (18,0 млн КОЕ/мл), приведены в табл. 4.

Как следует из данных, представленных в табл. 4, ХвЦ обладает крайне низкой фильтрующей способностью в отношении уксуснокислых бактерий – задерживает только 6%, но отделяет 47% дрожжевых клеток.

Таблица 4. Фильтрующая способность образца хвойной целлюлозы, образцов композиционной бумаги и исходной гель-пленки бактериальной наноцеллюлозы

Table 4. Filtration capacity of coniferous cellulose, composite paper and the initial bacterial nanocellulose gel film

Образец	Количество микроорганизмов, млн КОЕ/мл	
	дрожжевые клетки	уксуснокислые бактерии
До фильтрации	8,5	18,0
После фильтрации на фильтре		
Исходная ХвЦ	4,5	17,1
БНЦ:ХвЦ 10:90	2,3	16,2
БНЦ:ХвЦ 30:70	0,5	8,4
БНЦ:ХвЦ 50:50	0,2	6,2
БНЦ:ХвЦ 60:40	0,1	3,6
БНЦ:ХвЦ 70:30	0,0	1,7
БНЦ:ХвЦ 90:10	0,0	0,5
Исходная гель-пленка БНЦ	0,0	0,0

Известно, что для достижения эффективного фильтрования (удерживания) микроорганизмов необходимо, чтобы размер пор фильтра был меньше, чем размер микроорганизмов. По литературным данным [4], размер пор БНЦ имеет широкий диапазон, например, 12–24 нм (метод БЭТ), от 10 до 430 нм (РЭМ). Дрожжи разных родов могут иметь 1,0–5,0 мкм в диаметре и 1,0–10,0 мкм в длину, а размер уксуснокислых бактерий – от 0,6 до 0,8 мкм в диаметре и от 1,0 до 7,0 мкм в длину [32]. В отличие от крупнопористой хвойной целлюлозы БНЦ можно назвать нанопористым материалом, поэтому размер пор БНЦ достаточен для удержания этих микроорганизмов.

Добавление всего лишь 10% БНЦ в композиционную бумагу увеличивает фильтрующую способность по отношению к дрожжевым клеткам в 2,0 раза, по отношению к уксуснокислым бактериям – только в 1,1 раза в сравнении с ХвЦ. Это связано с размерами и формой клеток: дрожжевые клетки крупнее, чем клетки уксуснокислых бактерий, и имеют сферoidalную или эллипсоидальную форму, уксуснокислые бактерии – это мелкие палочки. При повышении доли БНЦ в образцах композиционной бумаги улучшается фильтрующая способность образцов. Полученные результаты хорошо коррелируют с данными РЭМ (см. рисунок), демонстрирующими «уплотнение» пространства композиционной бумаги при повышении доли наноразмерных волокон БНЦ в образцах [5]. Полное удерживание дрожжей достигается при содержании БНЦ в композиционной бумаге 70%, полное удерживание уксуснокислых бактерий достигается только при использовании в качестве фильтрующего материала исходных гель-пленок БНЦ.

ВЫВОДЫ

На основании результатов определения прочностных и деформационных характеристик образцов композиционной бумаги, изготовленных из БНЦ и ХвЦ в соотношении 20:80 двумя методами: суспензионным с выдержкой и с поверхностным нанесением БНЦ на отливки ХвЦ, выбран последний метод в связи с более высо-

кими значениями прочности и деформации. Установлен факт повышения основных показателей прочности: сопротивление раздиранию – на 37% (1090 против 795 мН), сопротивление продавливанию – на 17% (440 против 375 кПа), и деформационных показателей: жесткость при растяжении – на 66% (736 против 443 кН/м), работа разрушения – на 8% (135,9 против 125,7 Дж/м²), разрывная длина – на 4% (7870 против 7530 м).

Методом с поверхностным нанесением БНЦ на отливки ХвЦ получены образцы композиционной бумаги в широком диапазоне соотношения БНЦ и ХвЦ: 10:90, 30:70, 50:50, 60:40, 70:30, 90:10. Результаты РЭМ подтверждают, что все образованные композиции состоят из переплетенных наноразмерных волокон БНЦ и микроразмерных волокон ХвЦ. Наблюдается увеличение доли сетчатых наноразмерных фрагментов по мере повышения доли БНЦ в композициях.

Методом ИК-спектроскопии показано сходство валентных колебаний для всех образцов композиционной бумаги и соответствие валентным колебаниям целлюлозы, что подтверждает их целлюлозную структуру.

По результатам определения СП целлюлозы в образцах композиционной бумаги установлено, что возрастание значений СП прямо пропорционально увеличению доли БНЦ в образцах.

Изучена фильтрующая способность образцов композиционной бумаги по отношению к микроорганизмам культуральной жидкости продуцента *Medusomyces gisevii* Sa-12 в сравнении с исходными ХвЦ и гель-пленкой БНЦ. Установлено, что добавление 10% БНЦ в композиционную бумагу увеличивает фильтрующую способность по отношению к дрожжевым клеткам в 2,0 раза, по отношению к уксуснокислым бактериям – в 1,1 раза в сравнении с исходной ХвЦ. Полное удерживание дрожжей достигается при содержании в композиционной бумаге 70% БНЦ, при этом 10% уксуснокислых бактерий проходят через композицию. При использовании в качестве фильтрующего материала исходной гель-пленки БНЦ

достигается полное удерживание всех микроорганизмов культуральной жидкости. Представленные свойства нового материала (композици-

онной бумаги из БНЦ и ХВЦ) обуславливают перспективы его использования для фильтрации микроорганизмов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gama M., Dourado F., Bielecki S. Bacterial nanocellulose. From biotechnology to bio-economy. Amsterdam: Elsevier, 2016. 260 p.
2. Isik Z., Unyayar A., Dizge N. Filtration and Antibacterial Properties of Bacterial Cellulose Membranes for Textile Wastewater Treatment // Avicenna Journal of Environmental Health Engineering. 2018. Vol. 5. Issue 2. P. 106–114. <https://doi.org/10.15171/ajehe.2018.14>
3. Skočaj M. Bacterial nanocellulose in papermaking // Cellulose. 2019. Vol. 26. Issue 8-9. P. 6477–6488. <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02566-y>
4. Alves A.A., Silva W.E., Belian M.F., Lins L.S.G., Galembeck A. Bacterial cellulose membranes for environmental water remediation and industrial wastewater treatment // International Journal of Environmental Science and Technology. 2020. Vol. 17. Issue 7. P. 3997–4008. <https://doi.org/10.1007/s13762-020-02746-5>
5. Wu A., Hu X., Ao H., Chen Z., Chu Z., Jiang T., et al. Rational design of bacterial cellulose-based air filter with antibacterial activity for highly efficient particulate matters removal // Nano Select. 2021. Vol. 1. <https://doi.org/10.1002/nano.202100086>
6. Keshk S.M. Bacterial Cellulose Production and its Industrial Applications // Journal of Bioprocessing & Biotechniques. 2014. Vol. 4. Issue 2. Article number 1000150. <https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000150>
7. Velásquez-Riaño M., Bojacá V. Production of bacterial cellulose from alternative low-cost substrates // Cellulose. 2017. Vol. 24. Issue 7. P. 2677–2698. <https://doi.org/10.1007/s10570-017-1309-7>
8. Hussain Z., Sajjad W., Khan T., Wahid F. Production of bacterial cellulose from industrial wastes: a review // Cellulose. 2019. Vol. 26. Issue 5. P. 2895–2911. <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02307-1>
9. Gregory D.A., Tripathi L., Fricker A.T.R., Asare E., Orlando I., Raghavendran V., et al. Bacterial cellulose: A smart biomaterial with diverse applications // Materials Science and Engineering: R: Reports. 2021. Vol. 145. N 100623. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2021.100623>
10. Santmarti A., Liu H.W., Herrera N., Lee K.-Y. Anomalous tensile response of bacterial cellulose nanopaper at intermediate strain rates // Scientific Reports. 2020. Vol. 10. Issue 1. Article number 15260. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72153-w>
11. Смирнова Е.Г., Лоцманова Е.М. Применение бактериальной целлюлозы в композиции бумажной массы для механизированной реставрации старинных документов // Вестник Санкт-Петербургского государственного университета технологии и дизайна. Серия 1: Естественные и технические науки. 2019. N 2. С. 83–87.
12. Santos S.M., Carbajo J.M., Gómez N., Ladero M., Villar J.C. Paper reinforcing by in situ growth of bacterial cellulose // Journal of Materials Science. 2017. Vol. 52. Issue 10. P. 5882–5893. <https://doi.org/10.1007/s10853-017-0824-0>
13. Смирнова Е.Г., Лоцманова Е.М., Журавлева Н.М., Резник А.С., Вураско А.В., Дрикер Б.Н. [и др.]. Материалы из нетрадиционных видов волокон: технологии получения, свойства, перспективы применения: монография / под ред. А.В. Вураско. Екатеринбург: Изд-во УГЛТУ, 2020. 252 с.
14. Morena A.G., Roncero M.B., Valenzuela S.V., Valls C., Vidal T., Pastor F.I.J., et al. Lac-case/TEMPO-mediated bacterial cellulose functionalization: production of paper-silver nanoparticles composite with antimicrobial activity // Cellulose. 2019. Vol. 26. Issue 1. P. 8655–8668. <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02678-5>
15. Phutanon N., Motina K., Chang Y.-H., Um-martyotin S. Development of CuO particles onto bacterial cellulose sheets by forced hydrolysis: a synergistic approach for generating sheets with photocatalytic and antibiofouling properties // International Journal of Biological Macromolecules. 2019. Vol. 136. P. 1142–1152. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.168>
16. Lin D., Liu Z., Shen R., Chen S., Yang X. Bacterial cellulose in food industry: Current research and future prospects // International Journal of Biological Macromolecules. 2020. Vol. 158. P. 1007–1019. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.230>
17. Buruaga-Ramiro C., Valenzuela S.V., Valls C., Roncero M.B., Pastor F.I.J., Díaz P., Martínez J. Development of an antimicrobial bioactive paper made from bacterial cellulose // International Journal of Biological Macromolecules. 2020. Vol. 158. P. 587–594. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.234>
18. Luo H., Xie J., Xiong L., Zhu Y., Yang Z., Wan Y. Fabrication of flexible, ultra-strong, and highly conductive bacterial cellulose-based paper by engineering dispersion of graphene nanosheets // Composites Part B: Engineering. 2019. Vol. 162. P. 484–490. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2019.01.027>
19. Zhuravleva N.M., Reznik A.S., Kiesewetter D.V., Stolpner A.M., Smirnova E.G., Khripunov A.K. Improving the efficiency of power transformers insulation by modifying the dielectric paper with bacterial cellulose // Journal of Physics: Conference Series. 2019. N 012002. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1236/1/012002>
20. Zhuravleva N.M., Reznik A.S., Kiesewetter D.V., Stolpner A.M., Smirnova E.G., Budaeva V.V. Improvement of properties of cellulose dielectrics by their structure modification with nanocellulose pro-

duced of wastes of agricultural crops // Journal of Physics: Conference Series. 2020. Vol. 1410. N 012068. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1410/1/012068>

21. Cabañas-Romero L.V., Valls C., Valenzuela S.V., Roncero M.B., Pastor F.I.J., Diaz P., et al. Bacterial cellulose–chitosan paper with antimicrobial and antioxidant activities // *Biomacromolecules*. 2020. Vol. 21. Issue 4. P. 1568–1577. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00127>

22. Buruaga-Ramiro C., Valenzuela S.V., Valls C., Roncero M.B., Pastor F.I.J., Díaz P., et al. Bacterial cellulose matrices to develop enzymatically active paper // *Cellulose*. 2020. Vol. 27. Issue 6. P. 3413–3426. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03025-9>

23. Budaeva V.V., Gismatulina Y.A., Mironova G.F., Skiba E.A., Gladysheva E.K., Kashcheyeva E.I., et al. Bacterial nanocellulose nitrates // *Nanomaterials*. 2019. Vol. 9. Issue 12. 1694. <https://doi.org/10.3390/nano9121694>

24. Shavyrkina N.A., Budaeva V.V., Skiba E.A., Mironova G.F., Bychin N.V., Gismatulina Yu.A., et al. Scale-up of biosynthesis process of bacterial nanocellulose // *Polymers*. 2021. Vol. 13. Issue 12. P. 1920. <https://doi.org/10.3390/polym13121920>

25. Hallac B.B., Ragauskas A.J. Analyzing cellulose degree of polymerization and its relevancy to cellulosic ethanol // *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. 2011. Vol. 5. Issue 2. P. 215–225. <https://doi.org/10.1002/bbb.269>

26. Скиба Е.А., Байбакова О.В., Гладышева Е.К., Будаева В.В. Исследование влияния дозировки инокулята *Medusomyces gisevii* Sa-12 на выход и степень полимеризации бактериальной целлюлозы // *Известия вузов. Прикладная химия и биотех-*

нология. 2019. Т. 9 N 3. С 420–429. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-3-420-429>

27. Marsh A.J., O’Sullivan O., Hill C., Ross R.P., Cotter P.D. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal Compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples // *Food Microbiology*. 2014. Vol. 38. P. 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.09.003>

28. Chakravorty S., Bhattacharya S., Chatzinothas A., Chakravorty W., Bhattacharya D., Gachhui R. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics // *International Journal of Food Microbiology*. 2016. Vol. 220. P. 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.015>

29. Kashcheyeva E.I., Gladysheva E.K., Skiba E.A., Budaeva V.V. A study of properties and enzymatic hydrolysis of bacterial cellulose // *Cellulose*. 2019. Vol. 26. P. 2255–2265. <https://doi.org/10.1007/s10570-018-02242-7>

30. Yin X., Zhang X., Yang J., Lin Q., Wang J., Zhu Q. Comparison of succinylation methods for bacterial cellulose and adsorption capacities of bacterial cellulose derivatives for Cu²⁺ ion // *Polymer Bulletin*. 2011. Vol. 67. Issue 3. P. 401–412. <https://doi.org/10.1007/s00289-010-0388-5>

31. Goh W.N., Rosma A., Kaur B., Fazilah A., Karim A.A., Bhat R. Microstructure and physical properties of microbial cellulose produced during fermentation of black tea broth (Kombucha). II. // *International Food Research Journal*. 2012. Vol. 19. Issue 1. P. 153–158.

32. Prescott S.C., Dunn C.G. *Industrial Microbiology*, 2th ed. New York: McGraw-Hill book co, 1949. 923 p.

REFERENCES

1. Gama M, Dourado F, Bielecki S. *Bacterial nanocellulose. From Biotechnology to BioEconomy*. Amsterdam: Elsevier; 2016. 260 p.

2. Isik Z, Unyayar A, Dizge N. Filtration and Antibacterial Properties of Bacterial Cellulose Membranes for Textile Wastewater Treatment. *Avicenna Journal of Environmental Health Engineering*. 2018;5(2):106–114. <https://doi.org/10.15171/ajehe.2018.14>

3. Skočaj M. Bacterial nanocellulose in papermaking. *Cellulose*. 2019;26(8-9):6477–6488. <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02566-y>

4. Alves AA, Silva WE, Belian MF, Lins LSG, Galembeck A. Bacterial cellulose membranes for environmental water remediation and industrial wastewater treatment. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2020;17(7):3997–4008. <https://doi.org/10.1007/s13762-020-02746-5>

5. Wu A, Hu X, Ao H, Chen Z, Chu Z, Jiang T, et al. Rational design of bacterial cellulose-based air filter with antibacterial activity for highly efficient particulate matters removal. *Nano Select*. 2021;1. <https://doi.org/10.1002/nano.202100086>

6. Keshk SM. Bacterial Cellulose Production and its Industrial Applications. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*. 2014;4(2). Article number 1000150. <https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000150>

7. Velásquez-Riaño M, Bojacá V. Production of bacterial cellulose from alternative low-cost substrates. *Cellulose*. 2017;24(7):2677–2698. <https://doi.org/10.1007/s10570-017-1309-7>

8. Hussain Z, Sajjad W, Khan T, Wahid F. Production of bacterial cellulose from industrial wastes: a review. *Cellulose*. 2019;26(5):2895–2911. <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02307-1>

9. Gregory DA, Tripathi L, Fricker ATR, Asare E, Orlando I, Raghavendran V, et al. Bacterial cellulose: A smart biomaterial with diverse applications. *Materials Science and Engineering: R: Reports*. 2021;145: 100623. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2021.100623>

10. Santmarti A, Liu HW, Herrera N, Lee K-Y. Anomalous tensile response of bacterial cellulose nanopaper at intermediate strain rates. *Scientific Reports*. 2020;10(1). Article number 15260. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72153-w>

11. Smirnova EG, Lotsmanova EM. The use of

- bacterial cellulose in the composition of paper pulp for the mechanized restoration of old documents. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo gosudarstvennogo universiteta tekhnologii i dizaina. Seriya 1: Estestvennye i tekhnicheskie nauki = Vestnik of St. Petersburg State University of Technology and Design. Series 1. Natural and technical science.* 2019;2:83–87. (In Russian)
12. Santos SM, Carbajo JM, Gómez N, Ladero M, Villar JC. Paper reinforcing by in situ growth of bacterial cellulose. *Journal of Materials Science.* 2017;52(10):5882–5893. <https://doi.org/10.1007/s10853-017-0824-0>
13. Smirnova EG, Lotsmanova EM, Zhuravleva NM, Reznik AS, Vurasko AV, Driker BN, et al. *Materials from non-traditional types of fibers: production technologies, properties, application prospects.* Ekaterinburg: Izdatel'stvo Ural'skogo gosudarstvennogo lesotekhnicheskogo universiteta; 2020. 252 p. (In Russian)
14. Morena AG, Roncero MB, Valenzuela SV, Valls C, Vidal T, Pastor FIJ, et al. Laccase/TEMPO-mediated bacterial cellulose functionalization: production of paper-silver nanoparticles composite with antimicrobial activity. *Cellulose.* 2019;26(1):8655–8668. <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02678-5>
15. Phutanon N, Motina K, Chang Y-H, Um-martyotin S. Development of CuO particles onto bacterial cellulose sheets by forced hydrolysis: a synergistic approach for generating sheets with photocatalytic and antibiofouling properties. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2019;136:1142–1152. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.168>
16. Lin D, Liu Z, Shen R, Chen S, Yang X. Bacterial cellulose in food industry: Current research and future prospects. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2020;158:1007–1019. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.230>
17. Buruaga-Ramiro C, Valenzuela SV, Valls C, Roncero MB, Pastor FIJ, Díaz P, Martínez J. Development of an antimicrobial bioactive paper made from bacterial cellulose. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2020;158:587–594. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.234>
18. Luo H, Xie J, Xiong L, Zhu Y, Yang Z, Wan Y. Fabrication of flexible, ultra-strong, and highly conductive bacterial cellulose-based paper by engineering dispersion of graphene nanosheets. *Composites Part B: Engineering.* 2019;162:484–490. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2019.01.027>
19. Zhuravleva NM, Reznik AS, Kiesewetter DV, Stolpner AM, Smirnova EG, Khripunov AK. Improving the efficiency of power transformers insulation by modifying the dielectric paper with bacterial cellulose. *Journal of Physics: Conference Series.* 2019;012002. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1236/1/012002>
20. Zhuravleva NM, Reznik AS, Kiesewetter DV, Stolpner AM, Smirnova EG, Budaeva V.V. Improvement of properties of cellulose dielectrics by their structure modification with nanocellulose produced of wastes of agricultural crops. *Journal of Physics: Conference Series.* 2020;1410:012068. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1410/1/012068>
21. Cabañas-Romero LV, Valls C, Valenzuela SV, Roncero MB, Pastor FIJ, Díaz P, et al. Bacterial cellulose–chitosan paper with antimicrobial and antioxidant activities. *Biomacromolecules.* 2020;21(4):1568–1577. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00127>
22. Buruaga-Ramiro C, Valenzuela SV, Valls C, Roncero MB, Pastor FIJ, Díaz P, et al. Bacterial cellulose matrices to develop enzymatically active paper. *Cellulose.* 2020;27(6):3413–3426. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03025-9>
23. Budaeva VV, Gismatulina YA, Mironova GF, Skiba EA, Gladysheva EK, Kashcheyeva EI, et al. Bacterial nanocellulose nitrates. *Nanomaterials.* 2019;9(12):1694. <https://doi.org/10.3390/nano9121694>
24. Shavyrkina NA, Budaeva VV, Skiba EA, Mironova GF, Bychin NV, Gismatulina YuA, et al. Scale-up of biosynthesis process of bacterial nanocellulose. *Polymers.* 2021;13(12):1920. <https://doi.org/10.3390/polym13121920>
25. Hallac BB, Ragauskas AJ. Analyzing cellulose degree of polymerization and its relevancy to cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining.* 2011;5(2):215–225. <https://doi.org/10.1002/bbb.269>
26. Skiba EA, Baibakova OV, Gladysheva EK, Budaeva VV. Study of the influence of *Medusomyces gisevii* Sa-12 inoculum dosage on bacterial cellulose yield and degree of polymerization. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2019;9(3):420–429. (In English). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-3-420-429>
27. Marsh AJ, O'Sullivan O, Hill C, Ross RP, Cotter PD. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal Compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. *Food Microbiology.* 2014;38:171–178. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.09.003>
28. Chakravorty S, Bhattacharya S, Chatzinotas A, Chakraborty W, Bhattacharya D, Gachhui R. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *International Journal of Food Microbiology.* 2016;220:63–72. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.015>
29. Kashcheyeva EI, Gladysheva EK, Skiba EA, Budaeva VV. A study of properties and enzymatic hydrolysis of bacterial cellulose. *Cellulose.* 2019;26:2255–2265. <https://doi.org/10.1007/s10570-018-02242-7>
30. Yin X, Zhang X, Yang J, Lin Q, Wang J, Zhu Q. Comparison of succinylation methods for bacterial cellulose and adsorption capacities of bacterial cellulose derivatives for Cu²⁺ ion. *Polymer Bulletin.* 2011;67(3):401–412. <https://doi.org/10.1007/s00289-010-0388-5>
31. Goh WN, Rosma A, Kaur B, Fazilah A, Ka-

rim AA, Bhat R. Microstructure and physical properties of microbial cellulose produced during fermentation of black tea broth (Kombucha). II. *International*

Food Research Journal. 2012;19(1):153–158.

32. Prescott SC, Dunn CG. *Industrial Microbiology*, 2nd ed. New York: McGraw-Hill book Co; 1949. 923 p.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Гисматулина Юлия Александровна,
к.т.н., старший научный сотрудник,
Институт проблем химико-энергетических
технологий СО РАН,
659322, г. Бийск, ул. Социалистическая, 1,
Российская Федерация,
e-mail: julja.gismatulina@rambler.ru

Будаева Вера Владимировна,
к.х.н., доцент, ведущий научный сотрудник,
Институт проблем химико-энергетических
технологий СО РАН,
659322, г. Бийск, ул. Социалистическая, 1,
Российская Федерация,
✉ e-mail: budaeva@ipcet.ru

Ситникова Анастасия Евгеньевна,
инженер-исследователь,
Институт проблем химико-энергетических
технологий СО РАН,
659322, г. Бийск, ул. Социалистическая, 1,
Российская Федерация,
e-mail: sitnikova97.97@mail.ru

Бычин Николай Валерьевич,
ведущий инженер,
Институт проблем химико-энергетических
технологий СО РАН,
659322, г. Бийск, ул. Социалистическая, 1,
Российская Федерация,
e-mail: nbych@yandex.ru

Гладышева Евгения Константиновна,
к.т.н., научный сотрудник,
Институт проблем химико-энергетических
технологий СО РАН,
659322, г. Бийск, ул. Социалистическая, 1,
Российская Федерация,
e-mail: evg-gladysheva@yandex.ru

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

Миронова Галина Федоровна,
к.т.н., младший научный сотрудник,
Институт проблем химико-энергетических
технологий СО РАН,

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Yulia A. Gismatulina,
Cand. Sci. (Engineering), Senior Scientist,
Institute for Problems of Chemical
and Energetic Technologies SB RAS,
1, Socialisticheskaya St., Biysk, 659322,
Russian Federation,
e-mail: julja.gismatulina@rambler.ru

Vera V. Budaeva,
Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Leading Researcher,
Institute for Problems of Chemical
and Energetic Technologies SB RAS,
1, Socialisticheskaya St., Biysk, 659322,
Russian Federation,
✉ e-mail: budaeva@ipcet.ru

Anastasia E. Sitnikova,
Research Engineer,
Institute for Problems of Chemical
and Energetic Technologies SB RAS,
1, Socialisticheskaya St., Biysk, 659322,
Russian Federation,
e-mail: sitnikova97.97@mail.ru

Nikolay V. Bychin,
Leading Engineer,
Institute for Problems of Chemical
and Energetic Technologies SB RAS,
1, Socialisticheskaya St., Biysk, 659322,
Russian Federation,
e-mail: nbych@yandex.ru

Evgenia K. Gladysheva,
Cand. Sci. (Engineering), Researcher
Institute for Problems of Chemical
and Energetic Technologies SB RAS,
1, Socialisticheskaya St., Biysk, 659322,
Russian Federation,
e-mail: evg-gladysheva@yandex.ru

Nadezhda A. Shavyrkina,
Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Senior Scientist,
Institute for Problems of Chemical
and Energetic Technologies SB RAS,
1, Socialisticheskaya St., Biysk, 659322,
Russian Federation,
e-mail: 32nadina@mail.ru

Galina F. Mironova,
Cand. Sci. (Engineering),
Junior Researcher,
Institute for Problems of Chemical

659322, г. Бийск, ул. Социалистическая, 1,
Российская Федерация,
e-mail: yur_galina@mail.ru

Севастьянова Юлия Вениаминовна,
к.т.н., доцент, директор
Инновационно-технологического центра
«Современные технологии переработки
биоресурсов Севера»,
Северный (Арктический) федеральный
университет им. М.В. Ломоносова,
163002, г. Архангельск,
наб. Северной Двины, 17,
Российская Федерация,
e-mail: ysevastyanova@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 21.06.2021.
Одобрена после рецензирования 25.08.2021.
Принята к публикации 30.08.2021.*

and Energetic Technologies SB RAS,
1, Socialisticheskaya St., Biysk, 659322,
Russian Federation,
e-mail: yur_galina@mail.ru

Yulia V. Sevastyanova,
Cand. Sci. (Engineering), Associate Professor,
Director of the Innovation and Technology Center
"Modern technologies for processing biological
resources of the North",
Northern (Arctic) Federal University named after
M.V. Lomonosov,
17, Severnaya Dvina Emb.,
Arkhangelsk, 163002,
Russian Federation
e-mail: ysevastyanova@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 21.06.2021.
Approved after reviewing 25.08.2021.
Accepted for publication 30.08.2021.*

Оригинальная статья / Original article

УДК 665.9, 577.15, 579.695, 532.135

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-472-480>



Возможности использования базидиального гриба *Trametes hirsuta* MT-17.24 в биодеструкции полианионной целлюлозы

© А.В. Зубченко*, Е.Ю. Кожевникова*, А.В. Барков*,
Ю.А. Тополук*, А.В. Шнырева**, В.А. Винокуров*,
Л.А. Магадова*

*Российский государственный университет нефти и газа (НИУ) им. И.М. Губкина,
Москва, Российская Федерация

**Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Москва, Российская Федерация

Резюме: Существующие методы утилизации технологических жидкостей, используемых при строительстве нефтяных и газовых скважин (химическая нейтрализация отработанных растворов, термический метод, загущение), несмотря на их эффективность, зачастую являются дорогостоящими и неэкологичными. Базидиальные грибы являются природными деструкторами-кислототрофами, перерабатывающими лигноцеллюлозный субстрат – один из самых устойчивых биополимеров в природе. Перспективы применения ферментных препаратов на основе базидиальных грибов в качестве биодеструкторов органических веществ особенно очевидны в связи с высокотехнологичностью и безотходностью их производства. Цель работы заключалась в получении ферментного препарата на основе штамма базидиального гриба *Trametes hirsute* MT-17.24 и исследовании его способности к биодеструкции полианионной целлюлозы, применяемой в качестве структурообразователя технологических жидкостей в процессе строительства и ремонта нефтяных и газовых скважин. Проведен скрининг целлюлазной активности штаммов: *Fomitopsis pinicola* MT-5.21, *Fomes fomentarius* MT-4.05, *Lactarius necator*, *Schizophyllum commune* MT-33.01, *Trametes versicolor* It-1, *Trametes hirsute* MT-17.24, *Trametes hirsuta* MT-24.24. Для получения ферментного препарата был выбран штамм *T. hirsuta* MT-17.24, продемонстрировавший наиболее высокий коэффициент целлюлазной активности – 10,9. Подобрана среда для твердофазного культивирования данного штамма. Ферментативная активность ферментного препарата была изучена на модельной буровой технологической жидкости. В ходе 10-часового эксперимента было зафиксировано, что при использовании 1%-го ферментного препарата пластическая вязкость технологической жидкости снижается с 16 до 8 мПа·с. По результатам проведенной работы можно сделать однозначный вывод об эффективности применения ферментного препарата на основе базидиальных грибов в качестве биодеструктора полианионной целлюлозы.

Ключевые слова: базидиальные грибы, полианионная целлюлоза, ферменты, буровая технологическая жидкость, биодеструкция

Благодарности: Работа выполнена при финансовой поддержке внутреннего гранта РГУ нефти и газа (НИУ) им. И.М. Губкина № 120720 «Разработка новых биотехнологических методов и материалов для защиты окружающей среды и биомедицины».

Для цитирования: Зубченко А.В., Кожевникова Е.Ю., Барков А.В., Тополук Ю.А., Шнырева А.В., Винокуров В.А., Магадова Л.А. Возможности использования базидиального гриба *Trametes hirsute* MT-17.24 в биодеструкции полианионной целлюлозы. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2021. Т. 11. N 3. С. 472–480. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-472-480>

Potential use of basidiomycota *Trametes hirsuta* MT-17.24 in biodegradation of polyanionic cellulose

Anastasia V. Zubchenko*, Elena Yu. Kozhevnikova*, Artem V. Barkov*,
Yulia A. Topolyuk*, Alla V. Shnyreva**, Vladimir A. Vinokurov*,
Lyubov A. Magadova*

*Gubkin University (National University of Oil and Gas),
Moscow, Russian Federation

**Moscow State University named after M.V. Lomonosov,
Moscow, Russian Federation

Abstract: Despite their efficiency, existing methods to dispose of drilling fluids used in the construction of oil and gas wells (chemical treatment of spent solutions, thermal method, thickening) are often expensive and unsustainable. Basidiomycota are natural xylotroph destructors that process lignocellulosic substrate – one of the most stable biopolymers in nature. Prospects for using enzyme preparations based on Basidiomycota as biodestructors of organic substances are evident due to the high efficiency and zero-waste production. The aim was to obtain an enzyme preparation based on the *Trametes hirsuta* MT-17.24 Basidiomycota strain and evaluate its ability to biodegrade polyanionic cellulose, used as a viscosifier for drilling fluids in the construction and repair of oil and gas wells. Screening of cellulase activity of the following strains was carried out: *Fomitopsis pinicola* MT-5.21, *Fomes fomentarius* MT-4.05, *Lactarius necator*, *Schizophyllum commune* MT-33.01, *Trametes versicolor* It-1, *Trametes hirsuta* MT-17.24, *Trametes hirsuta* MT-24.24. To obtain the enzyme preparation, the *T. hirsuta* MT-17.24 strain was selected, which demonstrated the highest coefficient of cellulase activity (10.9). A medium for solid-phase cultivation of this strain was selected. Enzymatic activity of the enzyme preparation was studied on a model drilling fluid. A 10-hour experiment showed that the use of a 1% enzyme preparation leads to a decrease in the plastic viscosity of the drilling fluid from 16 to 8 mPa·s. The research results demonstrate the efficiency of enzyme preparations based on Basidiomycota in the biodestruction of polyanionic cellulose.

Keywords: basidiomycota, polyanionic cellulose, enzymes, drilling fluid, biodegradation

Acknowledgments: The work was supported by Gubkin University internal grant no. 120720 "Development of new biotechnological methods and materials for environmental protection and biomedicine".

For citation: Zubchenko AV, Kozhevnikova EYu, Barkov AV, Topolyuk YuA, Shnyreva AV, Vinokurov VA, Magadova LA. Potential use of basidiomycota *Trametes hirsuta* MT-17.24 in biodegradation of polyanionic cellulose. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(3):472–480. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-472-480>

ВВЕДЕНИЕ

В современных условиях недропользования наибольшее техногенное воздействие в процессе строительства нефтяных и газовых скважин оказывается на природные экосистемы на территориях складирования отходов бурения. В Российской Федерации ежегодно объем отходов бурения возрастает в среднем на 6% и в 2021 г., по оценке ООО «АТ Консалтинг», приблизится к отметке 4,7 млн м³ в год. Связано это с большим разнообразием материалов и реагентов, применяемых при строительстве скважин, с крупнотоннажным характером образования таких отходов, а также несовершенством существующих технологий их регенерации и утилизации. Согласно законодательству Российской Федерации, отходы бурения складироваются на срок не более 11 месяцев в целях их дальнейшей переработки, утилизации, обезвреживания^{1,2}. Поэтому в комплексе мер, направленных на повышение уровня экологической безопасности процесса строительства скважин, решающее значение имеет утилизация отходов бурения.

Утилизация огромного количества содержащего буровых шламонакопителей требует разработки новых биопрепаратов, интенсифицирующих деструкцию органических компонентов буровых жидкостей для возможности дальнейшего использования, захоронения отходов бурения и рекультивации нарушенных земель.

В настоящее время в рецептурах современных буровых промывочных жидкостей широко используются высокозамещенные (степень замещения более 0,9) карбоксиметилированные производные целлюлозы – различные виды полианионной целлюлозы (ПАЦ) (рис. 1). Вследствие большого количества и равномерного распределения функциональных групп ПАЦ обладает свойствами хорошего электролита в водных растворах, что определяет особенности ее использования в буровых системах с улучшенными характеристиками по фильтрации, солеустойчивости, устойчивости к повышенным температурам и биоразложению. Буровые отходы, содержащие модифицированные полисахариды различной природы, в том числе ПАЦ, более

¹ Об отходах производства и потребления: федер. закон РФ от 24.06.1998 г. № 89-ФЗ (с изменениями и дополнениями).

² ПНСТ 472-2020. Ресурсосбережение. Обращение с отходами. Общие требования по обращению с отходами бурения: предварительный национальный стандарт РФ; утв. и введен в действие приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 27.10.2020 г. № 86-пнст.

экологичны и безопасны, чем нефтесодержащий буровой шлам. Однако сложность обезвоживания такого рода отходов, проблемы с седиментацией твердой фазы и достижением удовлетворительной деструкции полимерсодержащих компонентов в случае получения на основе этого материала вторичных продуктов приводят к проблемам в утилизации бурового шлама [1–4].

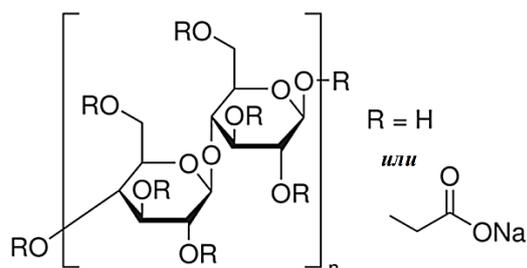


Рис. 1. Строение молекулы полианионной целлюлозы
Fig. 1. Structure of the polyanionic cellulose molecule

Химический метод утилизации эфиров целлюлозы в составе буровых шламов предполагает использование минеральных кислот, что не удовлетворяет требованиям экологической безопасности, в то же время естественное биоразложение современных модифицированных эфиров целлюлозы в присутствии биоцидов может протекать в течение нескольких лет. Наиболее предпочтительна биологическая деструкция эфиров целлюлозы, обусловленная ферментативной активностью отдельных групп микроорганизмов, использующих эти реагенты в качестве источников питания. Согласно данным, представленным в работах [5–13], ферментативная деструкция осуществляется в результате действия комплекса целлюлаз, собранных в полиферментные системы, состоящие из экзо- и эндоферментов.

Из вышесказанного следует, что существует необходимость индивидуального подбора условий культивирования различного рода штаммов микроорганизмов и грибов с целью получения эффективного ферментного препарата для реализации экологически безопасной процедуры утилизации эфиров целлюлозы – компонентов буровых технологических жидкостей.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объекты исследования – штаммы из коллекции базидиальных грибов лаборатории микотехнологии для нефтегазовой отрасли Российского государственного университета нефти и газа (НИУ) им. И.М. Губкина: *F. pinicola* МТ-5.21, *F. fomentarius* МТ-4.05, *L. necator*, *S. commune* МТ-33.01, *T. hirsuta* МТ-17.24, *T. hirsuta* МТ-24.24 и *T. versicolor* It-1 из коллекции "Базидиальные грибы съедобные и биотехнологически значимые" кафедры микологии и альгологии Московского гос-

ударственного университета им. М.В. Ломоносова. Ранее эти штаммы показали свою эффективность в процессах биодеструкции полисахаридов [8, 11]. Оценку целлюлазной активности штаммов проводили на чашках Петри с КМЦ-агаром (г/л: NaNO_3 – 2,0; K_2HPO_4 – 1,0; MgSO_4 – 0,5; KCl – 0,5; пептон – 0,2; АлПАЦ-НВ – 2,0; агар – 17,0) с последующим заливанием чашек разбавленным дистиллированной водой раствором Люголя (20:1) спустя 5 суток культивирования [14]. Ферментативную активность оценивали по диаметру зоны просветления вокруг колонии штамма. Коэффициент ферментативной активности вычисляли по формуле [15]:

$$A = \frac{S_{\text{зоны просветления}} - S_{\text{колонии}}}{S_{\text{колонии}}},$$

где A – коэффициент ферментативной активности; $S_{\text{зоны просветления}}$ – площадь неокрашенного участка вокруг мицелия; $S_{\text{колонии}}$ – площадь, занимаемая мицелием гриба.

Для повышения выхода биомассы проводили оптимизацию состава питательной среды с помощью метода математического планирования эксперимента [16]. На первом этапе оптимизации были исследованы трофические потребности базидиальных грибов. Варьировались различные сочетания источников углерода (глюкоза, подсолнечное масло и сусло) и азота (соевая мука, кукурузный экстракт и пептон), минеральный фон ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,25 г/л) и K_2HPO_4 (2,5 г/л)) оставался без изменений. В каждый вариант питательной среды вводили ПАЦ в соотношении 1:1 с источником углерода. На втором этапе оптимизации проводили полный факторный эксперимент (ПФЭ) с целью получения наибольшего количества биомассы путем изменения концентрации источников питания. ПФЭ был проведен для трех факторов: соевая мука (источник азота, ООО «Сойка», Россия), ПАЦ (АлПАЦ Экстра НВ, ООО «БИА-ХИМ», Россия) и подсолнечное масло (источники углерода, Благо, ООО «Компания «Благо»», Россия) на трех уровнях: максимальном (15 г/л), среднем (10 г/л) и минимальном (5 г/л), число комбинаций варьируемых факторов составило 3^3 . Варианты с минимальным содержанием ПАЦ не были включены в эксперимент, так как это противоречило основной цели эксперимента по эффективной утилизации полисахарида.

Получение ферментного препарата проводили методом твердофазного культивирования штамма *T. hirsuta* МТ-17.24 как имеющего наибольшую ферментативную активность. Затем обросший мицелием гриба субстрат высушивали и измельчали до получения мелкодисперсного порошка, который использовали в дальнейших исследованиях в качестве фер-

ментного препарата.

Определение активности ферментного препарата проводили косвенно по концентрации продуктов деструкции субстрата глюкозооксидазно-пероксидазным методом [17], используя тест-систему «Фотоглюкоза» (Импакт, РФ) и ДНС-методом, заключающимся в количественном определении суммы редуцирующих (восстанавливающих) сахаров [18]. Содержание как глюкозы, так и редуцирующих сахаров, образующихся в результате ферментативной реакции, определяли колориметрическим методом относительно калибровочных растворов и рассчитывали по градуировочному графику, построенному по стандартным растворам глюкозы для обеих методик [18, 19].

Эффективность ферментных препаратов исследовали на растворе ПАЦ (15 г/л) с минерализацией NaCl (или KCl) (50 г/л) и модельной технологической жидкости следующего состава, г/л: ПАЦ – 5–7; ксантановая камедь – 1–5; NaCl (или KCl) – 50. В качестве базового состава модельного бурового технологического раствора принята модель промывочной жидкости на основе полисахаридных структурообразователей. Изменение вязкости исследуемых растворов изучалось с использованием ротационного вискозиметра Fann 35-SA (Fann Instrument Company, США) при скорости перемешивания 300 об./мин. Погрешность измерения вязкости в температурном диапазоне 20–27 °С составила 1–2 мПа·с.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При исследовании целлюлазной активности ПАЦ выступала в качестве единственного источника углерода, что позволило достоверно судить о наличии/отсутствии целлюлазной активности исследуемых штаммов по отношению к ПАЦ. Коэффициент целлюлазной активности, превышающий значение 1, был обнаружен у штаммов *L. necator*, *T. hirsuta* MT-17.24, *F. fomentarius* MT-4.05, *F. pinicola* MT-5.21, *T. versicolor* It-1 (табл. 1). Для дальнейшей работы был выбран наиболее активный штамм – *T. hirsuta* MT-17.24, продемонстрировавший значительную зону просветления (41,7±2,1 мм) и высокий ко-

эффициент целлюлазной активности (10,9).

Результаты эксперимента по определению трофических потребностей (рис. 2) показали, что оптимальными для дальнейшего исследования являлись среды с подсолнечным маслом, соевой мукой и полианионной целлюлозой, так как при использовании данных компонентов в составе питательной среды выход биомассы был наибольшим.

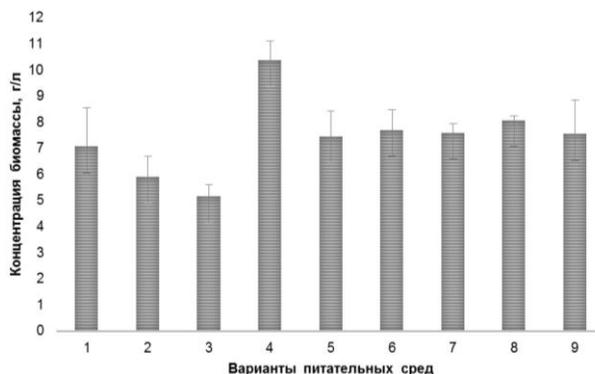


Рис. 2. Исследование трофических потребностей штамма *T. hirsuta* MT-17.24 (состав сред: 1 – глюкоза + соевая мука; 2 – глюкоза + кукурузный экстракт; 3 – глюкоза + пептон; 4 – подсолнечное масло + соевая мука; 5 – подсолнечное масло + кукурузный экстракт; 6 – подсолнечное масло + пептон; 7 – сусло + соевая мука; 8 – сусло + кукурузный экстракт; 9 – сусло + пептон)

Fig. 2. Study of trophic needs of *T. hirsuta* strain MT-17.24 (composition of media: 1 – glucose + soy flour; 2 – glucose + corn extract; 3 – glucose + peptone; 4 – sunflower oil + soy flour; 5 – sunflower oil + corn extract; 6 – sunflower oil + peptone; 7 – wort + soy flour; 8 – wort + corn extract; 9 – wort + peptone)

Результаты ПФЭ (табл. 2) показали, что наибольший выход биомассы (19,7±2,7 г) был получен на среде, в состав которой входили, г/л: соевая мука – 15; подсолнечное масло – 15; полианионная целлюлоза – 15; минеральные соли – MgSO₄·7H₂O (0,25) и K₂HPO₄ (2,5).

Для оценки скорости роста штамма *T. hirsuta* MT-17.24 при твердофазном культивировании были подобраны субстраты, характеристика которых приведена в табл. 3.

Таблица 1. Коэффициенты целлюлазной активности исследуемых штаммов базидиальных грибов

Table 1. Cellulase activity coefficients of the studied basidiomycete strains

Штамм	Диаметр зоны просветления, мм	Диаметр колонии, мм	Коэффициент ферментативной активности
<i>T. hirsuta</i> MT-24.24	47,3±4,2	40,0±2,6	0,4±0,1
<i>L. necator</i>	14,3±5,7	7,7±3,5	2,7±0,6
<i>T. hirsuta</i> MT-17.24	41,7±2,1	16,0±5,3	10,9±2,4
<i>S. commune</i> MT-33.01	44,0±2,6	35,3±4,0	0,6±0,4
<i>F. fomentarius</i> MT-4.05	30,0±5,6	14,3±2,1	3,5±1,2
<i>F. pinicola</i> MT-5.21	24,3±1,5	7,3±1,5	6,9±1,6
<i>T. versicolor</i> It-1	46,0±1,0	18,3±4,6	4,9±1,7

Таблица 2. Результаты реализации полного факторного эксперимента

Table 2. Implementation of the full factorial experiment

Номер среды	X ₁ (соевая мука)	X ₂ (масло)	X ₃ (ПАЦ)	Среднее значение, г/л
1	+	+	+	19,7±2,7
2	+	0	+	10,6±0,1
3	+	-	+	8,8±0,3
4	+	+	0	13,8±1,1
7	+	0	0	11,1±0,01
8	+	-	0	4,6±0,8
10	-	+	+	10,7±1,9
11	-	0	+	9,1±1,0
12	-	-	+	4,1±0,8
13	-	+	0	13,4±0,5
16	-	0	0	9,3±0,6
17	-	-	0	5,9±1,5
19	0	+	+	11,9±0,4
20	0	0	+	9,3±0,04
21	0	-	+	4,9±0,4
22	0	+	0	14,5±1,6
25	0	0	0	9,1±1,3
26	0	-	0	4,6±1,6
28	+	Нет	0	2,2±0,1
29	0	Нет	0	2,0±0,3
30	-	Нет	0	1,9±0,5

Таблица 3. Характеристика субстратов, использованных для исследования скорости роста штамма *T. hirsuta* MT-17.24 при твердофазном культивировании

Table 3. Characteristics of substrates used to study the growth rate of *T. hirsuta* MT-17.24 in solid-phase cultivation

Субстрат	Характеристика	Источник
Отруби пшеничные	Твердые оболочки пшеничных зёрен, оставшиеся после отделения от ядра зерна	Побочный продукт мукомольного производства
Жмых подсолнечника	Твердый остаток после отжима масла из семян подсолнечника	Побочный продукт маслоэкстракционной промышленности
Жом свекловичный	Экстрагированная сечка сахарной свеклы	Отход свеклосахарной промышленности
Шрот соевый	Остаток семян сои, получаемый в процессе отделения масляной части семян от твердой	Побочный продукт маслоэкстракционной промышленности
Дробина пивная	Остаток после варки дроблёного ячменя и экстрагирования сусле; содержит частицы ядер и оболочки зёрен	Отход пивной промышленности

После засева субстратов штаммом *T. hirsuta* MT-17.24 оценивали скорость роста в течение 30-ти суток (рис. 3). Наибольшая скорость роста отмечена на пшеничных отрубях и пивной дробине: полное зарастание столбика субстрата происходило на 17-е и 18-е сутки культивирования соответственно. Эти два субстрата были использованы для получения ферментного препарата. При изучении эффективности действия ферментных препаратов, полученных на разных субстратах, наибольший количественный выход глюкозы наблюдался при использовании ферментного препарата на основе пшеничных отрубей в выбранной для данного исследования максимальной концентрации – 1% (рис. 4). Использование ферментных препаратов на основе выбранных субстратов в концентрациях ниже 1% не позволило получить приемлемые результаты.

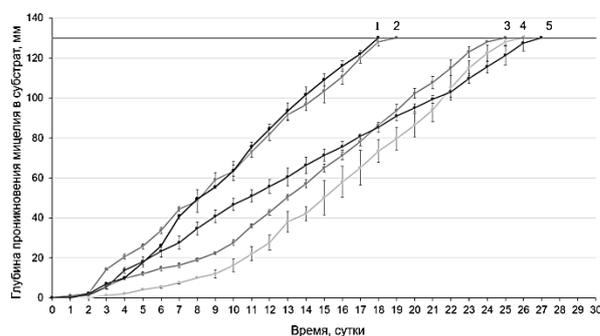


Рис. 3. Динамика роста штамма базидиального гриба *T. hirsuta* MT-17.24 при твердофазном культивировании: 1 – отруби пшеничные; 2 – дробина пивная; 3 – шрот соевый; 4 – жом свекловичный; 5 – жмых подсолнечника

Fig. 3. Dynamics of basidiomycete fungus of *T. hirsuta* MT-17.24 growth at solid-phase cultivation: 1 – wheat bran; 2 – brewer's grain; 3 – soybean meal; 4 – beet pulp; 5 – sunflower cake

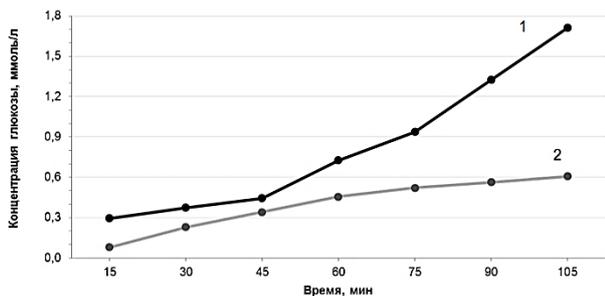


Рис. 4. Изменение концентрации глюкозы при ферментативной деградации ПАЦ:
 1 – фермент/пшеничные отруби;
 2 – фермент/пивная дробина

Fig. 4. Change in glucose concentration during degradation of polyanionic cellulose:
 1 – ferment/wheat bran;
 2 – ferment/brewer's grain

Исследовалось влияние 1%-го ферментного препарата, полученного на основе пшеничных отрубей, на биодеструкцию растворов с разной концентрацией ПАЦ (5 и 15 г/л). По результатам исследования определено, что при увеличении концентрации ПАЦ с 5 до 15 г/л скорость накопления редуцирующих сахаров под действием фермента возрастает в 4,3 раза (рис. 5).

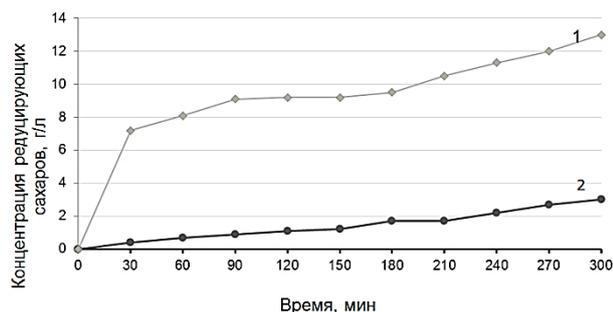


Рис. 5. Изменение концентрации редуцирующих сахаров в растворе ПАЦ:
 1 – раствор ПАЦ (15 г/л);
 2 – раствор ПАЦ (5 г/л)

Fig. 5. Change of the reducing sugars concentration in polyanionic cellulose solution:
 1 – polyanionic cellulose solution (15 g/l);
 2 – polyanionic cellulose solution (5 g/l)

На рис. 6 приведены результаты исследования ферментативного изменения пластической вязкости в минерализованных (NaCl (или KCl) 50 г/л) и неминерализованных модельных смесях полимеров – модельных технологических жидкостях (ПАЦ – 5 г/л, ксантановая камедь – 3 г/л) и растворах ПАЦ (15 г/л). Эффективность действия ферментного препарата определялась снижением пластической вязкости с течением времени. Для изучаемых растворов было показано, что вязкость раствора начинает снижаться при введении фермента уже через несколько минут, а через несколько часов уменьшается кратно, при этом минерализация исследуемых жидкостей в условиях эксперимента не оказыва-

ла значительного влияния на исследуемые зависимости. В контрольных экспериментах снижения вязкости полимерных растворов не наблюдалось. В условиях 10-часового эксперимента наблюдали снижение вязкости минерализованного раствора ПАЦ с 15 до 2 мПа·с и вязкости минерализованной модельной технологической жидкости с 16 до 8 мПа·с.

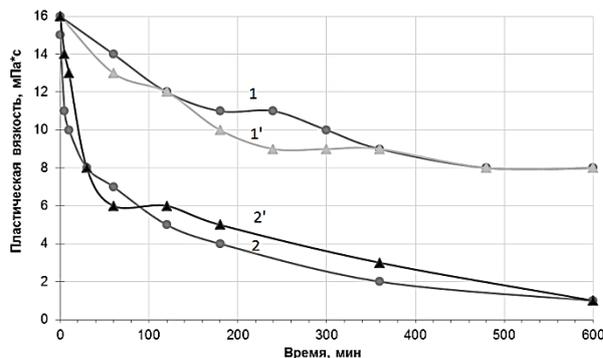


Рис. 6. Изменение показателя пластической вязкости в присутствии 1%-го ферментного препарата:
 1 и 1' – минерализованная и неминерализованная модельная технологическая жидкость;
 2 и 2' – минерализованный и неминерализованный раствор ПАЦ

Fig. 6. Change in the plastic viscosity index in the presence of 1 wt% of enzyme preparation:
 1 and 1' – mineralized and non-mineralized model drilling fluid;
 2 and 2' – mineralized and non-mineralized polyanionic cellulose solution

Дальнейшее изучение изменения вязкости минерализованной модельной технологической жидкости в течение нескольких суток показало, что вязкость раствора не изменялась и по истечении 3-х суток ее значение осталось на уровне 8 мПа·с. Снижение пластической вязкости модельной смеси полимеров до постоянного значения можно объяснить отсутствием достаточной ферментативной активности в отношении ксантановой камеди.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследований подобрана питательная среда для культивирования штамма *T. hirsuta* МТ-17.24 следующего состава: соевая мука (15 г/л), подсолнечное масло (15 г/л), полианионная целлюлоза (15 г/л) и минеральные соли – $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,25 г/л) и K_2HPO_4 (2,5 г/л). Культивирование на данной среде обеспечило выход биомассы в количестве 19,7 г/л. Ферментный препарат получен путем твердофазного культивирования штамма базидиального гриба *T. hirsuta* МТ-17.24, в качестве твердого субстрата выбраны пшеничные отруби.

Установлена эффективность ферментного препарата на основе штамма базидиального гриба *T. hirsuta* МТ-17.24 в биодеструкции ПАЦ –

компонента технологических жидкостей, применяемых в процессе строительства и ремонта нефтяных и газовых скважин. Ферментативная активность полученного препарата была изучена на модельной буровой технологической жидкости. Показано, что биодеструкция раствора ПАЦ концентрацией 15 г/л начинается уже через несколько минут после введения 1% масс. ферментного препарата, по прошествии 10 ч вяз-

кость раствора снижается в 7,5 раз, в то время как вязкость модельной буровой жидкости снижается до определенного значения, что может объясняться незначительной ферментной активностью препарата в отношении ксантановой камеди – компонента модельной смеси, при этом минерализация изучаемых растворов в условиях эксперимента не оказывала значительного влияния на исследуемые зависимости.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mahto V., Sharma V.P. Rheological study of a water based oil well drilling fluid // *Journal of Petroleum Science and Engineering*. 2004. Vol. 45. Issue 1-2. P. 123–128. <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2004.03.008>
2. Gao X., Chang Y., Shi L., Li H., Zhao J., Sha B., et al. Treatment of waste drilling mud by domesticated complex microbial flora // *Acta Microbiologica Sinica*. 2019. Vol. 59. Issue 01. P.134–144. <https://doi.org/10.13343/j.cnki.wsxb.20180093-en>
3. Bland R.G., Clapper D.K., Fleming N.M., Hood C.A. Biodegradation and drilling fluid chemicals. Society of Petroleum Engineers. SPE/IADC Drilling Conference, Amsterdam Netherlands. 22–25 February 1993. <https://doi.org/10.2118/25754-ms>
4. Al-Hameedi A.T.T., Alkinani H.H., Alkhamis M.M., Dunn-Norman S. Utilizing a new eco-friendly drilling mud additive generated from wastes to minimize the use of the conventional chemical additives // *Journal of Petroleum Exploration and Production Technology*. 2020. Vol. 10. P. 3467–3481. <https://doi.org/10.1007/s13202-020-00974-6>
5. Elisashvili V.I., Khardziani T.Sh., Tsiklauri N.D., Kachlishvili E.T. Cellulase and xylanase activities in higher basidiomycetes // *Biochemistry (Moscow)*. 1999. Vol. 64. Issue 6. P. 718–722. <https://doi.org/10.1023/B:WIBI.0000043195.80695.17>
6. Khvedelidze R., Tsiklauri N., Kutateladze L., Sadunishvili T., Darbaidze Z., Kvesitadze E. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic agricultural wastes to fermentable glucose // *Agricultural Research and Technology: Open Access Journal*. 2018. Vol. 17. Issue 5. P. 00199–00205. 556042. <https://doi.org/10.19080/ARTOAJ.2018.17.556042>
7. Максина Е.В., Пименов А.А., Ермаков В.В., Быков Д.Е. Экспериментальная оценка возможности применения ферментативного обезвоживания отработанного бурового раствора // *Нефтяное хозяйство* 2014. N 9. С. 125-127.
8. Kozhevnikova E.Y., Petrova D.A., Novikov A.A., Shnyreva A.V., Barkov A.V., Vinokurov V.A. Prospects for the use of new basidiomycete strains for the direct conversion of lignocellulose into ethanol // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2017. Vol. 53. Issue 5. P. 557–561. <https://doi.org/10.1134/S0003683817050106>
9. Максина Е.В., Ермаков В.В. Биологическая деструкция отработанных полисахаридсодержащих буровых растворов // *Экология и промышленность России*. 2016. Т. 20. N 9. С. 12–15. <https://doi.org/10.18412/1816-0395-2016-9-12-15>
10. Karlsson J., Momcilovic D., Wittgren B., Schüle M., Tjerneld F., Brinkmalm G. Enzymatic degradation of carboxymethyl cellulose hydrolyzed by the endoglucanases Cel5A, Cel7B, and Cel45A from *Humicola insolens* and Cel7B, Cel12A and Cel45Acore from *Trichoderma reesei* // *Biopolymers*. 2001. Vol. 63. Issue 1. P. 32–40. <https://doi.org/10.1002/bip.1060>
11. Kozhevnikova E.Y., Petrova D.A., Novikov A.A., Shnyreva A.V., Barkov A.V., Vinokurov V.A. Prospects for the use of new basidiomycete strains for the direct conversion of lignocellulose into ethanol // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2017. Vol. 53. Issue 5. P. 557–561. <https://doi.org/10.1134/S0003683817050106>
12. Betty Anita B., Thatheyus A.J., Ramya D. Biodegradation of carboxymethyl cellulose using *Aspergillus flavus* // *Science International*. 2013. Vol. 1. Issue 4. P. 85–91. <https://doi.org/10.17311/sciintl.2013.85.91>
13. Kozhevnikova E.Y., Petrova D.A., Kopitsyn D.S., Novikov A.A., Shnyreva A.V., Barkov A.V., et al. New strains of basidiomycetes that produce bioethanol from lignocellulose biomass // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2016. Vol. 52. Issue 6. P. 638–642. <https://doi.org/10.1134/S0003683816060090>
14. Kasana RC, Salwan R, Dhar H, Dutt S, Gulati A. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. *Current Microbiology*. 2008;57(5):503–507. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9276-8>
15. Bradner J.R., Gillings M., Nevalainen K.M.H. Qualitative assessment of hydrolytic activities in Antarctic microfungi grown at different temperatures on solid media // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1999. Vol. 15. Issue 1. P. 131–132. <https://doi.org/10.1023/A:1008855406319>
16. Kreutz C., Timmer J. Systems biology: experimental design // *The FEBS Journal*. 2009. Vol. 276. Issue 4. P. 923–942. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06843.x>
17. Bisswanger H. Practical enzymology. Second, completely revised edition. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH and Co, 2011. 376 p.
18. Miller 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>
19. Ghose T.K. Measurement of cellulase activities

REFERECES

1. Mahto V, Sharma VP. Rheological study of a water based oil well drilling fluid. *Journal of Petroleum Science and Engineering*. 2004;45(1-2):123–128. <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2004.03.008>
2. Gao X, Chang Y, Shi L, Li H, Zhao J, Sha B, et al. Treatment of waste drilling mud by domesticated complex microbial flora. *Acta Microbiologica Sinica*. 2019;59(01):134–144. <https://doi.org/10.13343/j.cnki.wsxb.20180093-en>
3. Bland RG, Clapper DK, Fleming NM, Hood CA. Biodegradation and drilling fluid chemicals. Society of Petroleum Engineers. SPE/IADC Drilling Conference, Amsterdam Netherlands. 22–25 February 1993. <https://doi.org/10.2118/25754-ms>
4. Al-Hameedi ATT, Alkinani HH, Alkhamis MM, Dunn-Norman S. Utilizing a new eco-friendly drilling mud additive generated from wastes to minimize the use of the conventional chemical additives. *Journal of Petroleum Exploration and Production Technology*. 2020;10:3467–3481. <https://doi.org/10.1007/s13202-020-00974-6>
5. Elisashvili VI, Khardziani TSh, Tsiklauri ND, Kachlishvili ET. Cellulase and xylanase activities in higher basidiomycetes. *Biochemistry (Moscow)*. 1999;64(6):718–722. <https://doi.org/10.1023/B:WIBI.000043195.80695.17>
6. Khvedelidze R, Tsiklauri N, Kutateladze L, Sadunishvili T, Darbaidze Z, Kvesitadze E. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic agricultural wastes to fermentable glucose. *Agricultural Research and Technology: Open Access Journal*. 2018;17(5):00199–00205. 556042. <https://doi.org/10.19080/ARTOAJ.2018.17.556042>
7. Maksina EV, Pimenov AA, Ermakov VV, Bykov DE. Experimental estimation of possibility of application of enzymatic dewatering waste drilling mud. *Neftyanoe khozyaystvo = Oil Industry*. 2014;9:125–127. (in Russian)
8. Kozhevnikova EY, Petrova DA, Novikov AA, Shnyreva AV, Barkov AV, Vinokurov VA. Prospects for the use of new basidiomycete strains for the direct conversion of lignocellulose into ethanol. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2017;53(5):557–561. <https://doi.org/10.1134/S0003683817050106>
9. Maksina EV, Ermakov VV. Biological destruction of a polysaccharide containing waste drilling. *Ekologia i promyshlennost Rossii = Ecology and Industry of Russia*. 2016;20(9):12–15. (In Russian) <https://doi.org/10.18412/1816-0395-2016-9-12-15>
10. Karlsson J, Momcilovic D, Wittgren B, Schülein M, Tjerneld F, Brinkmalm G. Enzymatic degradation of carboxymethyl cellulose hydrolyzed by the endoglucanases Cel5A, Cel7B, and Cel45A from *Humicola insolens* and Cel7B, Cel12A and Cel45Acore from *Trichoderma reesei*. *Biopolymers*. 2001;63(1):32–40. <https://doi.org/10.1002/bip.1060>
11. Kozhevnikova EY, Petrova DA, Novikov AA, Shnyreva AV, Barkov AV, Vinokurov VA. Prospects for the use of new basidiomycete strains for the direct conversion of lignocellulose into ethanol. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2017;53(5):557–561. <https://doi.org/10.1134/S0003683817050106>
12. Betty Anita B, Thatheyus AJ, Ramya D. Biodegradation of carboxymethyl cellulose using *Aspergillus flavus*. *Science International*. 2013;1(4):85–91. <https://doi.org/10.17311/sciintl.2013.85.91>
13. Kozhevnikova EY, Petrova DA, Kopitsyn DS, Novikov AA, Shnyreva AV, Barkov AV, et al. New strains of basidiomycetes that produce bioethanol from lignocellulose biomass. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2016;52(6):638–642. <https://doi.org/10.1134/S0003683816060090>
14. Kasana RC, Salwan R, Dhar H, Dutt S, Gulati A. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. *Current Microbiology*. 2008;57(5):503–507. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9276-8>
15. Bradner JR, Gillings M, Nevalainen KMH. Qualitative assessment of hydrolytic activities in Antarctic microfungi grown at different temperatures on solid media. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1999;15(1):131–132. <https://doi.org/10.1023/A:1008855406319>
16. Kreutz C, Timmer J. Systems biology: experimental design. *The FEBS Journal*. 2009;276(4): 923–942. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06843.x>
17. Bisswanger H. *Practical enzymology*. 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH and Co; 2011. 376 p.
18. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 1959;31(3):426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
19. Ghose TK. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*. 1987;59(2):257–268. <https://doi.org/10.1351/pac198759020257>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Зубченко Анастасия Валентиновна,
магистрант,
Российский государственный университет
нефти и газа (НИУ) им. И.М. Губкина,
119991, г. Москва, Ленинский пр-т, 65/1,
Российская Федерация,
✉ e-mail: zubchenkoan@yandex.ru

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Anastasia V. Zubchenko,
Master Student,
Gubkin University (National University
of Oil and Gas),
65/1, Leninskii Ave., Moscow, 119991,
Russian Federation,
✉ e-mail: zubchenkoan@yandex.ru

Кожевникова Елена Юрьевна,
к.х.н., ведущий инженер,
Российский государственный университет
нефти и газа (НИУ) им. И.М. Губкина,
119991, г. Москва, Ленинский пр-т, 65/1,
Российская Федерация,
e-mail: elena_karpova89@bk.ru

Барков Артем Вадимович,
к.б.н., ведущий инженер,
Российский государственный университет
нефти и газа (НИУ) им. И.М. Губкина,
119991, г. Москва, Ленинский пр-т, 65/1,
Российская Федерация,
e-mail: barkov220@gmail.com

Тополук Юлия Анатольевна,
к.т.н., доцент,
Российский государственный университет
нефти и газа (НИУ) им. И.М. Губкина,
119991, г. Москва, Ленинский пр-т, 65/1,
Российская Федерация,
e-mail: topolyuk.y@gubkin.ru

Шнырева Алла Викторовна,
д.б.н., профессор,
Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова,
119234, Москва, Ленинские горы, 1/12,
Российская Федерация,
e-mail: ashn@mail.ru

Винокуров Владимир Арнольдович,
д.х.н., профессор,
Российский государственный университет
нефти и газа (НИУ) им. И.М. Губкина,
119991, г. Москва, Ленинский пр-т, 65/1,
Российская Федерация,
e-mail: inok.ac@mail.ru

Магадова Любовь Абдулаевна,
д.т.н., профессор,
Российский государственный университет
нефти и газа (НИУ) им. И.М. Губкина,
119991, г. Москва, Ленинский пр-т, 65/1,
Российская Федерация,
e-mail: lubmag@gmail.com

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 09.07.2021.
Одобрена после рецензирования 26.08.2021.
Принята к публикации 30.08.2021.*

Elena Yu. Kozhevnikova,
Cand. Sci (Chemistry), Leading Engineer,
Gubkin University (National University
of Oil and Gas),
65/1, Leninskii Ave., Moscow, 119991,
Russian Federation,
e-mail: elena_karpova89@bk.ru

Artem V. Barkov,
Cand. Sci (Biology), Leading Engineer,
Gubkin University (National University
of Oil and Gas),
65/1, Leninskii Ave., Moscow, 119991,
Russian Federation,
e-mail: barkov220@gmail.com

Yulia A. Topolyuk,
Cand. Sci (Engineering), Associate Professor,
Gubkin University (National University
of Oil and Gas),
65/1, Leninskii Ave., Moscow, 119991,
Russian Federation,
e-mail: topolyuk.y@gubkin.ru

Alla V. Shnyreva,
Dr. Sci (Biology), Professor,
Moscow State University
named after M.V. Lomonosov,
1/12, Leninskie gory, Moscow, 119234,
1, building 12, Faculty of Biology,
Russian Federation,
e-mail: ashn@mail.ru

Vladimir A. Vinokurov,
Dr. Sci (Chemistry), Professor,
Gubkin University (National University
of Oil and Gas),
65/1, Leninskii Ave., Moscow, 119991,
Russian Federation,
e-mail: inok.ac@mail.ru

Lyubov A. Magadova,
Dr. Sci (Engineering), Professor,
Gubkin University (National University
of Oil and Gas),
65/1, Leninskii Ave., Moscow, 119991,
Russian Federation,
e-mail: lubmag@gmail.com

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 09.07.2021.
Approved after reviewing 26.08.2021.
Accepted for publication 30.08.2021.*

Оригинальная статья / Original article

УДК 625.7.06; 665.61

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-481-490>



Трансформация нефтяных дисперсных систем в процессе эксплуатации

© В.Д. Черепанов*, С.Г. Дьячкова*, И.Е. Кузора**,
Д.А. Дубровский**, В.И. Лукина*

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

**АО «Ангарская нефтехимическая компания»,
г. Ангарск, Российская федерация

Резюме: На примере нефтяных дорожных битумов марок БНД 100/130, БНД 130/200 и БНД 70/100 проведено исследование трансформации нефтяных дисперсных систем в условиях различных логистических схем эксплуатации. В результате проведенных исследований определено влияние условий хранения дорожных битумов различных марок на их физико-механические свойства и групп углеводородный состав в процессе транспортировки от производителя к потребителю. Установлено, что изменение физико-механических свойств дорожных битумов при высокотемпературном хранении связано с переменами группового углеводородного состава вследствие автоокисления углеводородов и дестабилизации коллоидной структуры дисперсных систем. Определены условия хранения битума с минимальным изменением показателей его качества. Установлено, что хранение битума при атмосферных условиях позволяет сохранить его первоначальные свойства без существенных изменений. Доказано, что продувка азотом значительно снижает влияние гомолитических процессов, приводящих к трансформации нефтяных дисперсных систем в процессе дальнейшей транспортировки от производителя к потребителю. Экспериментально подтверждено, что из всех основных физико-механических свойств битума наиболее чувствительным показателем является «глубина проникновения иглы», в то время как часто используемый для контроля качества битума показатель «температура размягчения» является инерционным. Выведено уравнение для определения изменения пенетрации от продолжительности хранения битума. Установлено, что каждый час при хранении дорожного битума при температуре 180 °С показатель глубины проникновения иглы при 25 ° снижается на 0,8 ед. Определены организационные и технические мероприятия для обеспечения стабильности качества дорожных битумов при производстве, хранении и транспортировке до потребителей.

Ключевые слова: дорожные битумы, нефтяные дисперсные системы, групповой углеводородный состав, хранение битумов, глубина проникновения иглы, температура размягчения

Для цитирования: Черепанов В.Д., Дьячкова С.Г., Кузора И.Е., Дубровский Д.А., Лукина В.И. Трансформация нефтяных дисперсных систем в процессе эксплуатации. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т. 11. N 3. С. 481–490. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-481-490>

Transformation of oil dispersed systems during operation

Vadim D. Cherepanov, Svetlana G. D'yachkova, Igor I. Kuzora,
Dmitriy A. Dubrovskii, Viktoriya I. Lukina

* Irkutsk National Research Technical University,
Irkutsk, Russian Federation

** SC "Angarsk petrochemical company",
Angarsk, Russian Federation

Abstract: Using the example of oil road bitumen grades BND 100/130, BND 130/200 and BND 70/100, this article studies the transformation of oil dispersed systems under various logistic schemes of operation. This research focuses on the influence of the conditions for storing road bitumens of different grades on their physical and mechanical properties and group hydrocarbon composition during transportation from the manufacturer to the consumer. The results show that a change in the physical and mechanical properties of road bitumens during high-temperature storage is related to the changes in the group hydrocarbon composition due to the hydrocarbons autooxidation and destabilization of the colloidal structure of dispersal systems.

The conditions for storing bitumen with a minimum change in its quality indicators have been determined. It has been established that storage of bitumen under atmospheric conditions allows preserving its original properties without significant changes. There is evidence that nitrogen purging significantly reduces the effect of homolytic processes leading to the transformation of oil dispersed systems during further transportation from the manufacturer to the consumer. Experimental data confirm that of all basic physical and mechanical properties of bitumen, "the depth of penetration of needle" is the most sensitive index, while the "softening temperature" index, frequently used for quality control of bitumen, is inertial. Determining the change in penetration, depending on the duration of storing bitumen, has required formulating a special equation. It has been established that when storing road bitumen at a temperature of 180 °C, for each hour the index of the penetration depth of the needle at 25 ° decreases by 0.8 units. Organizational and technical measures have been determined to ensure the stability of the road bitumen quality during manufacture, storage and transportation to consumers.

Keywords: road bitumens, petroleum dispersal systems, group hydrocarbon composition, storage of bitumens, depth of needle penetration, softening temperature

For citation: Cherepanov VD, D'yachkova SG, Kuzora IG, Dubrovskii DA, Lukina VI. Transformation of oil dispersed systems during operation. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(3):481–490. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-481-490>

ВВЕДЕНИЕ

Нефтяные дисперсные системы с жидкой дисперсионной средой наиболее широко представлены золями, гелями и суспензиями. Нефтяные дорожные битумы – дисперсные системы, имеющие твердую или вязкую консистенцию, в которых дисперсионной средой являются ароматические углеводороды, масла и смолы, а дисперсной фазой – асфальтены [1–4].

Наиболее распространенный метод получения нефтяных битумов в промышленности – окисление кислородом воздуха остаточных нефтепродуктов: гудронов, асфальта, крекинг-остатков или экстрактов от селективной очистки масел и их смесей. Процесс является непрерывным. Об окончании процесса окисления судят по моменту, когда физико-механические характеристики битума удовлетворяют требованиям нормативной документации на вырабатываемую марку дорожного битума. Следует отметить, что процесс производства битума обрывается простым снижением температуры, при этом в коллоидной системе остается растворенный кислород и свободные радикалы, способные активизировать дальнейшие гомолитические процессы и, как следствие, постпроизводственную трансформацию молекулярной системы [5, 6].

Важным аспектом при использовании битумов является стабильность физико-механических свойств в процессе хранения и эксплуатации. Вместе с тем сведения о трансформации этих сложных нефтяных дисперсных систем в ходе производственного процесса и дальнейшей доставки потребителю очень ограничены. В основном это касается изменения их физико-механических свойств в процессе старения и приготовления асфальтобетонных смесей и дальнейших этапов их использования [7–14].

Целью исследования являлось выявление закономерностей и причин изменения характе-

ристик нефтяных дисперсных систем в ходе их использования, что позволит найти новые подходы и методы их стабилизации, увеличить сроки хранения дорожных битумов, сократить количество некондиционного продукта.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектами исследования являлись дорожные нефтяные битумы трех марок:

– БНД 100/130 – товарный продукт, полученный на битумном производстве по типичной технологии окисления остаточных нефтепродуктов кислородом воздуха с использованием пустотелых колонн-окислителей;

– БНД 70/100 и БНД 130/200 – образцы, полученные в лабораторных условиях.

Получение битумов марок БНД 70/100 и БНД 130/200. Битумы получали из стандартного смесового сырья на пилотной установке по окислению остаточных нефтепродуктов периодического действия, моделирующей промышленный процесс (рис. 1). Параметры технологического режима представлены в табл. 1.

Описание технологической схемы. Сетевые газы (воздух, азот), подогреваясь в теплообменнике (1), поступают в колонну окисления (2), где барботируются через сырье. По завершению процесса слив готового продукта осуществляется с низа колонны окисления (здесь же осуществляется промежуточный отбор проб). Побочные газообразные продукты окисления по выходе из колонны окисления конденсируются в теплообменнике (3) и поступают на разделение в сепаратор (4). С низа сепаратора дренируются жидкие продукты (черный соляр), а газы окисления с верха сепаратора сбрасываются в вытяжную вентиляцию.

Термостатирование битума проводили с использованием сушильного шкафа марки СНОЛ 3.5. Перемешивание осуществляли вручную.

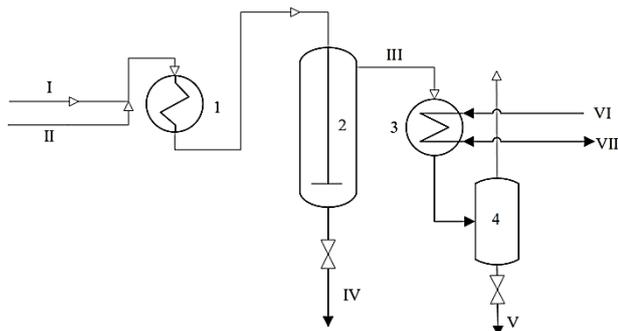


Рис. 1. Принципиальная схема пилотной установки окисления остаточных нефтепродуктов:
1 – воздухоподогреватель, 2 – колонна окисления, 3 – теплообменник, 4 – сепаратор. I – воздух, II – азот, III – газы окисления, IV – битум, V – черный соляр, VI – прямая вода, VII – обратная вода

Fig. 1. Basic technological scheme of oil residues pilot oxidation plant:
1 – air heater, 2 – oxidation column, 3 – heat exchanger, 4 – separator; I – air, II – nitrogen, III – exhaust, IV – bitumen, V – black solar, VI – cooling water, VII – recycled water

Эксперимент 1. Изучение изменения группового состава и физико-химических свойств битума в ходе технологического процесса. Отбор проб осуществляли на битумном производстве в условиях технологического процесса из шести идентичных товарных емкостей объемом 400 м³, загруженных на 3/4. Температура битума в емкостях на протяжении всего эксперимента составляла 180±5 °С. Результаты полученных характеристик битума из шести товарных емкостей усредняли. Положение уровня дорожного битума по отношению к верхней границе нефтепродукта по мере опорожнения емкости было выбрано нами для оценки изменений качества продукта от времени. Отбор проб из емкостей осуществляли при опорожнении емкостей на 1 и 8 м от начального уровня. Усредненная скорость слива битума из емкостей составляла 0,14 м/ч.

Эксперимент 2. Исследование влияния времени хранения горячего образца битума на глубину проникновения иглы:

А. Образец битума марки БНД 100/130 термостатировали в закрытом бьюксе при 180 °С в течение 56 ч. Через каждые 8 ч отбирали пробы и определяли значение глубины проникновения иглы при 25 °С.

Б. Пробу битума марки БНД 70/100 (либо БНД 130/200) термостатировали при температуре 180 °С в течение 24 ч, имитируя таким образом хранение дорожного битума в товарных емкостях на битумном производстве. Затем в пробе определяли нормируемые характеристики согласно государственному стандарту.

Эксперимент 3. Изучение влияния температуры хранения. Дорожный битум марки БНД 100/130 поместили в пять идентичных емкостей объемом 1 дм³ и нагрели до температуры, °С: первую – до 120; вторую – до 140; третью – до 160; четвертую – до 180; пятую – до 200. По достижении заданной температуры пробы термостатировали при перемешивании в течение 48 ч. Емкости с битумом охлаждали до комнатной температуры и анализировали.

Эксперимент 4. Изучение трансформации дорожного битума в условиях имитации разных логистических схем хранения. Объекты исследований – дорожные битумы двух марок БНД 70/100 и БНД 130/200. Пробы каждой марки битума, отобранные из колонны окисления, разделили на две части (А-В):

А. Образец битума марки БНД 70/100 (либо БНД 130/200) охлаждали до 20–22 °С и хранили при этой температуре в течение трех недель, имитируя сезонное хранение в необогреваемых складах или потребительской таре. Образец битума разогревали до температуры 180 °С в течение 2 ч, определяли нормируемые характеристики согласно государственному стандарту.

Б. Образец битума марки БНД 70/100 (либо БНД 130/200) охлаждали до температуры 15–25 °С, в течение семи суток хранили в твердом состоянии, затем разогревали и выдерживали

Таблица 1. Параметры технологического режима при получении лабораторных образцов битума

Table 1. Pilot plant's technological mode parameters

Параметры технологического режима	Марка битума	
	БНД 70/100	БНД 130/200
Состав сырья, % масс.:		
асфальт	13,5	15,0
гудрон	86,5	85,0
Температура воздуха на входе в колонну окисления, °С	25	25
Температура газов окисления, °С	125	125
Температура внизу колонны окисления, °С	260	260
Расход газа в колонну окисления, дм ³ /мин	8,0	7,5
Давление газа в колонне окисления, кгс/см ²	0,5	0,45
Давление газа после колонны окисления, кгс/см ²	0,06	0,15

при температуре 180 °С в течение 24 ч. Процедуру «нагрев–охлаждение» повторяли на протяжении трех недель, имитируя таким образом транспортировку и перевалку дорожного битума в терминалах. В пробах битума определяли нормируемые по стандарту характеристики.

Эксперимент 5. Исследование влияния продувки азотом на характеристики битума. Через битум марки БНД 70/100 в колонне-окислителе пилотной установки (см. рис. 1) барботировали азот при следующих условиях: расход азота – 6 дм³/мин, давление в колонне окисления – 0,5 кгс/см², продолжительность – 30 мин. Пробы битума отбирали согласно ГОСТ 2517-2012 через 15 и через 30 мин после начала продувки. Пробы выдерживали в течение 24 ч при температуре 180 °С, затем анализировали.

Испытания проб дорожного битума проводили по стандартизированным методикам:

1) глубина проникновения иглы при 0 и 25 °С – по ГОСТ 33136-2014 с использованием автоматического пенетрометра ПН-20Б;

2) температура размягчения по кольцу и шару – по ГОСТ 33142 -2014 с использованием автоматического аппарата АКШ-02;

3) температура хрупкости – по ГОСТ 33143-2014 с использованием аппарата для определения механической прочности нефтепродуктов Walter Herzog HZ7261;

4) изменение массы образца после старения – по ГОСТ 33140-2014 с использованием печи для испытаний свойств старения битума К88000;

5) изменение температуры размягчения после старения – по ГОСТ 33140-2014 и ГОСТ 33142-2014 с использованием печи для испытаний свойств старения битума К88000;

6) индекс пенетрации – по ГОСТ 33134-2014;

7) растяжимость при 0 и 25 °С – по ГОСТ 33138-2014 с использованием аппарата для определения растяжимости битума с датчиками усилия ДА-03-100;

8) групповой углеводородный состав битума определялся по IP 469 с использованием анализатора latroscanMarkV методом тонкослойной хроматографии с пламенно-ионизационным детектором и с кварцевыми стержнями ChromarodTM типа SIII.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Объектом нашего исследования являлись дорожные битумы марок БНД 100/130, БНД 70/100, БНД 130/200, различающиеся по химическому составу и вторичной структуре полидисперсной системы и, как следствие, имеющие разные эксплуатационные характеристики, нормируемые в ГОСТ 33133-2014. Эти показатели наиболее чувствительны к воздействию временных и технологических факторов, и именно по ним можно судить о глубине и направленности трансформации дисперсных систем тяжелых нефтяных остатков в процессе эксплуатации

На примере дорожного битума марки БНД 100/130 было изучено изменение во времени группового углеводородного состава и физико-эксплуатационных свойств дорожного битума в условиях технологического процесса – затаривания и хранения в товарных емкостях при температуре 180±5°С (эксперимент 1). Данный подход позволяет оценить одновременно два фактора – меру трансформации дисперсной системы в результате продолжающихся окислительных процессов и агрегативную и седиментационную устойчивость коллоидной системы битума. Усредненные характеристики проб дорожного битума, полученного из шести емкостей по мере их опорожнения, сравнивали с таковыми для пробы, отобранной на паспортизацию после циркуляции. Усредненные по всем шести емкостям результаты зависимости глубины проникновения иглы и группового углеводородного состава дорожного битума от времени с начала слива емкостей представлены на рис. 2 (точка 0).

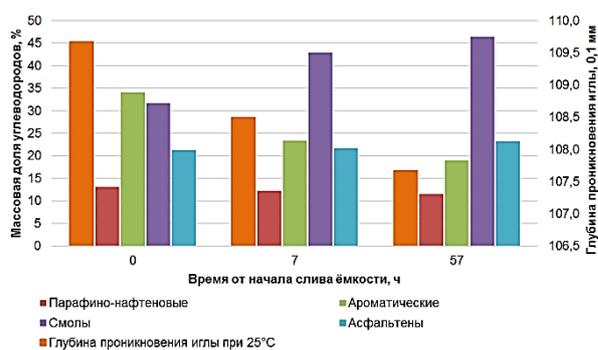


Рис. 2. Изменение группового углеводородного состава (парафины, ароматические углеводороды, смолы, асфальтены) и глубины проникновения иглы дорожного битума марки БНД 100/130 в процессе откачки товарных емкостей

Fig. 2. SARA (Saturates, Aromatics, Resins, and Asphaltenes) and penetration change in bitumen shipment process

Показано, что такие характеристики, как температура размягчения и изменение массы образца после старения, полученные для образцов битума, отобранных по мере опорожнения товарных емкостей, практически не изменились, в то время как глубина проникновения иглы, характеризующая пластичность битумов, снизилась. Исследование группового углеводородного состава дорожного битума марки БНД 100/130 показало, что со временем содержание ароматических углеводородов в пробах снижается, а смол – повышается. Содержание парафино-нафтеновых углеводородов и асфальтенов не меняется, либо изменения не превышают прецизионности метода испытания.

Установленную динамику в групповом углеводородном составе можно объяснить, с одной стороны, нестабильностью коллоидной системы

битума, что выражается на начальном этапе в потере агрегативной устойчивости, обусловленной в коагуляции асфальтеновых ассоциатов с увеличением их массы, а затем и седиментационной, выраженной в осаждении смол и асфальтенов в нижнюю часть емкости, с другой – продолжающимся окислением, приводящим к снижению концентрации ароматических углеводородов и увеличению концентрации смол и асфальтеновых кислот, которые стабилизируют коллоидную систему битума, замедляя процесс седиментации. Однозначно оценить вклад в трансформацию нефтяной дисперсной системы каждого из этих процессов исходя из полученных данных не представляется возможным.

Результаты мониторинга изменения группового состава и эксплуатационных свойств битума в условиях технологического процесса полностью согласуются с лабораторным экспериментом (эксперимент 2 А). Установлено, что в термостатируемом при заданной температуре (180 °С) образце дорожного битума марки БНД 100/130 со временем наблюдается снижение глубины проникновения иглы (рис. 3).

Термостатирование при 180 °С образцов дорожных битумов марок БНД 70/100 и БНД 130/200, имитирующее хранение в товарных емкостях битумного производства (эксперимент 2 Б), также приводит к снижению пенетрации (табл. 2), что полностью коррелирует с данными, полученными по результатам натурных испытаний, проведенных в товарных емкостях с битумом марки БНД 100/130 (эксперимент 1, см. рис. 2).

Следовательно, при термостатировании дисперсной системы пенетрация является функцией времени: $P = f(t)$. Получено линейное уравнение, отражающее эту функциональную зависимость:

$$P = -0,8185t + 125,92,$$

где P – пенетрация; t – время термостатирования, ч.

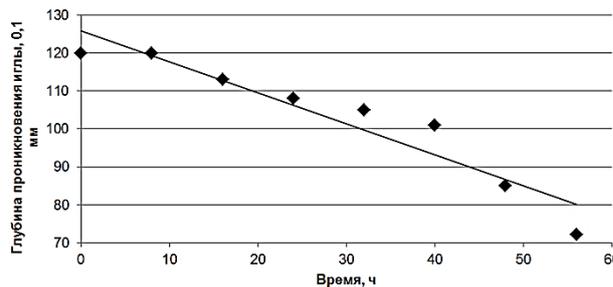


Рис. 3. Зависимость глубины проникновения иглы при 25 °С от продолжительности хранения битума при 180 °С

Fig. 3. Relationship between the needle penetration depth at 25 °С and bitumen storage duration at 180 °С

Величина достоверности аппроксимации (R^2), характеризующая близость функции данного вида, с помощью которой можно аппроксимировать построенный по данным таблицы график, к фактическим данным для приведенного уравнения, равна 0,9021, т.е. близка к единице, что говорит о достаточно высокой достоверности линии тренда.

Согласно полученной зависимости величина изменения пенетрации равна 0,8 град. пенетрации в час. Экспериментальные данные хорошо согласуются с расчетными. Коэффициент корреляции Пирсона составляет 0,95. Его доверительный интервал изменяется от 0,7384 до 0,9940 при уровне доверия 95%.

Известно, что в условиях хранения битума активно идут процессы автоокисления [15–17], влияющие на его характеристики. Процессы окисления находятся в кинетической области, следовательно,

Таблица 2. Изменение качества товарного битума в процессе хранения при температуре 180 °С

Table 2. Change in the quality of bitumen during storage at 180 °С

Показатель	Нормы по ГОСТ 33133 для битумов		Время выдержки образца битума, ч			
			БНД 130/200		БНД 70/100	
	БНД 130/200	БНД 70/100	0	24	0	24
Глубина проникновения иглы при 25 °С, 0,1мм	131–200	71–100	142	125	86	84
Температура размягчения по кольцу и шару, °С	не ниже 42	не ниже 47	42	42	47	47
Растяжимость при 25 °С, см	не менее 80	не менее 62	> 100	> 100	> 100	> 100
Температура хрупкости по Фраасу, °С	не выше -21	не выше -18	-22	-22	-20	-20
Изменение массы образца после старения, %	не более 0,8	не более 0,6	0,2	0,0	0,0	0,0
Изменение температуры размягчения после старения, °С	не более 7	не более 7	7	6	8	7
Индекс пенетрации	от -1,0 до 1,0	от -1,0 до 1,0	-0,6	-1,1	-0,6	-0,7

температура значительно влияет на скорость процесса¹. И действительно, на примере образца товарного битума марки БНД 100/130 нами было показано (эксперимент 3), что с увеличением температурного режима хранения битума снижаются такие показатели, как глубина проникновения иглы и растяжимость при 25 °С. Вместе с тем температура хрупкости увеличивается (табл. 3), что можно объяснить процессами агрегативной трансформации дисперсной системы. Проведенные исследования в работе [18] показали схожую тенденцию изменения эксплуатационных характеристик битума при использовании метода RTFOT при различных температурах.

С целью изучения трансформации нефтяных дисперсных систем в процессе эксплуатации были проведены лабораторные эксперименты с дорожными битумами двух марок – БНД 70/100 и

БНД 130/200. Условия экспериментов имитировали разные схемы транспортировки и хранения дорожного битума (эксперимент 4 А, Б). Снижение значительной глубины проникновения иглы при 25 °С битума, находившегося на холодном хранении (эксперимент 4 А), не было обнаружено, что обусловлено его агрегатным состоянием при данных условиях и, как следствие, невозможностью протекания как химических реакций, так и внутренних изменений, связанных с трансформацией его коллоидной структуры (табл. 4). Аналогичные результаты были получены даже при более высоких температурах хранения [19, 20].

В эксперименте по имитации условий транспортировки и перевалки битума в терминалах (эксперимент 4 Б, рис. 4) наблюдается значительное изменение пенетрации образца дорожного битума

Таблица 3. Изменения физико-механических свойств дорожного битума марки БНД 100/130

Table 3. Changes in physical and mechanical properties of road bitumen 100/130

Показатель	Образец битума БНД 100/130	Температура хранения, °С				
		120	140	160	180	200
Глубина проникания иглы, 0,1 мм, при температуре, °С:						
0	39	32	39	33	34	29
25	101	102	100	95	86	87
Температура размягчения по кольцу и шару, °С	44	46	45	47	48	49
Растяжимость, см, при температуре, °С:						
0	3,8	4,1	4,2	4,0	3,8	3,8
25	74	76	76	72	68	47
Температура хрупкости, °С	-23	-26	-26	-27	-29	-29
Изменение массы после старения, %	0,3	0,6	0,3	0,3	0,9	0,3
Изменение температуры размягчения после старения, °С	7	6	6	9	6	6
Индекс пенетрации	-1,1	-0,4	-0,8	-0,3	-0,3	-0,0

Таблица 4. Изменение качества товарного битума в процессе длительного «холодного» хранения

Table 4. Change in bitumen quality during long term “cold” storage

Показатель	Нормы для битума БНД 130/200 по ГОСТ 33133	Исходный битум	Через три недели «холодного» хранения	Нормы для битума БНД 70/100 по ГОСТ 33133	Исходный битум	Через три недели «холодного» хранения
Глубина проникновения иглы, 0,1 мм, при температуре, °С:						
0	40	42	42	–	–	–
...25	131–200	142	143	71–100	86	85
Температура размягчения по кольцу и шару, °С	не ниже 42	42	42	не ниже 47	47	47
Растяжимость, см, при температуре, °С:						
0	не менее 6,0	6,3	6,3	–	–	–
25	не менее 80	> 100	> 100	не менее 62	> 100	> 100
Температура хрупкости по Фраасу, °С	не выше -21	-22	-24	не выше -18	-20	-20
Изменение массы образца после старения, %	не более 0,8	0,2	0,01	не более 0,6	0,0	0,02
Изменение температуры размягчения после старения, °С	не более 7	7	8	не более 7	7	6
Индекс пенетрации	от -1,0 до +1,0	-1,0	-0,8	от -1,0 до +1,0	-0,6	-0,8

¹Магарил Р.З. Теоретические основы химических процессов переработки нефти: учеб. пособие для студентов вузов. М.: КДУ, 2010. 278 с.

по сравнению с этим показателем в начале эксперимента. Это можно объяснить неравномерностью прогрева всего объема и локальным перегревом битума у стенок змеевиков, приводящих к дестабилизации коллоидной системы.

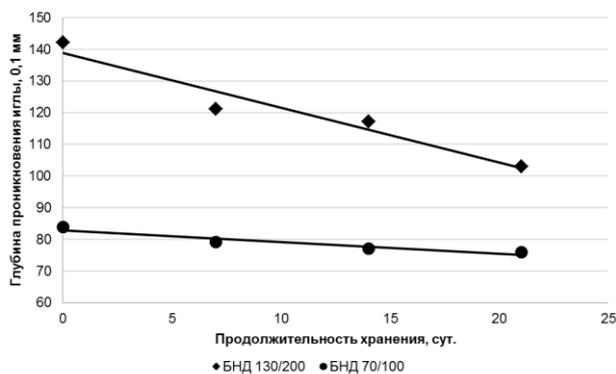


Рис. 4. Изменение глубины проникновения иглы при 25 °С в образцах дорожных битумов БНД 130/200 и БНД 70/100 в эксперименте 3 Б по имитации транспортировки и перевалки дорожного битума в терминалах

Fig. 4. Change in needle penetration depth at 25 °С in road bitumen: 130/200 and 70/100 for simulated transport and trans-shipment of road bitumen in terminals

Таким образом, логистические схемы хранения дорожного битума, сопровождающиеся циклическими процессами разогрева–охлаждения приводят к максимальной трансформации дисперсных систем и, как следствие, к значительному изменению нормируемых характеристик битумов.

С целью подтверждения предположения об иницировании радикальных процессов в битуме остаточным кислородом был проведен эксперимент по определению влияния продувки азотом на изменение качества битума. Оценку влияния продувки горячего битума газообразным азотом на сохранение его качества проводили путем сравнения качества исходного битума и битума после барботирования азотом.

По завершению окисления смесового сырья из колонны окисления были отобраны четыре пробы битума БНД 70/100: первую пробу проанализировали сразу же после отбора, вторую выдержали при температуре 180 °С в течение 24 ч, имитируя таким образом нахождение товарного битума в товарной емкости, и также проанализировали. Через оставшийся в колонне окисления битум (см. рис. 1) барботировали азот в течение 30 мин (эксперимент 5). Через каждые 15 мин отбирали пробы, которые выдерживали в течение 24 ч при 180 °С, затем анализировали.

Полученные результаты анализа всех четырех проб показали, что использование азота позволяет максимально сохранить качество битума, что выражается в снижении значений таких показателей качества, как глубина проникновения иглы при 25 °С, растяжимость на величину, не превышающую прецизионности методов испытаний. Продувка азотом позволила сохранить на первоначальном уровне растяжимость при 0 °С, а увеличение значения данного показателя качества при 25 °С подтверждает предположение о возможности практически полного прекращения протекания радикальных реакций с удалением растворенного кислорода. Также необходимо отметить, что с увеличением времени, в течение которого производилась продувка азотом, изменения качества битума уменьшались. Так, снижение глубины проникновения иглы пробы № 2 по сравнению с пробой № 1 составило 17 ед. пенетрации, тогда как после продувки в течение 15 мин это значение уменьшилось на 7 ед., а после 30 мин составляло 4 ед. (табл. 5). Таким образом, продувка азотом способствует удалению растворенного в дисперсной системе кислорода, иницирующего радикальные процессы, приводящие к изменению химического состава битума и, как следствие, его химмотологических характеристик.

Установлено, что продувка азотом значительно снижает гомолитические процессы, приводящие к трансформации нефтяных дисперсных систем в период хранения.

Таблица 5. Изменение химмотологических характеристик битума при продувке азотом

Table 5. Changes in the chemical characteristics of bitumen when blowing with nitrogen

Показатель	Проба			
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4
Глубина проникновения иглы, 0,1 мм, при температуре, °С:				
0	23	20	22	23
25	90	73	80	86
Температура размягчения по кольцу и шару, °С	47	47	48	46
Растяжимость, см, при температуре, °С:				
0	3,9	3,3	3,5	4,0
25	88	76	> 100	> 100
Температура хрупкости, °С	-28	-29	-27	-29
Изменение температуры размягчения после старения, °С	3	7	4	6
Изменение массы после старения, %	0,0	0,0	0,0	0,3

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании выявленных в ходе экспериментов тенденций и зависимостей, можно предложить следующие технические решения для обеспечения сохранения качества дорожных битумов при производстве, транспортировке, хранении и дальнейшем их использовании:

1. Обеспечить минимальную продолжительность пребывания битума нефтяного дорожного при высоких температурах в товарных емкостях перед отгрузкой в автомобильные и железнодорожные цистерны.

2. Обеспечить выпуск битумных нефтяных дорожных с запасом качества по глубине проникновения иглы при 25 °С в рамках нормативных интервалов: для марки БНД 100/130 – 115–130 ед., для марки БНД 70/100 – 85–100 ед.

3. Осуществлять максимально быстрое затаривание горячего битума нефтяного дорожного

из товарных емкостей в потребительскую тару (например, в кубовые емкости КУС) с последующим охлаждением и транспортировкой «холодного» битума нефтяного дорожного потребителям по их заявке.

4. Использовать минимальное количество циклов охлаждения–нагрева битума при его транспортировке до потребителя.

5. Проводить продувку инертным газом (азотом) для прекращения автокаталитического окисления битума нефтяного дорожного в товарных емкостях.

Таким образом, на основании проведенных исследований найдены основные закономерности изменения нефтяных дисперсных систем в ходе различных схем транспортировки и способов хранения битума. На основании полученных данных предложены технологические подходы по стабилизации качества дорожных битумов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Полякова В.И. К вопросу о структурообразовании дорожных вяжущих материалов // Дороги и мосты. 2016. N 2. С. 233–264.

2. Унгер Ф.Г., Андреева Л.Н. Фундаментальные аспекты химии нефти. Природа смол и асфальтенов. Новосибирск: Наука, 1995. 188 с.

3. Колбановская А.С., Михайлов В.В. Дорожные битумы. М.: Транспорт, 1973. 264 с.

4. Гуреев А.А. Нефтяные вяжущие материалы. М.: Недра, 2018. 240 с.

5. Пактер М.К., Братчун В.И., Стукалов А.А., Беспалов В.Л., Доля А.Г. Закономерности технологического старения нефтяных дорожных битумов и асфальтобетонных смесей // Современное промышленное и гражданское строительство. 2014. Т. 10. N 4. С. 225–235.

6. Chang H.-L., Wong G.K., Lin J.-R., Yen T.F. Chapter 9. Electron spin resonance study of bituminous substances and asphaltenes // Developments in Petroleum Science. 2000. Vol. 40. Part B. P. 229–280. [https://doi.org/10.1016/S0376-7361\(09\)70280-8](https://doi.org/10.1016/S0376-7361(09)70280-8)

7. Петрова Л.М., Зайдуллин И.М., Аббакумова Н.А., Хуснутдинов И.Ш., Кашапова Р.Р. Информативность параметров состава и строения битумов для оценки их сопротивления старению // Вестник Казанского технологического университета. 2011. N 10. С. 131–134.

8. Пактер М.К., Братчун В.И., Нарижная О.Н., Стукалов А.А., Беспалов В.Л. Изучение коллоидно-дисперсной структуры дорожного битума при термоокислительном старении // Современное промышленное и гражданское строительство. 2018. Т. 14. N 3. С. 133–141.

9. Печеный Б.Г., Курбатов В.Л., Лосев В.П. О механизме старения битумов и методах их испытания // Университетская наука. 2019. N 2. С. 28–32.

10. Рыбачук Н. А. Старение битумного вяжущего // Вестник Иркутского государственного технического университета. 2015. N 2 (97). С. 120–125.

11. Илиополов С.К., Яковлевич Н.Ю., Саенко

С.С. Старение битума в рабочем котле АБЗ // Дороги и мосты. 2009. N 21. С. 208–220.

12. Братчун В.И., Пактер М.К., Стукалов А.А. Прогнозирование изменения группового состава при технологическом старении дорожного битума // Вестник Донбасской национальной академии строительства и архитектуры. 2015. N 1 (11). С. 12–20.

13. Абдуллин А.И., Идрисов М.Р., Емельянцева Е.А., Абдуллина В.Х. Изменение вязкостных свойств нефтяных битумов в процессе старения // Вестник Технологического университета. 2019. Т. 22. N 10. С. 25–29.

14. Гуреев А.А., Чан Нят Тан Нят Тан. Термоокислительная стабильность дорожных битумов // Нефтепереработка и нефтехимия. 2010. N 4. С. 9–12.

15. Васильев В.В., Никитин Е.Е., Карпов К.А., Саламатова Е.В., Потехин В.М., Алексеев О.В. Исследование процесса окисления гудрона западносибирских нефтей газометрическим методом // Нефтепереработка и нефтехимия. 2002. N 8. С. 13–16.

16. Саламатова Е.В., Васильев В.В., Потехин В.М. Определение скоростей автоокисления некоторых углеводородов и нефтяных остатков // Нефтепереработка и нефтехимия. 2004. N 8. С. 16–22.

17. Галдина В.Д. Кинетика термоокислительного старения битумов различной природы // Вестник Томского государственного университета. 2011. N 3 (32). С. 133–139.

18. Hofko B., Cannone Falchetto A., Grenfell J., Huber L., Lu X., Porot L., et al. Effect of short-term ageing temperature on bitumen properties // Road Materials and Pavement Design. 2017. Vol. 18. Issue 3. P. 108–117. <https://doi.org/10.1080/14680629.2017.1304268>

19. Hofko B., Maschauer D., Steiner D., Mirwald J., Grothe H. Bitumen ageing – Impact of reactive

oxygen species // Case Studies in Construction Materials. 2020. Vol. 13. P. e00390. <https://doi.org/10.1016/j.cscm.2020.e00390>

20. Tarsi G., Varveri A., Lantieri C., Scarpas T., Sangiorgi C. Effects of different ageing methods on

the chemical and rheological properties of bitumen // Journal of Materials in Civil Engineering. 2018. Vol. 30. Issue 3. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)MT.1943-5533.0002206](https://doi.org/10.1061/(ASCE)MT.1943-5533.0002206)

REFERENCES

1. Polyakova VI. On the question of structure formation of road binders. *Dorogi i mosty*. 2016;2:233–264. (In Russian)

2. Unger FG, Andreeva LN. *Fundamental aspects of oil chemistry. Nature of resins and asphaltenes*. Novosibirsk: Nauka; 1995. 188 p. (In Russian)

3. Kolbanovskaya AS, Mikhailov VV. *Road bitumen*. Moscow: Transport; 1973. 264 p. (In Russian)

4. Gureev AA. *Oil binding materials*. Moscow: Nedra; 2018. 242 p. (In Russian)

5. Pakter MK, Bratchun VI, Stukalov AA, Bepalov VL, Dolya AG. Laws of technology obsolescence oil road bitumen and asphalt mixes. *Sovremennoe promyshlennoe i grazhdanskoe stroitel'stvo. Modern Industrial and Civil Construction*. 2014;10(4):225–235. (In Russian)

6. Chang H-L, Wong GK, Lin J-R, Yen TF. Chapter 9. Electron spin resonance study of bituminous substances and asphaltenes. *Developments in Petroleum Science*. 2000;40(part B):229–280. [https://doi.org/10.1016/S0376-7361\(09\)70280-8](https://doi.org/10.1016/S0376-7361(09)70280-8)

7. Petrova LM, Zaidullin IM, Abbakumova NA, Khusnutdinov ISh, Kashapova RR. Informative parameters of the composition and structure of bitumen to assess their resistance to ageing. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta = Bulletin of Kazan Technological University*. 2011;10:131–134. (In Russian)

8. Pakter MK, Bratchun VI, Narygnaya ON, Stukalov AA, Bepalov VL. Study of the colloiddispersed structure of road bitumen under thermal oxidative aging. *Sovremennoe promyshlennoe i grazhdanskoe stroitel'stvo = Modern Industrial and Civil Construction*. 2018;14(3):133–141. (In Russian)

9. Pechenyi BG, Kurbatov VL, Losev VP. On the mechanism of bitumen aging and methods of their testing. *Universitetskaya nauka*. 2019;2:28–32. (In Russian)

10. Rybachuk NA. Aging of asphalt binder. *Vestnik Irkutskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta = Proceedings of Irkutsk State Technical University*. 2015;2:120–125. (In Russian)

11. Iliopolov SK, Nikulin UY, Saenko SS. Bitumen ageing in operating boiler of asphalt concrete mixing plant. *Dorogi i mosty*. 2009;21:208–220. (In Russian)

12. Bratchun VI, Pakter MK, Stukalov AA. Predict changes in the group composition for technological aging road bitumen. *Vestnik Donbasskoi Natsional'noi Akademii Stroitel'stva i Arkhitektury = Bulletin of the Donbass National Academy of Civil Engineering and Architecture*. 2015;1:12–20. (In Russian)

13. Abdullin AI, Idrisov MR, Emel'yanycheva EA, Abdullina VKh. Changes in the viscous properties of petroleum bitumen in the aging process. *Vestnik Tekhnologicheskogo Universiteta = Bulletin the Technological University*. 2019;22(10):25–29. (In Russian)

14. Gureev AA, Chan Nyat Tan Nyat Tan. Thermal-oxidative stability of road bitumen. *Neftepererabotka i neftekhimiya*. 2010;4:9–12. (In Russian)

15. Vasil'ev VV, Nikitin EE, Karpov KA, Salamatova EV, Potekhin VM, Alekseev OV. Investigation of the process of tar oxidation in West Siberian oils by gasometric method. *Neftepererabotka i neftekhimiya*. 2002;8:13–16. (In Russian)

16. Salamatova EV, Vasil'ev VV, Potekhin VM. Determination of auto-oxidation rates of some hydrocarbons and oil residues. *Neftepererabotka i neftekhimiya*. 2004;8:16–22. (In Russian)

17. Galdina VD. Kinetics of thermal-oxidative ageing of bitumens of the various nature. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta = Tomsk State University Journal*. 2011;3:133–139. (In Russian)

18. Hofko B, Cannone Falchetto A, Grenfell J, Huber L, Lu X, Porot L, et al. Effect of short-term ageing temperature on bitumen properties. *Road Materials and Pavement Design*. 2017;18(3):108–117. <https://doi.org/10.1080/14680629.2017.1304268>

19. Hofko B, Maschauer D, Steiner D, Mirwald J, Grothe H. Bitumen ageing – Impact of reactive oxygen species. *Case Studies in Construction Materials*. 2020;13:e00390. <https://doi.org/10.1016/j.cscm.2020.e00390>

20. Tarsi G, Varveri A, Lantieri C, Scarpas T, Sangiorgi C. Effects of different ageing methods on the chemical and rheological properties of bitumen. *Journal of Materials in Civil Engineering*. 2018;30(3). [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)MT.1943-5533.0002206](https://doi.org/10.1061/(ASCE)MT.1943-5533.0002206)

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Черепанов Вадим Дмитриевич,
аспирант,
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Vadim D. Cherepanov,
Postgraduate Student,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,

Российская Федерация,
✉ e-mail: vadim.cherep@gmail.com

Дьячкова Светлана Георгиевна,
д.х.н., заведующая кафедрой
химической технологии,
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
e-mail: dyachkova@istu.edu

Кузора Игорь Евгеньевич,
к.т.н., заместитель начальника ИЦ-УКК
по новым технологиям,
АО «Ангарская нефтехимическая компания»,
665830, г. Ангарск, а/я 65,
Российская Федерация,
e-mail: KuzoraIE@anhk.rosneft.ru

Дубровский Дмитрий Александрович,
к.т.н., заместитель главного технолога,
АО «Ангарская нефтехимическая компания»,
665830, г. Ангарск, а/я 65,
Российская Федерация,
e-mail: DubrovskiiDA@anhk.rosneft.ru

Лукина Виктория Игоревна,
аспирант,
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация

Заявленный вклад авторов

Черепанов В.Д. – концепция исследования; проведение экспериментов; обработка полученных данных; написание текста; итоговые выводы.
Дьячкова С.Г. – научное руководство; концепция исследования; развитие методологии; участие в разработке учебных программ и их реализации; доработка текста; итоговые выводы.
Кузора И.Г. – научное руководство; концепция исследования; доработка текста; итоговые выводы.
Дубровский Д.А. – концепция исследования; научное руководство; написание текста; итоговые выводы.
Лукина В.И. – обработка полученных данных; написание текста.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

*Поступила в редакцию 04.12.2020.
Одобрена после рецензирования 20.02.2021.
Принята к публикации 30.08.2021.*

✉ e-mail: vadim.cherep@gmail.com

Svetlana G. D'yachkova,
Dr. Sci. (Chemistry),
Head of the Chemical Technology Department,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
e-mail: dyachkova@istu.edu

Igor I. Kuzora,
Cand. Sci. (Engineering),
Deputy Chief of the Test Center – Quality Control
Department,
SC “Angarsk petrochemical company”,
Post office box 65, Angarsk, 665830,
Russian Federation,
e-mail: KuzoraIE@anhk.rosneft.ru

Dmitriy A. Dubrovskii,
Cand. Sci. (Engineering),
Deputy Chief Technologist,
SC “Angarsk petrochemical company”,
Post office box 65, Angarsk, 665830,
Russian Federation,
e-mail: DubrovskiiDA@anhk.rosneft.ru

Viktoriya I. Lukina,
Postgraduate Student,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation

Contribution of the authors

Cherepanov V.D. – research concept; R&D; data processing; writing the draft; follow-on revision of the text; final conclusions.
D'yachkova S.G. – scientific management; research, concept methodology development, participation in development of curricula and their implementation, follow-on revision of the text, final conclusions.
Kuzora I.G. – scientific management, research concept, follow-on revision of the text, final conclusions.
Dubrovskii D.A. – scientific management, research concept, writing the draft, final conclusions.
Lukina V.I. – data processing, writing the draft.

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 04.12.2020.
Approved after reviewing 20.02.2021.
Accepted for publication 30.08.2021.*

Краткие сообщения / Brief communication

УДК 54.057

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-491-496>



Синтез и исследование олигогексаметиленгуанидин гидроиодида в качестве рентгеноконтрастного вещества

© О.С. Очиров, С.А. Стельмах, М.Н. Григорьева,
В.О. Окладникова, Д.М. Могнонов

Байкальский институт природопользования СО РАН,
г. Улан-Удэ, Российская Федерация

Резюме: Диагностика сложных травм, таких как осколочные переломы и ранения, травмы черепа, сопровождающиеся внутренними повреждениями, недоступными для визуального контроля, представляет максимальные трудности при проведении рентгенографического обследования. Поэтому актуальным является разработка препарата, способного с высокой точностью помочь локализовать место патологического очага, опираясь только на результаты рентгенографического исследования, что возможно при нанесении ориентира (вещества) на кожу пациента. В качестве такого вещества предложено использовать рентгеноконтрастное соединение на основе иодированной полимерной матрицы, где контрастирующим компонентом будет являться иод, а в качестве носителя – полигуанидин. Выбор этого класса полимеров обусловлен тем, что на атоме углерода гуанидиновой группы в большей степени локализуется положительный заряд, который позволяет загрузить в нее анионы иода. Путем протонирования чистого гуанидина иодистоводородной кислотой получен гуанидин гидроиодид, подлинность которого подтверждена методами ИК-спектроскопии (уменьшение интенсивности полос в области $1380, 880 \text{ см}^{-1}$ по сравнению с гуанидином, а также уширение полосы валентных колебаний аминогрупп, характерных для солей гуанидина) и рентгенофазового анализа. На основе гексаметилендиамина и иодсодержащей соли гуанидина поликонденсацией в расплаве синтезирован олигогексаметиленгуанидин гидроиодид. Показано, что водные растворы исследуемых образцов поглощают рентгеновское излучение и являются рентгенопозитивными веществами (экспозиционная доза излучения $E = 0,04 \text{ мЗВ}$).

Ключевые слова: полигуанидин, иодсодержащие вещества, рентгеноконтрасты, рентгеновское излучение

Благодарности: Исследование выполнено в рамках государственного задания Байкальского института природопользования СО РАН №. 0273-2021-0007.

Для цитирования: Очиров О.С., Стельмах С.А., Григорьева М.Н., Окладникова В.О., Могнонов Д.М. Синтез и исследование олигогексаметиленгуанидин гидроиодида в качестве рентгеноконтрастного вещества. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2021. Т. 11. N 3. С. 491–496. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-491-496>

Synthesis and study of oligohexamethyleneguanidine hydroiodide as a radiopaque substance

Oleg S. Ochirov, Sergey A. Stelmakh, Maria N. Grigor'eva,
Valeria O. Okladnikova, Dmitrii M. Mogonov

Baikal Institute of Nature Management SB RAS,
Ulan-Ude, Russian Federation

Abstract: Diagnosis of complex injuries, such as splinter fractures and wounds, skull injuries accompanied by internal injuries that are inaccessible to visual control, presents the greatest difficulties during X-ray examination. Therefore, it is relevant to develop a drug that can help localize the site of a pathological lesion with high accuracy, relying only on the results of an X-ray study, which is possible when a reference point (substance) is applied to the patient's skin. A radiopaque contrast compound based on an iodinated polymeric matrix with iodine as the contrasting component and polyguanidine as the carrier has been proposed to be used as a reference point substance. The choice of this class of polymers stemmed from the fact that a positive charge is localized to a greater extent on the carbon atom of the guanidine group, which allows loading iodine anions into it. Protonation of pure guanidine with hydroiodic acid has helped obtain guanidine hydroiodide. This finding was confirmed by IR spectroscopy methods (a decrease in the intensity of bands in the

region of 1,380, 880 cm^{-1} in comparison with guanidine, as well as broadening of the band of stretching vibrations of amino groups characteristic of guanidine salts) and X-ray phase analysis. Polyhexamethylene guanidine hydroiodide was synthesized based on hexamethylenediamine and iodine-containing guanidine salt using melt polycondensation. The results show that the aqueous solutions of samples under study absorb X-radiation and are the X-ray-positive substances (exposure radiation dosage $E = 0.04 \text{ mSV}$).

Keywords: polyguanidine, iodine-containing substances, X-ray contrast, X-ray radiation

Acknowledgments: The study was carried out with the financial support of the State assignment of the Baikal Institute of Nature Management SB RAS no. 0273-2021-0007.

For citation: Ochirov OS, Stelmakh SA, Grigor'eva MN, Okladnikova VO, Mognonov DM. Synthesis and study of oligohexamethyleneguanidine hydroiodide as a radiopaque substance. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(3): 491–496. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-491-496>

ВВЕДЕНИЕ

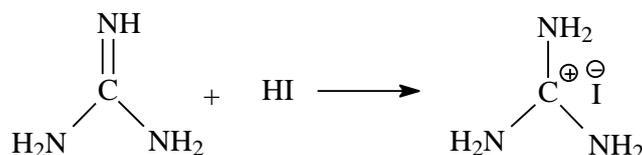
В комплексе лечебно-профилактических мероприятий профилактика травматизма и оказание квалифицированной специализированной медицинской помощи пострадавшим от травм занимают важное место. Причем рентгенографическое обследование является первоочередным действием для уточнения наличия внутренних повреждений. Рентгенография является наиболее распространенным и доступным способом экстренной диагностики серьезных повреждений. Сравнительная простота и относительно невысокая стоимость обуславливают наличие рентген-аппаратов в большинстве лечебно-профилактических учреждений [1–4]. Однако высокая доза излучения, нечеткая визуализация некоторых тканей организма, а также возможность искажения изображения ввиду неправильной экспозиции, особенно при диагностике сложных переломов, осколочных ранений, черепно-мозговых травм, которые, как правило, сопровождаются рядом повреждений, недоступных для визуального обнаружения, не позволяют достоверно и в полной мере представить результаты рентгенографического исследования [5].

Для решения этих проблем актуальной явля-

ется разработка нового рентгеноконтрастного вещества [6–8], способного помочь точно локализовать место патологического очага, опираясь на данные, полученные только рентген-аппаратом [9], что возможно в результате нанесения ориентира (вещества) на кожу пациента. Для использования в качестве такого рентгеноконтрастного вещества предлагается рассмотреть соединения на основе йодированной полимерной матрицы, где контрастирующим компонентом будет являться йод, а в качестве полимерной составляющей – полигексаметиленгуанидин [10]. Выбор этого класса полимеров, образующих ионную связь с йодом, обусловлен также тем, что они проявляют выраженную антимикробную активность, что в условиях проведения рентгенографического обследования пациента будет способствовать дезинфекции раневых участков.

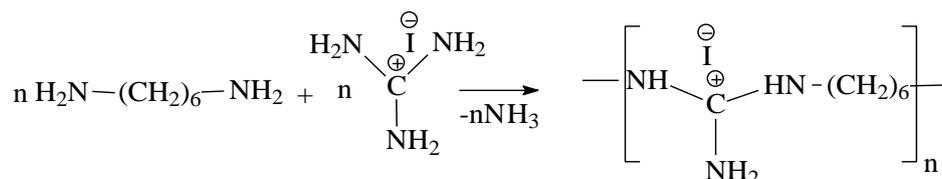
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез гуанидина гидроиодида (ГГИ) осуществляли путем протонирования гуанидина (х.ч.) йодистоводородной кислотой (Sigma-Aldrich, 57 wt. % in H_2O , distilled, stabilized, 99,95%):



Методом поликонденсации в расплаве при температуре 165 °С в течение 6 ч синтезирован ПГМГги – полигексаметиленгуанидин гидроио-

дид. Согласно синтезу, рассмотренному в работах [11, 12], происходит следующее взаимодействие:



Полученный полимер представляет собой кристаллическое соединение бурого цвета, растворимое в воде. Поскольку полимер получен

при эквимольном соотношении мономеров, каждая макромолекула имеет одну концевую аминогруппу, что сделало возможным определение

среднечисловой молекулярной массы методом концевых групп путем титрования раствором HCl [13], которая составила 934.

Синтезированные соединения были исследованы физико-химическими методами анализа на базе Центра коллективного пользования Байкальского института природопользования СО РАН: ИК-спектрометр ALPHA (Bruker, Германия), приставка НПВО (кристалл ZnSe), 4000–600 см⁻¹ и рентгеновский дифрактометр D8 Advance фирмы BRUKER AXS GmbH, Karlsruhe). На базе рентгенологического отделения Республиканской клинической больницы им. Н.А. Семашко была снята рентгенограмма (рентген-аппарат PhilipsDualDiagnost, экспозиционная доза излучения $E = 0,04$ мЗВ).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Наиболее простым путем для иммобилизации иода на молекуле полигуанидина (ПГ) является получение гидроиодидов ПГ, в которых иод выступает в качестве противоиона положительно заряженной гуанидиновой группировки. Несмотря на то что синтез гидроиодидов можно осуществить путем замены противоионов распространенных солей гуанидинов (хлорид, фосфат), этот вариант не выглядит привлекательным, поскольку требует большого расхода реагентов и не гарантирует большого процента замещения. Поэтому для получения гуанидина гидроиодида (ГГИ) была использована несолевая форма гуанидина.

При исследовании спектра полученного ГГИ наблюдали выраженное уменьшение интенсивности полос в области 1380, 880 см⁻¹ по сравнению с гуанидином, а также уширение полосы валентных колебаний аминогрупп, причем эти изменения характерны и для гуанидин гидрохлорида (ГГХ) (рис. 1) [14].

По данным рентгенофлуоресцентного анализа, полученное соединение удовлетворительно согласуется с базой рентгендифракционных данных ICDD PDF-2 (<https://www.icdd.com/pdf-2/>), что служит подтверждением его строения.

Все полученные образцы в виде водных растворов разной концентрации были исследованы на наличие контрастирующей активности на рентгенаппарате PhilipsDualDiagnost (высота столба – 1 см) радиологического отделения Республиканской клинической больницы им. Н.А. Семашко.

На рис. 2. представлены рентгенограммы:

А, Б – ГГИ ($C = 7,8$ и $3,93$ г/дл соответственно);

В – дистиллированная вода;

Г, Д, Е – ПГМГи ($C = 33,24$; $16,62$; $8,31$ г/дл соответственно).

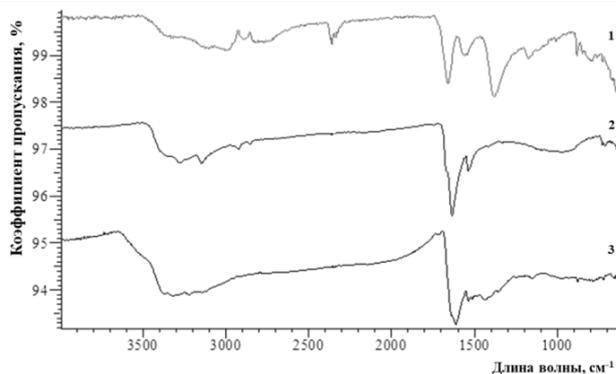


Рис. 1. ИК-спектры образцов: 1 – гуанидин; 2 – гуанидин гидрохлорид; 3 – гуанидин гидроиодид

Fig. 1. IR spectra of the samples: 1 – guanidine; 2 – guanidine hydrochloride; 3 – guanidine hydroiodide

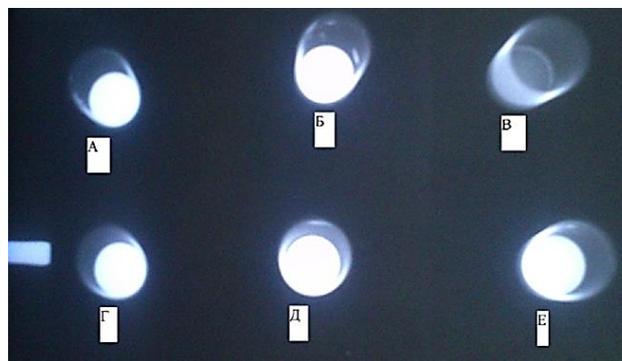


Рис. 2. Рентгенограмма синтезированных соединений

Fig. 2. X-ray diffraction pattern of synthesized compounds

Из представленной на рис. 2 рентгенограммы видно, что контраст в рентгеновском излучении наблюдается для всех образцов (контролем служит дистиллированная вода).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезированы гуанидин гидроиодида и полимер на его основе. Физико-химическими методами анализа изучено и подтверждено строение полученных соединений. Показано, что под действием рентгеновского излучения образцы проявляют контрастирующую активность, что говорит о перспективе их использования в качестве рентгенпозитивных средств наружного применения в области травматологии и хирургии.

В дальнейшем будет рассмотрен возможный подход к получению комплексного соединения путем введения в полимер как ионно-, так и ковалентно связанного иода.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cohen D.M., Garcia C.T., Dietrich A.M., Hickley R.W. Jr. Miniature C-arm imaging: an in vitro study of detecting foreign bodies in the emergency

department // Pediatric Emergency Care. 1997. Vol. 13. Issue 4. P. 247–249. <https://doi.org/10.1097/00006565-199708000-00001>

2. Vehmas T., Tervahartiala P. Gd-DTPA in male urethrography. A case report // *Acta Radiologica*. 1996. Vol. 37. Issue 5. P. 804–805. <https://doi.org/10.1177/02841851960373P274>
3. Siessegger M., Mischkowski R.A., Schneider B.T., Krug B., Klesper B., Zöller J.E. Image guided surgical navigation for removal of foreign bodies in the head and neck // *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 2001. Vol. 29. Issue 6. P. 321–325. <https://doi.org/10.1054/jcms.2001.0254>
4. Heiland M., Schulze D., Adam G., Schmelzle R. 3D-imaging of the facial skeleton with an isocentric mobile C-arm system (Siremobil Iso-C3D) // *Dentomaxillofac Radiology*. 2003. Vol. 32. Issue 1. P. 21–25. <https://doi.org/10.1259/dmfr/80391180>
5. Stockman P., Variaktaris E., Fenner M., Tudor C., Neukam F.W., Nkenke E. Conventional radiographs: are they still the standard in localization of projectiles? // *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2007. Vol. 104. Issue 4. P. e71–e75. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2007.05.015>
6. Hu J., Albadawi H., Chong B.W., Deipolyi A.R., Sheth R.A., Khademhosseini A., et al. Advances in biomaterials and technologies for vascular embolization // *Advanced Materials*. 2019. Vol. 31. Issue 33. 1901071. <https://doi.org/10.1002/adma.201901071>
7. Géraldine A., Jordan O., Andersen G., Doelker E., Chevalier Y. Radiopaque iodinated ethers of poly(vinyl iodobenzyl ether)s: Synthesis and evaluation for endovascular embolization // *Journal of Applied Polymer Science*. 2015. Vol. 132. Issue 14. 41791. <https://doi.org/10.1002/app.41791>
8. Alashrah S., El-Ghoul Y., Omer M.A.A. Synthesis and characterization of a new nanocomposite film based on polyvinyl alcohol polymer and nitro blue tetrazolium dye as a low radiation dosimeter in medical diagnostics application // *Polymers*. 2021. Vol. 13. Issue 11. 1815. <https://doi.org/10.3390/polym13111815>
9. Suzuki T., Morgan S.J., Smith W.R., Stahel P.E., Flierl M.A., Hak D.J. Stress Radiograph to Detect True Extent of Symphyseal Disruption in Presumed Anteroposterior Compression Type I Pelvic Injuries // *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care*. 2010. Vol. 69. Issue 4. P. 880–884. <https://doi.org/10.1097/TA.0b013e3181efbad5>
10. Воинцева И.И., Гембицкий П.А. Полигуанидины – дезинфекционные средства и полифункциональные добавки в композиционные материалы. М.: ЛКМ-пресс, 2009. 304 с.
11. Grigor'eva M.N., Stelmakh S.A., Bazarov L.U., Mogonov D.M. Dependence of the viscous characteristics of polyhexamethyleneguanidine hydrochloride on its synthesis conditions // *Polymer Science. Series B*. 2014. Vol. 56. Issue 3. P. 269–273. <https://doi.org/10.1134/S1560090414030063>
12. Stelmakh S.A., Bazarov L.U., Mogonov D.M. On the mechanism of the hexamethylenediamine and guanidine hydrochloride polycondensation // *Russian Journal of Applied Chemistry*. 2010. Vol. 83. Issue 2. P. 342–344. <https://doi.org/10.1134/S1070427210020308>
13. Ochirov O.S., Mogonov D.M., Stelmakh S.A. Polymeric hydrogels based on polyhexamethylene guanidine hydrochloride and formaldehyde // *Russian Journal of Applied Chemistry*. 2015. Vol. 88. Issue 2. P. 331–334. <https://doi.org/10.1134/S1070427215020238>
14. Goto T., Nakanishi K., Ohashi N. An account on the infrared absorption of guanidiniums // *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. 1957. Vol. 30. Issue 7. P. 723–725.

REFERENCES

1. Cohen DM, Garcia CT, Dietrich AM, Hickey RW Jr. Miniature C-arm imaging: an in vitro study of detecting foreign bodies in the emergency department. *Pediatric Emergency Care*. 1997;13(4):247–249. <https://doi.org/10.1097/00006565-199708000-00001>
2. Vehmas T, Tervahartiala P. Gd-DTPA in male urethrography. A case report. *Acta Radiologica*. 1996;37(5):804–805. <https://doi.org/10.1177/02841851960373P274>
3. Siessegger M, Mischkowski RA, Schneider BT, Krug B, Klesper B, Zöller JE. Image guided surgical navigation for removal of foreign bodies in the head and neck. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 2001;29(6):321–325. <https://doi.org/10.1054/jcms.2001.0254>
4. Heiland M, Schulze D, Adam G, Schmelzle R. 3D-imaging of the facial skeleton with an isocentric mobile C-arm system (Siremobil Iso-C3D). *Dentomaxillofac Radiology*. 2003;32(1):21–25. <https://doi.org/10.1259/dmfr/80391180>
5. Stockman P, Variaktaris E, Fenner M, Tudor C, Neukam FW, Nkenke E. Conventional radiographs: are they still the standard in localization of projectiles? *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2007;104(4):e71–e75. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2007.05.015>
6. Hu J, Albadawi H, Chong BW, Deipolyi AR, Sheth RA, Khademhosseini A, et al. Advances in biomaterials and technologies for vascular embolization. *Advanced Materials*. 2019;31(33):1901071. <https://doi.org/10.1002/adma.201901071>
7. Géraldine A, Jordan O, Andersen G, Doelker E, Chevalier Y. Radiopaque iodinated ethers of poly(vinyl iodobenzyl ether)s: Synthesis and evaluation for endovascular embolization. *Journal of Applied Polymer Science*. 2015;132(14):41791. <https://doi.org/10.1002/app.41791>
8. Alashrah S, El-Ghoul Y, Omer MAA. Synthesis and characterization of a new nanocomposite film based on polyvinyl alcohol polymer and nitro

blue tetrazolium dye as a low radiation dosimeter in medical diagnostics application. *Polymers*. 2021;13(11):1815. <https://doi.org/10.3390/polym13111815>

9. Suzuki T, Morgan SJ, Smith WR, Stahel PE, Flierl MA, Hak DJ. Stress Radiograph to Detect True Extent of Symphyseal Disruption in Presumed Anteroposterior Compression Type I Pelvic Injuries. *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care*. 2010;69(4):880–884. <https://doi.org/10.1097/TA.0b013e3181efbad5>

10. Vointseva II, Gembtskii PA. *Polyguanidines – disinfectants and multifunctional additives in composite materials*. Moscow: LKM-press; 2009. 304 p. (In Russian)

11. Grigor'eva MN, Stel'makh SA, Bazaron LU, Mogonov DM. Dependence of the viscous characteristics of polyhexamethyleneguanidine hydrochloride on its synthesis conditions. *Polymer Science. Series B*. 2014;56(3):269–273. <https://doi.org/10.1134/S1560090414030063>

12. Stel'makh SA, Bazaron LU, Mogonov DM. On the mechanism of the hexamethylenediamine and guanidine hydrochloride polycondensation. *Russian Journal of Applied Chemistry*. 2010;83(2):342–344. <https://doi.org/10.1134/S1070427210020308>

13. Ochirov OS, Mogonov DM, Stel'makh SA. Polymeric hydrogels based on polyhexamethylene guanidine hydrochloride and formaldehyde. *Russian Journal of Applied Chemistry*. 2015;88(2):331–334. <https://doi.org/10.1134/S1070427215020238>

14. Goto T, Nakanishi K, Ohashi N. An account on the infrared absorption of guanidiniums. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. 1957;30(7):723–725.

15. Ochirov OS, Stelmakh SA, Grigor'eva MN, Mogonov DM. Synthesis and properties of polyhexamethyleneguanidine hydrochloride. *Polymer Science. Series B*. 2015;57(3):385–390. <https://doi.org/10.1134/S1560090415020023>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Очиров Олег Сергеевич,

к.фарм.н., ведущий инженер
лаборатории химии полимеров,
Байкальский институт природопользования
СО РАН,
670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6,
Российская Федерация,
✉ e-mail: ochirov.o.s@yandex.ru

Стельмах Сергей Александрович,

к.х.н., старший научный сотрудник
лаборатории химии полимеров
Байкальский институт природопользования
СО РАН,
670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6,
Российская Федерация
e-mail: s_stelmakh@bk.ru

Григорьева Мария Николаевна,

к.фарм.н., ведущий инженер
лаборатории химии полимеров,
Байкальский институт природопользования
СО РАН,
670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6,
Российская Федерация
e-mail: gmn_07@bk.ru

Окладникова Валерия Олеговна,

инженер лаборатории химии полимеров,
Байкальский институт природопользования
СО РАН,
670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6,
Российская Федерация
e-mail: lera-okladnikova@mail.ru

Могнонов Дмитрий Маркович,

д.х.н., профессор, главный научный сотрудник
лаборатории химии полимеров,
Байкальский институт природопользования
СО РАН,

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Oleg S. Ochirov,

Cand. Sci. (Pharmacy), Lead Engineer,
Laboratory of Polymer Science,
Baikal Institute of Nature Management SB RAS,
6, Sahyanova St., Ulan-Ude, 670047,
Russian Federation,
✉ e-mail: ochirov.o.s@yandex.ru

Sergey A. Stelmakh,

Cand. Sci. (Chemistry), Senior Researcher,
laboratory of Polymer Science,
Baikal Institute of Nature Management SB RAS,
6, Sahyanova St., Ulan-Ude, 670047,
Russian Federation,
e-mail: s_stelmakh@bk.ru

Maria N. Grigor'eva,

Cand. Sci. (Chemistry), Lead Engineer,
Laboratory of Polymer Science,
Baikal Institute of Nature Management SB RAS,
6, Sahyanova St., Ulan-Ude, 670047,
Russian Federation,
e-mail: gmn_07@bk.ru

Valeria O. Okladnikova,

Engineer, Laboratory of Polymer Science,
Baikal Institute of Nature Management SB RAS,
6, Sahyanova St., Ulan-Ude, 670047,
Russian Federation,
e-mail: lera-okladnikova@mail.ru

Dmitrii M. Mogonov,

Dr. Sci. (Chemistry), Professor;
Chief Researcher,
Laboratory of Polymer Science,
Baikal Institute of Nature Management SB RAS,

670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6,
Российская Федерация,
e-mail: dmog@binm.ru

6, Sahyanova St., Ulan-Ude, 670047,
Russian Federation,
e-mail: dmog@binm.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 15.08.2021.
Одобрена после рецензирования 26.08.2021.
Принята к публикации 30.08.2021.*

*The article was submitted 15.08.2021.
Approved after reviewing 26.08.2021.
Accepted for publication 30.08.2021.*



Prediction of the biological activity of a compound depending on its NH-acidity

© Galina B. Nedvetskaya*, Yuliya A. Aizina***

*Irkutsk State University, Irkutsk, Russian Federation

** Irkutsk National Research Technical University,
Irkutsk, Russian Federation

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

Abstract: Acetamides are building blocks for the synthesis of compounds containing pharmacophores in their structure, manifesting a diverse range of biological activity. The drugs based on these substances possess antidiabetic effect and inhibit blood coagulation. Some of them act as chemosensitizers (i.e., cancer cell inhibitors). However, the full potential of these compounds remains to be fully accomplished. In a previous study, we synthesised acetamides with the $RCONHCH(R')CCl_3$ general formula (where $R = CH_3, CH_2Cl$; $R' = C_6H_5, C_6H_4CH_3, C_6H_4OCH_3, C_6H_4OH$) and studied their acid-base behaviour. The NH-acidity of the studied acetamides is controlled by the polar effects of substituents. In this paper, the potential biological activity of the previously obtained acetamides is calculated, and the dependence of their biological potential on the NH-acidity values is elucidated. Prediction of biological activity was carried out using the PASS software. An analysis of the types of biological activity occurring in all compounds allowed us to determine a linear dependence between the probability of biological potential and the value of dissociation constant.

Keywords: acetamides, NH-acidity, dissociation constants, half neutralisation potential, potentiometric titration, PASS

For citation: Nedvetskaya GB, Aizina YuA. Prediction of the biological activity of a compound depending on its NH-acidity. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(3):497–501. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-497-501>

УДК 542.06+57.088

Установление зависимости потенциала биологической активности от NH-кислотности соединения

Г.Б. Недвецкая*, Ю.А. Айзина***

* Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Российская Федерация

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

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

Резюме: Ацетамиды являются строительным материалом для синтеза соединений, содержащих в своей структуре фармакофорные группы, которые проявляют различную биологическую активность. Созданные на их основе препараты обладают противодиабетическим действием, являются ингибиторами фактора свертывания крови, некоторые действуют как хемо-сенсibilizаторы (т.е. блокаторы раковых клеток). Однако в полной мере возможности этих соединений не раскрыты. Ранее нами были синтезированы ацетамиды с общей формулой $RCONHCH(R')CCl_3$ (где $R = CH_3, CH_2Cl$; $R' = C_6H_5, C_6H_4CH_3, C_6H_4OCH_3, C_6H_4OH$) и изучено их кислотно-основное поведение. Показано, что NH-кислотность исследованных ацетамидов контролируется полярным эффектом заместителей. Целью настоящей работы являлся расчет потенциальной биологической активности полученных ранее ацетамидов и установление зависимости биологического потенциала от величины NH-кислотности этих соединений. Прогноз биологической активности осуществлен с использованием компьютерной программы PASS. В результате отбора активностей, встречающихся во всех соединениях, установлена линейная зависимость вероятности наличия биологической активности от величины константы диссоциации соединения.

Ключевые слова: ацетамиды, NH-кислотность, константы диссоциации, потенциал полунейтрализации, потенциометрическое титрование, PASS

Для цитирования: Недвецкая Г.Б., Айзина Ю.А. Установление зависимости потенциала биологической активности от NH-кислотности соединения. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2021. Т. 11. N 3. С. 497–501. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-497-501>

INTRODUCTION

Acetamids are one of the most important compound classes from the chemical point of view. They are a building material for creating compounds which contains several pharmacophore groups in their structure. Such compounds, of course, have a biological activity. Acetamids are a part of drugs with diabetic inhibitor¹, coagulation factor inhibitor [1] and some of them are blockers for the cancer cells [2, 3]. Acetamids exhibit anticonvulsant [4], antiviral [5], analgesic [6] and insecticides [7] activities.

The possibilities of these compounds are not fully understood. Acetamids with general structure RCONHCH(R')CCl₃ (R = CH₃, CH₂Cl; R' = C₆H₅, C₆H₄CH₃, C₆H₄OCH₃, C₆H₄OH) had been studied by us before. The polar effect of substituents controls NH-acidity of the studied compounds [8].

The main idea of this project is to establish the NH acidic potential dependence and biological activity. Our work consists of two stages. We use the PASS online program for the previously obtained acetamids [9] and compare with NH value biological potential [8].

EXPERIMENTAL PART

We used the PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) on-line program criteria biological

activity assessment. It is a useful tool to make a quick forecasting of diverse biological activity [10, 11]. PASS is a software product designed as a tool for evaluating the general biological potential of an organic drug-like molecule. This program predicts a lot of types of biological activities based on the organic compounds structure [12, 13].

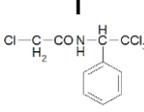
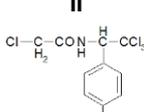
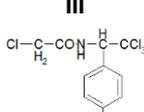
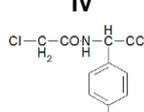
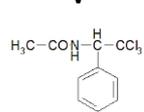
RESULTS AND DISCUSSION

The dissociation constant acetamids pK_A (NH-acidity) has been determined the potentiometric method on «Expert-001» [14–18] as well as biological activity factors (Pa) substances. Table contains the results of the biological activity evaluation acetamids.

Table depicts dissociation constant acetamids due to different (R) substituents of substances. However, substituents equidistant from the –CONH– active center and this fact affects the constant compounds I–IV dissociation. The acidity span (pK_A) of these compounds varies slightly (from 12 to 14 units). The main contribution to the –NH group proton mobility and the acidity of these compounds made by the presence of chlorine near the active center. Therefore, these compounds acidity increases to 12 units in comparison with the previously described compounds [19]. In compound V, there

Relationship between biological activity (Pa) and NH-acidity (pK_A) of acetamides

Взаимосвязь биологической активности (Pa) и NH-кислотности (pK_A) ацетамидов

The forms of biological activities	Pa				
	 pK _A (12.03)	 pK _A (12.33)	 pK _A (12.68)	 pK _A (12.86)	 pK _A (14.06)
1. Phobic disorders treatment	0.767	0.660	0.598	0.573	0.772
2. Chloride peroxidase inhibitor	0.585	0.525	0.398	0.394	0.553
3. Fusarinine-C ornithinesterase inhibitor	0.580	0.487	0.475	0.473	0.634
4. Complement factor D inhibitor	0.577	0.483	0.474	0.415	0.600
5. Enteropeptidase inhibitor	0.558	0.462	0.459	0.428	0.391
6. Hematopoietic inhibitor	0.541	0.486	0.445	0.395	0.512
7. Angiogenesis inhibitor	0.426	0.393	0.386	0.327	–
8. Transglutaminase 2 inhibitor	0.343	0.303	0.291	0.276	–

¹Машковский М.Д. Лекарственные средства: пособие для врачей. 16-е изд., перераб., испр. и доп. М.: Новая волна. 2012. 1216 с.

is a donor methyl group near the active center that reduces proton mobility with nitrogen, so the acid strength of this compound is significantly reduced ($pK_A=14.08$).

We chose only those activities which are found in all compounds and analyzed them.

Table presents linear relation biological activity and NH-acidity for the first acetamides. The probability biological activity increases with growing coefficient acidity of the compounds. In case of the (V) last compound the probability of the 1–4 species biological activities dramatically increases. Meanwhile, 7 and 8 species show zero biological activity.

The NH-acidity compound decrease can be explained by the inverse relationship. According to the list of references [12], there are nootropic properties which contain chlorine compound. There have not been any nootropic activities found despite the presence of three or four chlorine atoms in research compounds.

CONCLUSION

Acetamids I–V biological activity theoretical prediction was made. NH value biological potential line dependence on compound dissociation constant value has been set.

REFERENCE

1. Wilkinson BL, Innocenti A, Vullo C, Supuran CT, Poulsen S-A. Inhibition of carbonic anhydrases with glycosyltriazole benzene sulfonamides. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2008;51(6):1945–1953. <https://doi.org/10.1021/jm701426t>
2. Moeker J, Mahon BP, Bornaghi LF, Vullo D, Supuran CT, McKenna R, et al. Structural insights into carbonic anhydrase IX isoform specificity of carbohydrate-based sulfamates. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2014;57(20):8635–8645. <https://doi.org/10.1021/jm5012935>
3. Lichtenstein DR, Wolfe MM. COX-2 selective NSAIDs: new and improved? *Journal of the American Medical Association*. 2000;284(10):1297–1299. <https://doi.org/10.1001/jama.284.10.1297>
4. Bunyatyan ND, Kovalenko SN, Severina HI, Mokhammad EKW, Zalevskiy SV, Shtrygol' SY, et al. Synthesis and anticonvulsant activity of new 2-(4-oxo-2-thioxo-1,4-dihydro-3(2h)-quinazolinyl)acetamides. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2020;54(1). 6 p. <https://doi.org/10.1007/s11094-020-02147-5>
5. Shadyro OI, Sorokin VL, Ksendzova GA, Savinova OV, Samovich SN, Boreko EI. Comparative evaluation of the antiherpes activity of compounds with different mechanisms of action. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2019;53(7):646–649. <https://doi.org/10.1007/s11094-019-02055-3>
6. Mikhailovskii AG, Pogorelova ES, Pershina NN, Makhmudov RR, Novikova VV. Synthesis, analgetical, antihypoxic and antimicrobial activity for (z)-2-(2-arylhydrazono)-2-(3,3-dimethyl-3,4-dihydroisoquinoline-1-yl)acetamides. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal*. 2019;53(11):25–29. (In Russian) <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2019-53-11-25-29>
7. Kostina M.N. Food scent as the safety method against flies in the buildings. *Dezinfektsionnoe Delo = Disinfection Affairs*. 2015;94(4):52–60. (In Russian)
8. Plotnikova AS, Nedvetskaya GB, Aizina YuA. NH-acidity of substituted trichlorethyl acetamides in dimethyl sulfoxide. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2018;9(1):36–43. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-1-36-43>
9. Aizina JA, Rozentsveig IB, Levkovskaya GG. A novel synthesis of chloroacetamide derivatives via C-amidoalkylation of aromatics by 2-chloro-N-(2,2,2-trichloro-1-hydroxyethyl)acetamide. *Arkivoc Arkat USA*. 2011;8:192–199. <https://doi.org/10.3998/ark.5550190.0012.815>
10. Sergeev PV, Shimanovskii NL, Petrov VI. *Receptors of physiologically active substances*. Moscow; Volgograd: Sem' vetrov; 1999. 640 p. (In Russian)
11. Durnev AD, Seredenin SB. *Mutagens. Screening and farmacological prevention of exposures*. Moscow: Meditsina; 1998. 328 p. (In Russian)
12. Aizina YuA. Use of modern information technologies for revealing biological potency of organic compounds. *Vestnik Irkutskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta = Proceedings of Irkutsk State Technical University*. 2012;4:145–149. (In Russian)
13. Aizina YuA, Nikitin AY, Levkovskaya GG. PASS method calculated and experimental assessment of biological activity of sulfonamide polychlorinated ethylated arenes and hetarenes. *Vestnik Irkutskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta = Proceedings of Irkutsk State Technical University*. 2014;12:188–191. (In Russian)
14. Bykova LN. Semi-neutralization potential as a chemical-analytical characteristic of electrolytes in potentiometric titration. *Zhurnal analiticheskoi khimii = Journal of Analytical Chemistry (USSR)*. 1969;24(12):1781 – 1789. (In Russian)
15. Kreshkov AP, Aldarova NSh, Tanganov BB. Chemical-analytical behavior of sulfur-containing aliphatic dicarboxylic acids in non-aqueous solvents. *Zhurnal analiticheskoi khimii = Journal of Analytical Chemistry (USSR)*. 1970;25(2):362–368. (In Russian)
16. Fialkov YuYa, Zhitomirskii AN, Tarasenko YuA. *Physical chemistry of non-aqueous solutions*. Leningrad: Khimiya; 1973. 376 p. (In Russian)
17. Fialkov YuYa. *Not only in the water*. Leningrad: Khimiya; 1989. 88 p. (In Russian)
18. Krestov GA, Novoselov NP, Perelygin IS, Kolker AM, Safonova LP, Ovchinnikova VD et al. *Ionic Solvation*. Moscow: Nauka; 1987. 320 p. (In Russian)

19. Kloos OV, Nedvedskaya GB, Aizina YA, Rozentsveig IB. Sulfonamides and their acidic properties in dimethylsulfoxide. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of*

Universities. Applied Chemistry and Biotechnology. 2016;6(2):23–29. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2016-6-2-23-29>

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wilkinson B.L., Innocenti A., Vullo C., Supuran C.T., Poulsen S.-A. Inhibition of carbonic anhydrases with glycosyltriazole benzene sulfonamides // *Journal of Medicinal Chemistry.* 2008. Vol. 51. Issue 6. P. 1945–1953. <https://doi.org/10.1021/jm701426t>

2. Moeker J., Mahon B.P., Bornaghi L.F., Vullo D., Supuran C.T., McKenna R., et al. Structural insights into carbonic anhydrase IX isoform specificity of carbohydrate-based sulfamates // *Journal of Medicinal Chemistry.* 2014. Vol. 57. Issue 20. P. 8635–8645. <https://doi.org/10.1021/jm5012935>

3. Lichtenstein D.R., Wolfe M.M. COX-2 selective NSAIDs: new and improved? // *Journal of the American Medical Association.* 2000. Vol. 284. Issue 10. P. 1297–1299. <https://doi.org/10.1001/jama.284.10.1297>

4. Bunyatyan N.D., Kovalenko S.N., Severina H.I., Mokhammad E.K.W., Zalevskiy S.V., Shtrygol' S.Y., et al. Synthesis and anticonvulsant activity of new 2-(4-oxo-2-thioxo-1,4-dihydro-3(2h)-quinazolinyl)acetamides // *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2020. Vol. 54. Issue 1. 6 p. <https://doi.org/10.1007/s11094-020-02147-5>

5. Shadyro O.I., Sorokin V.L., Ksendzova G.A., Savinova O.V., Samovich S.N., Boreko E.I. Comparative evaluation of the antiherpes activity of compounds with different mechanisms of action // *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2019. Vol. 53. Issue 7. P. 646–649. <https://doi.org/10.1007/s11094-019-02055-3>

6. Михайловский А.Г., Погорелова Е.С., Першина Н.Н., Махмудов Р.Р., Новикова В.В. Синтез, анальгическая, антигипоксическая и противомикробная активность (2)-2-(2-арилгидразона)-2-(3,3-диметил-3,4-дигидроизохинолин-1-ил)-ацетамидов // *Химико-фармацевтический журнал.* 2019. Т. 53. N 11. С. 25–29. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2019-53-11-25-29>

7. Костина М.Н. Пищевая приманка как наиболее безопасный метод борьбы с мухами в помещении. // *Дезинфекционное дело.* 2015. Т. 94. N 4. С. 52–60.

8. Плотникова А.С., Недведская Г.Б., Айзина Ю.А. NH-кислотность замещенных трихлорэтиламидов в среде диметилсульфоксида // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология.* 2019. Т. 9. N 1. С. 36–43. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-1-36-43>

9. Aizina J.A., Rozentsveig I.B., Levkovskaya G.G. A novel synthesis of chloroacetamide derivatives via C-amidoalkylation of aromatics by 2-chloro-N-(2,2,2-trichloro-1-hydroxyethyl)acetamide // *Arkivoc.* Arkat USA. 2011. Vol. 8. P. 192–199. <https://doi.org/10.3998/ark.5550190.0012.815>

10. Сергеев П.В. Шимановский Н.Л., Петров В.И. Рецепторы физиологически активных веществ: монография. 2-е изд., перераб. и доп. М.; Волгоград: Семь ветров, 1999. 640 с.

11. Дурнев А.Д. Середенин С.Б. Мутагены. Скрининг и фармакологическая профилактика воздействий. М.: Медицина, 1998. 328 с.

12. Айзина Ю.А. Использование современных информационных технологий для выявления биологической активности органических соединений // *Вестник ИрГТУ.* 2012. N 4 (63). С. 145–149.

13. Айзина Ю.А., Никитин А.Я., Левковская Г.Г. Расчетная методом PASS и экспериментальная оценка биологической активности сульфонамидо-полихлор-этилированных аренов и гетаренов // *Вестник ИрГТУ.* 2014. N 12 (95). С. 188–191.

14. Быкова Л.Н. Потенциал полунейтрализации как химико-аналитическая характеристика электролитов при потенциометрическом титровании // *Журнал аналитической химии.* 1969. Т. 24. N 12. С. 1781–1789.

15. Крешков А.П., Алдарова Н.Ш., Танганов Б.Б. Химико-аналитическое поведение серосодержащих алифатических дикарбоновых кислот в среде неводных растворителей // *Журнал аналитической химии.* 1970. Т. 25. N 2. С. 362–368.

16. Фиалков Ю.Я., Житомирский А.Н., Тарасенко Ю.А. Физическая химия неводных растворов. Л.: Химия, 1973. 376 с.

17. Фиалков Ю.Я. Не только в воде. 2-е изд., перераб. и доп. Л.: Химия, 1989. 88 с.

18. Крестов Г.А., Новоселов Н.П., Перельгин И.С., Колкер А.М., Сафонова Л.П., Овчинникова В.Д. [и др.]. Ионная сольватация. М.: Наука, 1987. 320 с.

19. Клоос О.В., Недведская Г.Б., Айзина Ю.А., Розенцвейг И.Б. Сульфонамиды и их кислотные свойства в диметилсульфоксиде // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология.* 2016. Т. 6. N 2. С. 23–29. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2016-6-2-23-29>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Galina B. Nedvetskaya,
Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Irkutsk State University,

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Недвецкая Галина Борисовна,
к.х.н., доцент,
Иркутский государственный университет,

1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
e-mail: galinatedvetskaya@gmail.com

Yuliya A. Aizina,
Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
National Research Irkutsk State Technical
University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
e-mail: aizina@ex.estu.edu;
Reseacher,
A.E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry
SB RAS,
1, Favorsky St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
✉ e-mail: aizina_yulia@irioch.irk.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 13.03.2021.
Approved after reviewing 29.05.2021.
Accepted for publication 30.08.2021.*

664033, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1,
Российская Федерация,
e-mail: galinatedvetskaya@gmail.com

Айзина Юлия Александровна,
к.х.н., доцент,
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
e-mail: aizina@ex.istu.edu;
научный сотрудник,
Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского
СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Фаворского, 1,
Российская Федерация,
✉ e-mail: aizina_yulia@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 13.03.2021.
Одобрена после рецензирования 29.05.2021.
Принята к публикации 30.08.2021.*

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 3 (38) 2021

12+

PROCEEDINGS OF UNIVERSITIES
Applied chemistry and biotechnology
Volume 11 No. 3 2021

Редактор О.А. Терновская
Перевод на английский язык: Thomas A. Beavitt, Anastasia Stošić,
Н.Г. Попова, Е.А. Привалова
Компьютерный набор и верстка А.В. Куртовой
Ответственный за выпуск Ю.Н. Пожидаев

Дата выхода в свет 30.09.2021. Формат 60 x 90 / 8.
Бумага офсетная. Печать цифровая. Усл. печ. л. 21.
Тираж 500 экз. Зак. 141. Поз. плана 5н.

Отпечатано в типографии издательства
ФГБОУ ВО «Иркутский национальный
исследовательский технический университет»
Адрес типографии:
664074, Россия, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 81/12А

Издание распространяется бесплатно
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, Россия, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83