

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ

ИРКУТСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

ИЗВЕСТИЯ ВУЗОВ
Прикладная химия
и биотехнология

Том 12 N 3 (42) 2022



ИЗДАТЕЛЬСТВО
Иркутского национального исследовательского
технического университета



ИЗВЕСТИЯ ВУЗОВ
Прикладная химия и биотехнология
Том 12 N 3 (42) 2022

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор:

Евстафьев С.Н.

д.х.н., профессор, заведующий кафедрой химии и биотехнологии Иркутского национального исследовательского технического университета (г. Иркутск, Россия)

Заместитель главного редактора:

Пожидаев Ю.Н.

д.х.н., профессор кафедры химии и биотехнологии 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)

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)

Рахимнеджад Мостафа

доктор наук, профессор кафедры химической инженерии Технологического университета Бабола Ноширвани (Бабол, Иран)

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)

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 Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

«Иркутский национальный исследовательский технический университет»

Подписной индекс в ООО «Урал-Пресс» – 41903

Адрес ООО «Урал-Пресс»: 620026, Свердловская область, г. Екатеринбург, ул. Мамина-Сибиряка, д.130

Адрес учредителя и издателя:

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

Адрес редакции:

664074, Россия, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83, ауд. Е-211

E-mail: biochem@istu.edu

PROCEEDINGS OF UNIVERSITIES
Applied chemistry and biotechnology
IZVESTIYA VUZOV.
Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya
Volume 12 N 3 (42) 2022
EDITORIAL BOARD

Editor in Chief :

Sergei N. Evstaf'ev

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

Deputy Editor:

Yuriy N. Pozhidaev

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

Editorial council:

Gennadiy B. Borovskii

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

Svetlana Yu. Bratskaya

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

Sergey D. Varfolomeyev

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

Francis Verpoort

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

Vladimir K. Voronov

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

Enjun Gao

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

Mirali N. Dadashev

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

Mikhail Ya. Ioelovich

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

Alexander I.

Nepomnyashchikh

Purevsuren Barnasan

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

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)

Mostafa Rahimnejad

Ph.D. in Biotechnology-Chemical Engineering, Professor of chemical engineering department, Babol Noshirvani University of Technology (Babol, Iran)

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)

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 code in Ural-Press LLC: 41903

The postal address of Ural-Press LLC: 130 Mamin-Sibiryak st.,
Yekaterinburg 620026, Russia

Address of the founder and publisher:

83 Lermontov St., Irkutsk 664074, Russian Federation

Editorial address:

E-211, 83 Lermontov St., Irkutsk 664074, Russian Federation,
E-mail: biochem@istu.edu

СОДЕРЖАНИЕ

ХИМИЧЕСКИЕ НАУКИ

Очиров О. С., Стельмах С. А., Григорьева М. Н., Окладникова В. О. Исследование гидролиза гидрогеля полигексаметиленгуанидин гидрохлорида	356
Петрушенко И. К. Квантово-химическое моделирование адсорбции водорода в порах: исследование методами DFT, SAPT0 и IGM.....	363
Дрюцкая С. М., Толстенок И. В., Якушева Н. Ю. Применение комплекса антоцианов в роли индикаторов для алкалометрического титрования.....	373

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

Шавыркина Н. А., Гисматулина Ю. А., Будаева В. В. Перспективы химической и биотехнологической переработки мискантуса	383
Макарова Л. Е., Петрова И. Г., Соколова Н. А., Макаров С. С., Пионкевич В. А. Влияние эндофитных и эпифитных азотфиксирующих бактерий на содержание негативных аллелопатических соединений в корневых экссудатах проростков гороха (<i>Pisum sativum</i> L.)	394
Файзуллин Д. А., Кобелев А. В., Клементьев С. В., Сироткин А. С., Рогов А. М., Сальников В. В., Макшакова О. Н., Зуев Ю. Ф. Применение сканирующей электронной микроскопии и ИК-спектроскопии для экспресс-оценки морфологии и химического состава бактериальных пленок при периодическом культивировании	406
Писаревская В. А., Журавлева А. С., Минич М. В., Бехбудзада Н. Б., Шагаев А. А., Марквичев Н. С. Рост и взаимодействие штаммов <i>Trichoderma spp.</i> при различных температурах	417
Максимова Л.А., Шафикова Т.Н. Эндогенные фталаты как вероятный регулятор межвидовых взаимоотношений в биоценозе	424
Дегтярева И. А., Бабынин Э. В., Прищепенко Е.А. Оценка биобезопасности наноструктурных минералов, разработанных для применения в качестве удобрений	438
Готлиб Е. М., Перушкина Е. В., Нцуму Р. Ш., Ямалеева Е. С. Влияние золы рисовой и гречневой шелухи на биоразлагаемость эпоксидных материалов.....	447

ХИМИЧЕСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ

Кулиева С. Г., Мамедов И. Г. Тестирование УФ-облучением биодизеля из масла верблюжьей колючки и дизель-биодизельных смесей	455
Батхишиг Д., Шагжав Э., Батбилег С., Анхтуя А., Пуревсурен Б. Исследование термического разложения и качества обогащения угля месторождения Могоин-гол в Монголии	462
Лукин А. С., Житов Р. Г., Баяндин В. В., Шаглаева Н. С. Исследование влияния природы пластификатора на свойства полимер-битумных композиций методом флуоресцентной микроскопии	471

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Зубков И. Н., Букин Ю. С., Сорокоумов П. Н., Шишлянников С. М. Получение полигидроксиалканоата с помощью культуры <i>Pseudomonas helmanticensis</i> в нестерильных средах, содержащих глицерин и додецилсульфат натрия.....	479
Поморцев А.В., Дорофеев Н.В., Адамович С.Н., Оборина Е.Н. Влияние протатранов на физиологические параметры яровой пшеницы при хлоридном засолении	485

CONTENTS

CHEMICAL SCIENCES

- Ochirov O. S., Stel'makh S. A., Grigor'eva M. N., Okladnikova V. O.** Study into the hydrolysis of polyhexamethylene guanidine hydrochloride 356
- Petrushenko I. K.** Quantum chemical simulation of hydrogen adsorption in pores: A study by DFT, SAPT0 and IGM methods..... 363
- Dryutskaya S. M., Tolstenok I. V., Yakusheva N. Yu.** Application of anthocyanins as indicators for alkalimetric titration..... 373

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

- Shavyrkina N. A., Gismatulina Yu. A., Budaeva V. V.** Prospects for chemical and biotechnological processing of miscanthus 383
- Makarova L. E., Petrova I. G., Sokolova N. A., Makarov S. S., Pionkevich V. A.** Influence of endophytic and epiphytic nitrogen-fixing bacteria on the content of negative allelopathic compounds in root exudates of pea (*Pisum sativum* L.) seedlings 394
- Faizullin D. A., Kobelev A. V., Klement'ev S. V., Sirotkin A. S., Rogov A. M., Salnikov V. V., Makshakova O. N., Zuev Yu. F.** Application of scanning electron microscopy and IR spectroscopy for a timely evaluation of the morphology and chemical composition of bacterial films during batch cultivation..... 406
- Pisarevskaya V. A., Zhuravliova A. S., Minich M. V., Behbudzada N. B., Shagaev A. A., Markvichev N. S.** *Trichoderma* spp. strains: growth and interaction at different temperatures 417
- Maksimova L. A., Shafikova T. N.** Endogenous phthalates as a prospective regulator of interspecific relations in a biocoenosis 424
- Degtyareva I. A., Babynin E. V., Prishchepenko E. A.** Nanostructured minerals developed to be used as fertilizers: biosafety evaluation..... 438
- Gotlib E. M., Perushkina E. V., Ntsoumou R. Sch., Yamaleeva E. S.** Effects of rice and buckwheat husk ash on the biodegradability of epoxy materials..... 447

CHEMICAL TECHNOLOGY

- Guliyeva S. G., Mamedov I. G.** UV irradiation testing of biodiesel from the Alhagi oil and diesel-biodiesel mixtures..... 455
- Batkhisig D., Shagjav E., Batbileg S., Ankhtuya A., Purevsuren B.** Study on thermal decomposition and enrichment quality of coal from Mogoin gol deposit in Mongolia 462
- Lukin A. S., Zhitov R. G., Bayandin V. V., Shaglaeva N. S.** Study into the effect of plasticizer nature on the properties of polymer-bitumen compositions via fluorescence microscopy 471

BRIEF COMMUNICATION

- Zubkov I. N., Bukin Yu. S., Sorokoumov P. N., Shishlyannikov S. M.** Preparation of polyhydroxyalkanoates using *Pseudomonas helmanticensis* in non-sterile media containing glycerol and sodium dodecyl sulfate 479
- Pomortsev A. V., Dorofeev N. V., Adamovich S. N., Oborina E. N.** Effect of protatranes on the physiological parameters of spring wheat under chloride salinity conditions 485

Научная статья
УДК 541.64.547.304
DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-356-362>



Исследование гидролиза гидрогеля полигексаметиленгуанидин гидрохлорида

Олег Сергеевич Очиров, Сергей Александрович Стельмах,
Мария Николаевна Григорьева, Валерия Олеговна Окладникова

Байкальский институт природопользования СО РАН, г. Улан-Удэ, Российская Федерация
Автор, ответственный за переписку: Очиров Олег Сергеевич, ochirov.o.s@yandex.ru

Аннотация. Разработка новых материалов для терапии повреждений кожных покровов является комплексной задачей и должна состоять из целого цикла исследований. Так, одним из актуальных направлений является поиск и создание новых основ для ранозаживляющих препаратов наружного применения. К химическим соединениям, способным выступить в качестве такой основы, можно отнести полимерные гидрогели, представляющие собой пространственно-сшитые макромолекулы, сильнонабухающие в растворителе. Наличие такого свойства открывает возможности загружать в гидрогель лекарственные препараты как синтетического, так и растительного происхождения. Весьма значимо произвести поиск такого гелеобразующего полимера, который способен помимо функции носителя лекарственных веществ выступить и в качестве активного компонента средства, т. е. обладать собственной активностью при терапии повреждений кожных покровов. Ранее нами были получены гидрогели полигексаметиленгуанидин гидрохлорида путем сшивки концевых аминогрупп формальдегидом. Исследования ранозаживляющей активности показали, что гидрогель и композиции на его основе как минимум сопоставимы с широко применяемыми средствами, такими как левомеколь, бепантен и пр., при этом они проявляют собственную активность, гидрогель полигексаметиленгуанидин гидрохлорида может выступать как перспективная платформа для конструирования лекарственных препаратов. В рамках данной работы было проведено исследование продуктов деструкции гидрогеля в результате гидролиза. Методами ИК- и УФ-спектроскопии была оценена концентрация продуктов деструкции гидрогеля в динамике, а также предположен ее механизм с высвобождением исходного полигексаметиленгуанидин гидрохлорида и формальдегида в гем-диольной форме.

Ключевые слова: полигексаметиленгуанидин гидрохлорид, формальдегид, гидрогель, гидролиз

Финансирование. 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. Исследование гидролиза гидрогеля полигексаметиленгуанидин гидрохлорида // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2022. Т. 12. N 3. С. 356–362. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-356-362>.

CHEMICAL SCIENCES

Original article

Study into the hydrolysis of polyhexamethylene guanidine hydrochloride

Oleg S. Ochirov, Sergey A. Stel'makh, Maria N. Grigor'eva, Valeria O. Okladnikova

Baikal Institute of Nature Management SB RAS, Ulan-Ude, Russian Federation
Corresponding author: Oleg S. Ochirov, ochirov.o.s@yandex.ru

Abstract. The development of new preparations for managing skin lesions is a task requiring a complex research approach. Thus, one promising direction consists in the creation of new bases for wound-healing drugs for external application. Chemical compounds that can be used as such bases include polymeric hydrogels, representing spatially cross-linked macromolecules that swell in a solvent. This property provides an opportunity to load hydrogels with drugs of both synthetic and herbal origin. A search for a gel-forming polymer acting not

© Очиров О. С., Стельмах С. А., Григорьева М. Н., Окладникова В. О., 2022

only as a drug carrier, but also as a healing agent presents a relevant research task. In a previous work, the authors obtained polyhexamethylene guanidine hydrochloride hydrogels by crosslinking terminal amino groups with formaldehyde. The conducted studies of the wound-healing capacity of the obtained hydrogels and compositions on their basis confirmed their comparability with such widely-used agents, as levomecol, bepantene, etc. In addition, the obtained compositions were found to exhibit their own activity. Therefore, hydrogels based on polyhexamethylene guanidine hydrochloride can be used as a promising platform for drug design. In this work, the destruction products released during hydrolysis of the hydrogel under study were investigated. IR and UV spectroscopy methods were applied to evaluate the concentration of hydrogel destruction products over time. A mechanism of hydrogel destruction yielding the initial polyhexamethylene guanidine hydrochloride and formaldehyde in a gem-diol form is proposed.

Keywords: polyhexamethylene guanidine hydrochloride, formaldehyde, hydrogel, hydrolysis

Funding. The study was carried out within the framework of the state task of the Baikal Institute of Nature Management SB RAS no. 0273-2021-0007.

For citation: Ochirov O. S., Stel'makh S. A., Grigor'eva M. N., Okladnikova V. O. Study into the hydrolysis of polyhexamethylene guanidine hydrochloride. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2022;12(3):356-362. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-356-362>.

ВВЕДЕНИЕ

Препараты для терапии повреждений кожных покровов бывают двух видов: общеклеточные и тканеспецифические. Средства на полимерных основах относятся ко вторым [1] в первую очередь из-за того, что лекарственные вещества, загруженные в них, стимулируют процесс ранозаживления, оказывая антибактериальный, противовоспалительный, антиоксидантный и прочие эффекты. Во-вторых, сама основа чаще всего нейтральная по отношению к организму и обеспечивает тиксотропность, т. е. закрепление на раневой поверхности, а также равномерность распределения на поверхности раны. Наиболее популярными полимерными основами для препаратов наружного применения являются производные поливинилового спирта, полиэтиленоксид, хитозан и др. [2–17]. Ранее [18–19] нами были проведены исследования ранозаживляющей активности гидрогеля полигексаметиленгуанидин гидрохлорида и композиций на его основе с экстрактами лекарственных растений (*Bergenia crassifolia*, *Calendula officinalis*, *Tussilago farfara*) в условиях моделирования повреждений кожных покровов (линейная кожно-мышечная рана, термический ожог), а также проведены исследования по оценке острой токсичности при пероральном пути введения в организм. Исследования показали, что полное заживление раны происходит на 13–14 сутки, что сопоставимо с эффективностью широко применяемых препаратов. При этом было установлено, что гидрогель склонен к деградации по истечении определенного времени с образованием золь-фракции, изучение состава которой проведено в рамках данной работы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез полигексаметиленгуанидин гидрохлорида (ПГМГх) был осуществлен путем поликонденсации в расплаве гуанидин гидрохлорида (ГГХ) и гексаметилендиамина (ГМДА) при моль-

ном соотношении мономеров 1:1,4 соответственно в течение 3 ч при температуре 165 °С.

Определение количества концевых аминогрупп исходного ПГМГх проводилось методом обратного титрования по стандартной методике. Расчеты осуществлялись по следующей формуле [20]:

$$v_{NH_2} = C_1V_1 - C_2V_2, \quad (1)$$

где C_1 – концентрация кислоты HCl; V_1 – объем кислоты HCl; C_2 – концентрация NaOH; V_2 – объем NaOH, использованный для титрования кислоты.

К раствору полимера объемом 5 мл с концентрацией 3 г/дл (навеска 0,15 г) добавлялось 5 мл 0,01 Н раствора HCl и несколько капель индикатора метилового оранжевого до появления розового окрашивания. Далее раствор титровался 0,02 Н NaOH до перехода розовой окраски в соломенную. Раствор сравнения состоял из 5 мл дистиллированной воды и 5 мл 0,1 Н HCl.

$$N_0 = \frac{1 \text{ мольГГХ} + 1 \text{ мольГМДА}}{M(\text{ГГХ}) + M(\text{ГМДА})}$$

$$N_T = \frac{C_1V_1 - C_2V_2}{g},$$

где N_0 – исходное количество аминогрупп (моль/г); N_T – количество непрореагировавших аминогрупп (моль/г); g – навеска полимера.

В результате измерений были получены следующие данные: $N_{NH_2} = 0,0105$ моль/г;

$$N_0 = 0,00775 \text{ моль/г}; N_T = 0,00286 \text{ моль/г}.$$

Синтез гидрогеля полигексаметиленгуанидин гидрохлорида проводился путем сшивки концевых аминогрупп ранее синтезированного полимера. Для этого к навеске ПГМГх, растворенного в дистиллированной воде, добавляли 10%-й раствор формалина (избыток) порционно при комнатной температуре и интенсивном перемешивании. Синтез геля проводили в течение 1 ч, после чего сформированный гель отфильтровывали, промывали на воронке Бюхнера и сушили на воздухе. Равновесная степень набухания полученного гидрогеля (Q_p) вычислена по формуле:

$$Q_p = (m_n - m_c) / m_c,$$

где m_n и m_c – масса набухшего и сухого образцов, которая составляет 64,9 г/г.

Определение количества концевых аминогрупп в гидролизате было осуществлено методом обратного титрования по стандартной методике. Расчеты проводились по формуле (1).

1 г набухшего гидрогеля помещался в бюкс объемом 50 мл и оставлялся на 14 суток при комнатной температуре. После образования гидролизата забиралась проба в 0,5 мл, и к ней добавлялось 5 мл 0,01 Н раствора HCl и несколько капель индикатора метилового оранжевого до появления розового окрашивания. Далее раствор титровался 0,02 Н NaOH до перехода розовой окраски в соломенную. Раствор сравнения состоял из 5 мл дистиллированной воды и 5 мл 0,1 Н HCl.

По результатам титрования было определено количество концевых аминогрупп ПГМГх в гидролизате, составившее 0,000042 моль, что составляет 0,01494 г при пересчете в массовые значения по формуле:

$$m_{\text{полимера в гидролизате}} = \nu_{\text{NH}_2} \div N_T.$$

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); спектрофотометр Agilent 8453 UV-VISc (Agilent, США) толщиной поглощающего слоя кюветы 1 см и диапазоном длин волн 190–540 нм; ТГ/ДСК-анализ выполнен на приборе NETZSCH STA 449 C (Netzsch, Германия) в атмосфере воздуха с нагревом 5 °С в минуту до 1000 °С.

Методика определения концентрации гидролизата в растворе методом ИК-спектроскопии. Анализируемую пробу, содержащую 1 г набухшего гидрогеля, помещали в бюкс объемом 50 мл и оставляли при комнатной температуре на 14 суток. Образовавшийся гидролизат переносился на приставку НПВО пипеткой на 0,1 мл. Измерения проводились в 3-х последовательностях. В качестве фона использовалась дистиллированная вода.

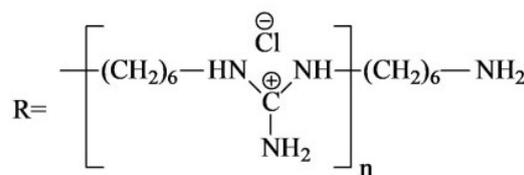
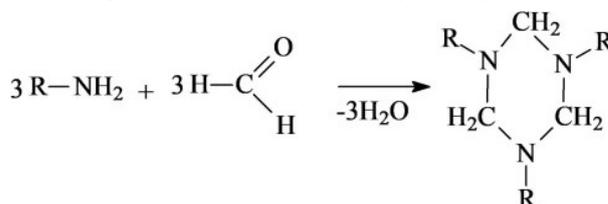
Методика определения концентрации гидролизата в растворе методом УФ-спектроскопии. Анализируемую пробу, содержащую 1 г набухшего гидрогеля, помещали в бюкс объемом 50 мл и оставляли при комнатной температуре на 14 суток. Образовавшийся гидролизат переносился в колбу объемом 1000 мл, разбавлялся дистиллированной водой до метки и перемешивался. Далее 1 мл полученного раствора переливался в колбу объемом 25 мл, к нему приливали 9 мл дистиллированной воды и все перемешивали. 2 мл полученного раствора загружалось в кварцевую кювету толщиной 10 мм. В качестве раство-

ра сравнения выступала дистиллированная вода. Измерения проводились в 3-х последовательностях.

В обеих методиках для построения калибровочного графика использовался раствор исходного полигексаметиленгуанидин гидрохлорида. Количественное определение проводилось по оценке зависимости интенсивности гуанидиновых полос от концентрации в растворе – для ИК это полоса при 1630 см^{-1} , для УФ – 200 нм.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как уже описывалось выше, синтез гидрогеля полигексаметиленгуанидин гидрохлорида (ПГМГх-г) проводился путем сшивки концевых аминогрупп формальдегидом (схема).



В результате взаимодействия образуется цикл в местах сшивок концевых аминогрупп, строение которого было подтверждено ТГ/ДСК-анализом и ИК-спектроскопией (рис. 1) [20].

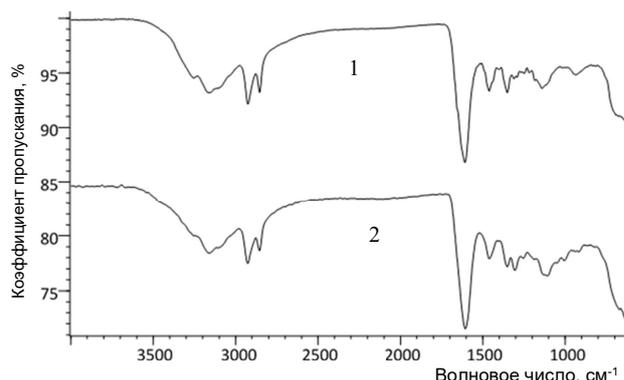


Рис. 1. ИК-спектры: 1 – ПГМГх; 2 – ПГМГх-г

Fig. 1. IR spectra: 1 – polyhexamethylene guanidine hydrochloride (PHMGhc); 2 – polyhexamethylene guanidine hydrochloride gel (PHMGpc-g)

Так, атомы азота, между которыми изолирована метиленовая группа, проявляют отрицательный индуктивный эффект, что приводит к усилению полярности $-\text{CH}_2-$ группы, блокируя тем самым ножничные деформационные коле-

бания (1460 см^{-1}) и провоцируя при этом усиление веерных и крутильных колебаний в диапазоне от 1300 до 1270 см^{-1} (рис. 2) [20].

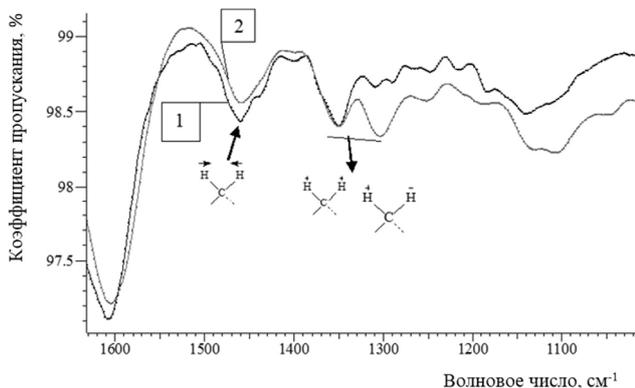


Рис. 2. Область ИК-спектров $1600\text{--}1000 \text{ см}^{-1}$:
 1 – ПГМГГх; 2 – ПГМГГх-г
Fig. 2. IR spectrum range $1600\text{--}1000 \text{ см}^{-1}$:
 1 – PHMGhc; 2 – PGMGhc-g

Методом ТГ/ДСК (рис. 3) показано, что начало потери массы наблюдается при достижении 100 °C и связано с испарением воды из образца гидрогеля, термическая деструкция полимера, сопровождающаяся экзотермическим эффектом, начинается со 175 °C .

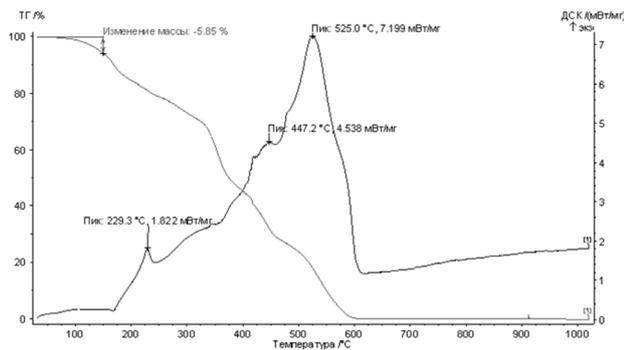


Рис. 3. ТГ/ДСК кривые ПГМГГх-г
Fig. 3. TG/DSC curves PGMGgh-g

На ДСК кривой при 229 °C присутствует экзотермический эффект, который не наблюдается на кривой ДСК исходного полимера (рис. 4) [20].

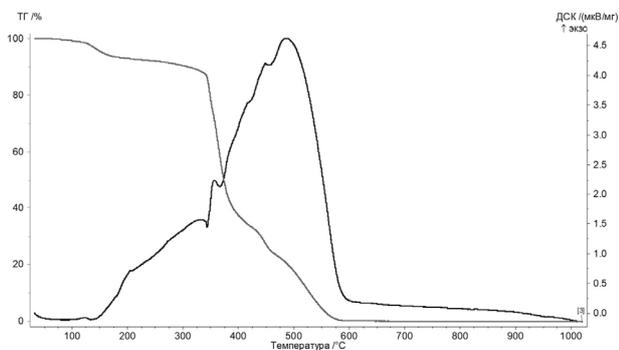


Рис. 4. ТГ/ДСК кривые ПГМГГх
Fig. 4. TG/DSC curves PGMGgh

Принципиальное отличие структуры исходного полимера и гидрогеля заключается в наличии $-\text{CH}_2-$ группы, изолированной между атомами азота в местах сшивок, поэтому можно сделать вывод о том, что термическая деструкция гидрогеля начинается именно с разрушения метиленового мостика.

Установлено, что в течение 10–14 суток происходит падение массы набухшего гидрогеля (m_t) ввиду его гидролиза (рис. 5).

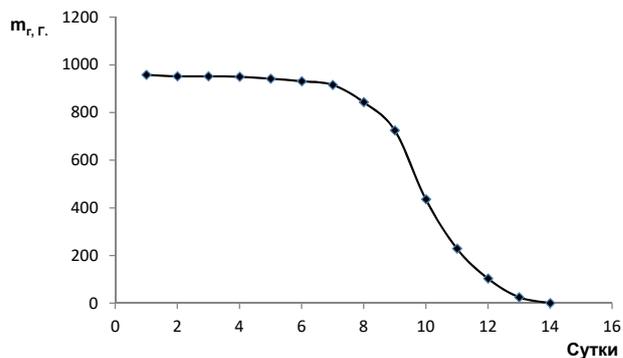


Рис. 5. Динамика изменения m_t в течение 14 суток
Fig. 5. Dynamics of changes in swollen hydrogel mass (m_t) within 14 days

Было сделано предположение о процессе гидролиза гидрогеля с последующим разрушением структуры в местах сшивок.

Для подтверждения предположения продукт разложения гидрогеля был исследован несколькими методами, такими как ИК-, УФ-спектроскопия, гравиметрия, обратное титрование. Подход к реализации спектрометрических методов основывался на приготовлении растворов с заранее заданной концентрацией для построения калибровочного графика с последующей оценкой концентрации проб по интенсивности наиболее четких полос в спектре. В обоих методах наибольшей интенсивностью обладают пики, характеризующие наличие гуанидиновой группы, поэтому калибровка проводилась по ней.

Для подтверждения данных, полученных инструментальными методами, был применен метод обратного титрования, т. к. в результате гидролиза гидрогеля предположительно образуется исходный полимер ПГМГГх, у которого будут свободные концевые аминогруппы. Гидролизат был упарен досуха, остаток был взвешен ($0,01516 \text{ г}$), после чего была рассчитана его концентрация в исходном растворе. Сводные данные приведены в таблице.

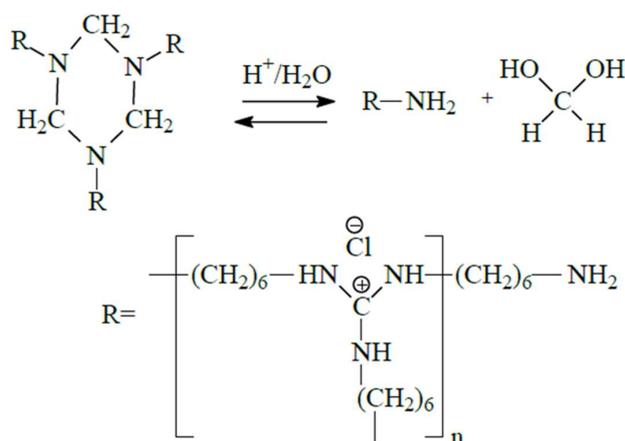
Исходя из полученных данных, можно сделать вывод о практически 100%-м гидролизе, что продемонстрировано результатами определения концентраций ПГМГГх в гидролизате методами ИК- и УФ-спектроскопии, а также полученными значениями масс полимера в гидролизате методами обратного титрования и гравиметрии (переведены в концентрации).

Концентрация (С) ПГМГх в растворе после гидролиза, определенная методами обратного титрования, гравиметрии, ИК- и УФ-спектроскопии

Concentration (C) of PHMGhc in solution after hydrolysis determined by back titration, gravimetry, IR and UV spectroscopy

С по результатам титрования, г/дл	С по результатам гравиметрии, г/дл	С по результатам ИК-спектроскопии, г/дл	С по результатам УФ-спектроскопии, г/дл
1,494	1,516	1,498	1,484

Определить наличие формальдегида в растворе гидролизата не удалось, в связи с чем было предположено, что образуется гем-диольная форма, определение которой весьма затруднено. Была предложена предположительная схема процесса гидролиза гидрогеля ПГМГх-г:



Следует отметить, что процесс, по всей видимости, обратимый, т. к. при упаривании гидролизата при комнатной температуре приводит к регенерации гидрогеля, что, в свою очередь, косвенно подтверждает сложность обнаружения формальдегида в гем-диольной форме, а т. к. со временем количество растворителя уменьшается, то снова происходит взаимодействие с концевыми аминогруппами и последующим формированием гидрогеля.

Установлено, что гидрогель полигексаметиленгуанидин гидрохлорида, полученный путем сшивки концевых аминогрупп, при длительном хранении в набухшем состоянии претерпевает гидролиз с образованием исходного полимера. Описанная особенность не является недостатком такого материала ввиду того, что образующийся исходный полигексаметиленгуанидин гидрохлорид будет оказывать местное антимикробное действие при контакте с раной, а при загрузке в гидрогель лекарственных веществ обеспечит их равномерное высвобождение. Хранение гидрогеля в таком случае следует осуществлять либо при низкой температуре, либо в полностью высохшем состоянии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что гидрогель полигексаметиленгуанидин гидрохлорида, полученный путем сшивки концевых аминогрупп, при длительном хранении в набухшем состоянии претерпевает гидролиз с образованием исходного полимера. Описанная особенность не является недостатком такого материала ввиду того, что образующийся исходный полигексаметиленгуанидин гидрохлорид будет оказывать местное антимикробное действие при контакте с раной, а при загрузке в гидрогель лекарственных веществ обеспечит их равномерное высвобождение. Хранение гидрогеля в таком случае следует осуществлять либо при низкой температуре, либо в полностью высохшем состоянии.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Шабанов П. Д. Фармакология лекарственных препаратов пептидной структуры // Психофармакология и биологическая наркология. 2008. Т. 8. N 3-4. С. 2399-2425.
2. Yang H., Lan X., Xiong Y. In situ growth of zeolitic imidazolate framework-I in macroporous PVA/CMC/PEG composite hydrogels with synergistic antibacterial and rapid hemostatic functions for wound dressing // Gels. 2022. Vol. 8, no. 5. P. 279. <https://doi.org/10.3390/gels8050279>.
3. Zarandona I., Bengoechea C., Alvarez-Castillo E., de la Caba K., Guerrero A., Guerrero P. 3D printed chitosan-pectin hydrogels: from rheological characterization to scaffold development and assessment // Gels. 2021. Vol. 7, no. 4. P. 175. <https://doi.org/10.3390/gels7040175>.
4. Vasil'kov A., Rubina M., Naumkin A., Buzin M., Dorovatovskii P., Peters G., et al. Cellulose-based hydrogels and aerogels embedded with silver nanoparticles: preparation and characterization // Gels. 2021. Vol. 7, no. 3. P. 82. <https://doi.org/10.3390/gels7030082>.
5. O'Connor N. A., Syed A., Wong M., Hicks J., Nunez G., Jitianu A., et al. Polydopamine antioxidant hydrogels for wound healing applications // Gels. 2020. Vol. 6, no. 4. P. 39. <https://doi.org/10.3390/gels6040039>.
6. Галаев Ю. В. Умные полимеры в биотехно-

- логии и медицине // Успехи химии. 1995. Т. 64. N 5. С. 505-524.
7. Валуев И. Л., Кудряшов В. К., Обыденнова И. В., Сытов Г. А., Валуев Л. И. Исследование свойств гидрогелей на основе сополимеров 2-гидроксиэтилметакрилата // Вестник Московского университета. Серия 2. Химия. 2003. Т. 44. N 2. С. 149-152.
8. Куренков В. Ф. Водорастворимые полимеры акриламида // Соросовский образовательный журнал. 1997. N 5. С. 48-53.
9. Машковский М. Д. Лекарственные средства. М.: Новая волна, 2012. 1216 с.
10. Филиппова О. Е. «Умные» полимерные гели // Высокомолекулярные соединения. Серия Б. 2000. Т. 32. N 9. С. 1368-1372.
11. Милявский А. И., Логадырь Т. А., Винцера Г. А., Кривошеин Ю. С. Эффективность Мирамистина в дерматовенерологии // Вестник дерматологии и венерологии. 1996. N 2. С. 67-69.
12. Falamarsian M., Varchosaz J. The effect of structural changes on swelling kinetics of polybasic/hydrophobic pH-sensitive hydrogels // Drug Development and Industrial Pharmacy. 1998. Vol. 24, no. 7. P. 667-669. <https://doi.org/10.3109/03639049809082369>.
13. Möller S., Weisser J., Bischoff S., Schnabelrauch M. Dextran and hyaluronan methacrylate based hydrogels as matrices for soft tissue reconstruction // Biomolecular Engineering. 2007. Vol.

24, no. 5. P. 496–504. <https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2007.08.014>.

14. Nguyen K. T., West J. L. Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications // *Biomaterials*. 2002. Vol. 23, no. 22. P. 4307–4314.

15. West J. L., Hubbell J. A. Photopolymerized hydrogel materials for drug delivery applications // *Reactive Polymers*. 1995. Vol. 25, no. 2. P. 139–147. [https://doi.org/10.1016/0923-1137\(94\)00096-N](https://doi.org/10.1016/0923-1137(94)00096-N).

16. Гольцов С. В., Гольцова Е. Н., Гетьман А. Д., Юрков А. С., Чеснокова М. З., Шемонаева О. А. CELLGEL – новое слово в ранозаживлении // *Дерматология в России*. 2017. N S1. С. 28–33.

17. Дуданов И. П., Виноградов В. В., Криштоп В. В., Никонорова В. Г. Преимущества и недостатки гелевых покрытий в терапии ожоговых ран и ожогов (обзор литературы) // *Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание*. 2022. Т. 16. N 2. С. 13–22. <https://doi.org/10.24412/2075-4094-2022-2-1-2>.

18. Лебедева С. Н., Очиров О. С., Стельмах С. А., Григорьева М. Н., Жамсаранова С. Д., Могнонов Д. М. Ранозаживляющее действие гидрогеля полигексаметиленгуанидин гидрохлорида при ожогах // *Acta Biomedica Scientifica (East Siberian Biomedical Journal)*. 2017. Т. 2. N 4. С. 93–96. https://doi.org/10.12737/article_59fad51d481658.42549272.

19. Лебедева С. Н., Очиров О. С., Григорьева М. Н., Жамсаранова С. Д., Стельмах С. А., Могнонов Д. М. Острая токсичность гидрогеля полигексаметиленгуанидин гидрохлорида // *Acta Biomedica Scientifica (East Siberian Biomedical Journal)*. 2020. Т. 5. N 4. С. 103–107. <https://doi.org/10.29413/ABS.2020-5.4.15>.

20. Очиров О. С., Стельмах С. А., Могнонов Д. М. Гидрогели на основе полиалкилгуанидинов и альдегидов // *Высокомолекулярные соединения. Серия Б*. 2016. Т. 58. N 3. С. 262–268. <https://doi.org/10.7868/S2308113916030104>.

REFERENCES

1. Shabanov P. D. Pharmacology of drugs with a peptide structure. *Psikhofarmakologiya i biologicheskaya narkologiya = Psychopharmacology and Biological Narcology*. 2008;8(3-4):2399-2425. (In Russian).

2. Yang H., Lan X., Xiong Y. In situ growth of zeolitic imidazolate framework-I in macroporous PVA/CMC/PEG composite hydrogels with synergistic antibacterial and rapid hemostatic functions for wound dressing. *Gels*. 2022;8(5):279. <https://doi.org/10.3390/gels8050279>.

3. Zarandona I., Bengoechea C., Álvarez-Castillo E., de la Caba K., Guerrero A., Guerrero P. 3D printed chitosan-pectin hydrogels: from rheological characterization to scaffold development and assessment. *Gels*. 2021;7(4):175. <https://doi.org/10.3390/gels7040175>.

4. Vasil'kov A., Rubina M., Naumkin A., Buzin M., Dorovatovskii P., Peters G., et al. Cellulose-based hydrogels and aerogels embedded with silver nanoparticles: preparation and characterization. *Gels*. 2021;7(3):82. <https://doi.org/10.3390/gels7030082>.

5. O'Connor N. A., Syed A., Wong M., Hicks J., Nunez G., Jitianu A., et al. Polydopamine antioxidant hydrogels for wound healing applications. *Gels*. 2020;6(4):39. <https://doi.org/10.3390/gels6040039>.

6. Galaev Yu. V. Smart polymers in biotechnology and medicine. *Uspekhi Khimii*. 1995;64(5):505-524. (In Russian).

7. Valuev I. L., Kudryashov V. K., Obydenova I. V., Sytov G. A., Valuev L. I. An investigation of properties of hydrogels based on 2-hydroxyethylmethacrylate copolymers. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 2. Khimiya = Moscow University Chemistry Bulletin*. 2003;44(2):149-152. (In Russian).

8. Kurenkov V. F. Water-soluble acrylamide polymers. *Sorosovskii obrazovatel'nyi zhurnal*. 1997;(5):48-53. (In Russian).

9. Mashkovsky M. D. *State pharmacopeia of the Russian Federation*. Moscow: Novaya Volna, 2012. 1216 p. (In Russian).

10. Filippova O. E. "Smart" polymer gels. *Vysoko-*

molekulyarnye soedineniya. Seriya B. 2000;32(9):1368-1372. (In Russian).

11. Milyavskii A. I., Logadyr' T. A., Vinterskaya G. A., Krivoshein Yu. S. The effectiveness of Miramistin in dermatovenereology. *Vestnik Dermatologii i Venereologii*. 1996;(2):67-69. (In Russian).

12. Falamarsian M., Varchosaz J. The effect of structural changes on swelling kinetics of polybasic/hydrophobic pH-sensitive hydrogels. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 1998;24(7):667-669. <https://doi.org/10.3109/03639049809082369>.

13. Möller S., Weisser J., Bischoff S., Schnabelrauch M. Dextran and hyaluronan methacrylate based hydrogels as matrices for soft tissue reconstruction. *Biomolecular Engineering*. 2007;24(5):496-504. <https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2007.08.014>.

14. Nguyen K. T., West J. L. Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials*. 2002;23(22):4307-4314.

15. West J. L., Hubbell J. A. Photopolymerized hydrogel materials for drug delivery applications. *Reactive Polymers*. 1995;25(2):139-147. [https://doi.org/10.1016/0923-1137\(94\)00096-N](https://doi.org/10.1016/0923-1137(94)00096-N).

16. Gol'tsov S. V., Gol'tsova E. N., Get'man A. D., Yurkov A. S., Chesnokova M. Z., Shemonaeva O. A. CELLGEL – a new word in wound healing. *Dermatologiya v Rossii*. 2017;S1:28-33. (In Russian).

17. Дуданов И. П., Виноградов В. В., Криштоп В. В., Никонорова В. Г. Advantages and disadvantages of b gels for local treatment of burn wounds and scars. 2022;16(2):13-22. (In Russian). <https://doi.org/10.24412/2075-4094-2022-2-1-2>.

18. Lebedeva S. N., Ochirov O. S., Stelmakh S. A., Grigoryeva M. N., Zhamsaranova S. D., Mognonov D. M. Wound healing effect of polyhexamethylene guanidine hydrochloride hydrogelat burns. *Acta Biomedica Scientifica (East Siberian Biomedical Journal)*. 2017;2(4):93-96. (In Russian). https://doi.org/10.12737/article_59fad51d481658.42549272.

19. Lebedeva S. N., Ochirov O. S., Grigoryeva M. N., Zhamsaranova S. D., Stelmakh S. A., Mognonov D. M. Acute toxicity of hydrogel polyhexamethylene guanidine hydrochloride. *Acta Biomedica Scientifica (East Si-*

berian Biomedical Journal). 2020;5(4):103-107. <https://doi.org/10.29413/ABS.2020-5.4.15>. (In Russian).

20. Ochirov O. S., Stel'makh S. A., Mognonov D. M. Hydrogels based on polyalkylguanidines and al-

dehydes. *Vysokomolekulyarnye Soedineniya. Seriya B.* 2016;58(3):262-268. <https://doi.org/10.7868/S2308113916030104>. (In Russian).

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

О. С. Очиров,

к.фарм.н., ведущий инженер лаборатории химии полимеров,
Байкальский институт природопользования СО РАН,
670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6,
Российская Федерация,
ochirov.o.s@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-2317-4105>

С. А. Стельмах,

к.х.н., старший научный сотрудник лаборатории химии полимеров,
Байкальский институт природопользования СО РАН,
670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6,
Российская Федерация,
S_stelmakh@bk.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3392-5600>

М. Н. Григорьева,

к.фарм.н., ведущий инженер лаборатории химии полимеров,
Байкальский институт природопользования СО РАН,
670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6,
Российская Федерация,
Gmn_07@bk.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4184-2805>

В. О. Окладникова,

инженер лаборатории химии полимеров,
Байкальский институт природопользования СО РАН,
670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6,
Российская Федерация,
Lera-okladnikova@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-0903-8780>

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.

Информация о статье

Поступила в редакцию 21.06.2022.
Одобрена после рецензирования 09.09.2022.
Принята к публикации 15.09.2022.

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., 670047, Ulan-Ude,
Russian Federation,
ochirov.o.s@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-2317-4105>

Sergey A. Stelmakh,

Cand. Sci. (Chemistry), Senior Researcher,
Laboratory of Polymer Science,
Baikal Institute of Nature Management SB RAS,
6, Sahyanova St., 670047, Ulan-Ude,
Russian Federation,
s_stelmakh@bk.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3392-5600>

Maria N. Grigor'eva,

Cand. Sci. (Chemistry), Lead Engineer,
Laboratory of Polymer Science,
Baikal Institute of Nature Management SB RAS,
6, Sahyanova St., 670047, Ulan-Ude,
Russian Federation,
gmn_07@bk.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4184-2805>

Valeria O. Okladnikova,

Engineer,
Laboratory of Polymer Science,
Baikal Institute of Nature Management SB RAS,
6, Sahyanova St., 670047, Ulan-Ude,
Russian Federation,
lera-okladnikova@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-0903-8780>

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.

Information about the article

The article was submitted 21.06.2022.
Approved after reviewing 09.09.2022.
Accepted for publication 15.09.2022.

Научная статья

УДК 544.18

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-363-372>



Квантово-химическое моделирование адсорбции водорода в порах: исследование методами DFT, SAPT0 и IGM

Игорь Константинович Петрушенко

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

Автор, ответственный за переписку: Петрушенко Игорь Константинович, igor.petrushenko@istu.edu

Аннотация. Привлекательность водорода как универсального энергоносителя определяет значительный интерес к нему со стороны прикладной химии. Одной из центральных проблем, которую необходимо решить для перехода к водородной энергетике, является проблема его хранения. Физическая адсорбция водорода в порах – это практически важный и эффективный метод хранения водорода. Среди существующих адсорбирующих водород материалов углеродные наноструктуры обладают рядом преимуществ: высокой адсорбционной емкостью, значительной прочностью и низким весом. В данной работе с помощью современных методов квантовой химии (DFT, SAPT0, IGM) изучена адсорбция молекулярного водорода в ряде модельных щелевидных углеродных микропор с расстоянием между стенками $d = 4–10 \text{ \AA}$, включая введение молекулы H_2 в пору, наполнение поры этими молекулами и изучение взаимодействий между молекулами H_2 внутри поры. Установлено, что в зависимости от величины параметра d , адсорбированные молекулы водорода образуют один ($d = 6, 7 \text{ \AA}$) или два слоя ($d = 8, 9, 10 \text{ \AA}$) внутри поры. В то же самое время для пор с малым d наблюдались высокие потенциальные барьеры введения H_2 в пору. Разложение энергии взаимодействия на компоненты показало, что дисперсионные взаимодействия дают основной вклад в энергию притяжения (72–82%), причем с увеличением числа молекул H_2 , адсорбированных в пору, их значимость снижается (вплоть до 61%), а вклад в межмолекулярное притяжение электростатических и индукционных взаимодействий растет. Также были определены значения гравиметрической плотности (GD) для пор с $d = 6, 7, 8, 9, 10 \text{ \AA}$, которые равны соответственно 1,98; 2,30; 2,93; 3,25; 4,49 вес.%. Предполагается, что особенности адсорбции водорода в порах, выявленные в этой работе, будут способствовать применению углеродных пористых структур как среды для хранения водорода.

Ключевые слова: адсорбция, водород, DFT, SAPT0, пора, графен

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках НОЦ «Байкал» (FZZS-2021-0007).

Для цитирования: Петрушенко И. К. Квантово-химическое моделирование адсорбции водорода в порах: исследование методами DFT, SAPT0 и IGM // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2022. Т. 12. N 3. С. 363–372. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-363-372>.

CHEMICAL SCIENCES

Original article

Quantum chemical simulation of hydrogen adsorption in pores: A study by DFT, SAPT0 and IGM methods

Igor K. Petrushenko

Irkutsk National Research Technical University, Irkutsk, Russian Federation

Corresponding author: Igor K. Petrushenko, igor.petrushenko@istu.edu

Abstract. Hydrogen as a versatile energy carrier continues to attract research attention in the field of applied chemistry. One of the fundamental issues on the way to hydrogen economy is the difficulty of hydrogen storage. Physical adsorption of hydrogen in pores is a feasible and effective method of hydrogen storage. Among existing hydrogen-adsorbing materials, carbon nanostructures possess a number of advantages due to their high adsorption capacity, significant strength and low weight. In this work, we use the modern methods of quantum chemistry

© Петрушенко И. К., 2022

(DFT, SAPT0 and IGM) to study the adsorption of molecular hydrogen in a series of simulated slit-like carbon micropores with a distance between the walls of $d = 4\text{--}10 \text{ \AA}$, including the introduction of an H_2 molecule into a pore, filling pores with these molecules and investigating the interactions between H_2 molecules inside the pores. It was found that, depending on the value of parameter d , adsorbed hydrogen molecules form one ($d = 6, 7 \text{ \AA}$) or two layers ($d = 8, 9, 10 \text{ \AA}$) inside the pore. At the same time, for pores with small d values, high potential barriers to the introduction of H_2 into a pore were observed. The decomposition of the interaction energy into components showed dispersion interactions to make a major contribution to the energy of attraction (72–82%). Moreover, an increase in the number of H_2 molecules adsorbed in the pore decreases the significance of dispersion interactions (up to 61%) and increases the contribution of electrostatic and induction interactions to intermolecular attraction. Gravimetric density (GD) values were determined for pores with $d = 6, 7, 8, 9, 10 \text{ \AA}$, comprising 1.98, 2.30, 2.93, 3.25 and 4.49 wt%, respectively. It is assumed that the revealed peculiarities of hydrogen adsorption in pores will contribute to the use of carbon porous structures as a medium for hydrogen storage.

Keywords: adsorption, hydrogen, DFT, SAPT0, pore, graphene

Funding. This study was supported by Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation in the framework of Scientific and educational center “Baikal” (FZZS-2021-0007).

For citation: Petrushenko I. K. Quantum chemical simulation of hydrogen adsorption in pores: A study by DFT, SAPT0 and IGM methods. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2022;12(3):363-372. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-363-372>.

ВВЕДЕНИЕ

Привлекательность водорода как универсального энергоносителя обуславливается рядом факторов, включающих неисчерпаемость его запасов и экологическую чистоту. В настоящее время водород считается топливом будущего для использования на транспорте: при его сгорании не выделяются загрязняющие вещества, теплота его сгорания велика, кроме того, водород можно производить с помощью возобновляемых источников энергии [1]. Однако одной из основных проблем использования водорода в качестве топлива является его хранение, которое в настоящее время не может удовлетворить всех коммерческих потребностей [2]. Способы хранения подразделяются на сжижение водорода и хранение его в жидком виде, хранение в баллонах в сжатом виде, химическая и физическая адсорбция на твердых телах [3]. Проблемы хранения/аккумулирования водорода являются центральными для прикладной химии.

Физисорбция водорода – простой, но практически важный метод хранения H_2 . В разное время многие материалы были всесторонне исследованы в качестве кандидатов для твердотельного хранения водорода: гидриды металлов [4], нанопористые материалы, в основном пористый углерод [5] и металлоорганические каркасы (MOF) [6], графен [7, 8], углеродные нанотрубки (УНТ) [9, 10] и различные наноструктуры [11–13]. Графен рассматривается как потенциальная среда для хранения водорода из-за своей доступности и относительно низкой стоимости, высоких механических характеристик, низкой плотности, высокой площади поверхности [14], но низкие энергии взаимодействия H_2 /графен (порядка 1 ккал/моль) [15] не позволяют утверждать о высокой способности к хранению водорода при комнатной температуре. В последнее время рассматриваются такие способы увеличения взаимодействия систем типа

«водород–графен», как введение структурных неоднородностей, химическая модификация (например, атомами бора и азота) и «декорирование» (атомами и катионами лития, натрия и кальция) [16–20]. Кроме того, такие углеродные материалы, как щелевидные поры, цилиндры, «наносвитки», были также тщательно изучены в последнее время как среды для хранения водорода [21, 22].

Адсорбция водорода в пористых структурах является фокусом для исследований как экспериментаторов, так и теоретиков. С точки зрения использования методов молекулярного моделирования первопринципные *ab initio* методы, а также расчеты в рамках теории функционала плотности (DFT) являются удобными и точными методами изучения свойств подобных систем. Однако затраты машинного времени в этих случаях достаточно велики. В то же самое время адсорбция водорода в пористых структурах часто исследуется методом Монте-Карло в большом каноническом ансамбле (GCMC). Этот метод позволяет построить изотермы адсорбции, что способствует получению ценных данных об адсорбционной емкости исследуемых структур. В основополагающей работе В. Ванга и Дж. К. Джонсона изучалась физисорбция водорода на графите и углеродных щелевидных порах, была установлена массовая доля адсорбированного водорода в 2 весовых процента (вес.%) при температуре 20 К [23]. В статье М. Ржепки и соавторов исследовалась адсорбция водорода в микропорах и УНТ [24]. Было установлено, что щелевидные модели являются более перспективными сорбентами H_2 по сравнению с УНТ (5 и 2 вес.% соответственно). В ряде работ П. Ковальчук с соавторами определили методом GCMC гравиметрическую плотность адсорбированного водорода от 2 (303 К) до 8 (77 К) вес.% [25, 26].

В то же время применение небольших модельных систем позволяет без потери общности

использовать первопринципные методы. В данной работе с применением метода DFT, а также адаптированной на симметрию теории возмущений (SAPT0), были получены данные об особенностях «вхождения» молекул водорода в пору, о накоплении водорода в пору, а также взаимодействии молекул внутри поры. Визуализация нековалентных взаимодействий проводилась с помощью метода независимой градиентной модели (Independent Gradient Model (IGM)). Описание этого метода приведено в работах С. Лефевра и соавторов [27, 28]. Данная связка методов уже успешно применялась для изучения различных адсорбентов [7, 19, 29], она помогает всесторонне исследовать адсорбцию H_2 на различных наноструктурах, а также предсказать особенности взаимодействия в системах H_2 /пора.

ВЫЧИСЛИТЕЛЬНЫЕ МЕТОДЫ

В соответствии с работой [30], нанопора на основе графена моделировалась как щель со стенками, образованными молекулами коронена ($C_{24}H_{12}$). Расстояния между ними варьировались от 4 до 10 Å, что примерно соответствует 1–3 межплоскостным расстояниям в графите (3,35 Å) (рис. 1). Использование молекулы коронена в качестве стенок нанопоры позволяет нам, с одной стороны, учитывать возможные взаимодействия между молекулой адсорбата и большим количеством атомов, образующих стенку, а с другой стороны, требует небольшого количества машинного времени для расчета.

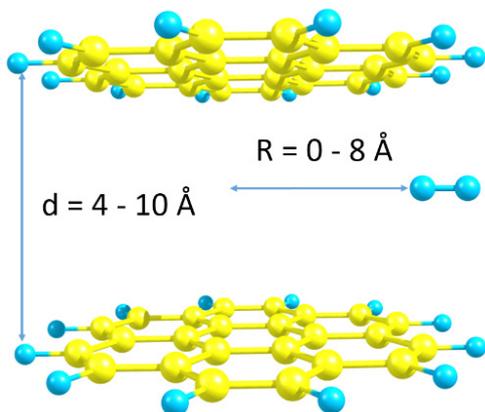


Рис. 1. Схематическое изображение поры и введения в пору молекулы водорода.

Цветовая схема: углерод – желтый, водород – голубой

Fig. 1. Schematic pore representation as well as introducing a hydrogen molecule into the pore.
 Color code: carbon – yellow, hydrogen – light-blue

Расчеты оптимальной геометрии проводились в рамках теории функционала плотности (DFT) на уровне теории BLYP/def2-SVP [31, 32] (с исполь-

зованием дисперсионной поправки С. Гримме [33]). Они были выполнены в программе ORCA 4.2.1 [34]. В то же время адаптированная по симметрии теория возмущений (SAPT0/jun-cc-pVDZ) [35] использовалась для определения энергии взаимодействия и ее компонент. Данные расчеты проводились в пакете Psi4 (v.1.2) [36]. Оптимизация структуры пор осуществлялась полностью, однако расстояния между стенками были жестко фиксированы. Потенциальные барьеры для «входа» молекул в пору, а также изменения компонент энергии взаимодействия в зависимости от расстояния проводились путем пошагового приближения молекулы водорода с расстояния 8 Å до центра поры (шаг равнялся 0,2 Å) (см. рис. 1). Молекула вводилась в пору таким образом, что расстояния между нею и обеими стенками были равны. Данные вычисления выполнялись без оптимизации геометрии пор, вычислялись лишь значения энергии в точке.

Метод SAPT0 позволяет проводить прямые вычисления нековалентных взаимодействий между двумя молекулами. Другими словами, энергия взаимодействия определяется без вычисления полной энергии мономеров или димера. Следовательно, результат не содержит так называемой ошибки суперпозиции базисного набора (BSSE). Кроме того, метод SAPT0 позволяет проводить разложение энергии взаимодействия (E_{int}) на физически значимые компоненты: электростатическую (E_{el}), обменную (E_{ex}), индукционную (поляризационную) (E_{ind}) и дисперсионную (E_{disp}). В методе SAPT0 гамильтониан димера раскладывается на вклады от каждого мономера и потенциал взаимодействия:

$$H = F_A + W_A + F_B + W_B + V,$$

где гамильтониан (H) записывается в виде суммы обычных операторов Фока (F) для мономеров, флуктуационного потенциала каждого мономера (W) и потенциала взаимодействия (V). Операторы Фока рассматриваются как гамильтониан нулевого порядка, а энергия взаимодействия оценивается через разложение в рамках теории возмущений V , W_A и W_B . Через первый порядок по V включаются электростатические и обменные взаимодействия, индукция и дисперсия сначала появляются во втором порядке по V . Энергия в рамках SAPT0 определяется следующим уравнением [37]:

$$E_{SAPT} = E_{elst}^{(10)} + E_{exch}^{(10)} + E_{ind,resp}^{(20)} + E_{exch-ind,resp}^{(20)} + E_{disp}^{(20)} + E_{exch-disp}^{(20)} + \delta_{HF}^{(2)}.$$

В этих обозначениях член $E^{(vw)}$ определяет порядок в V и в W_A+W_B ; нижний индекс (resp) указывает на то, что включены эффекты орбитальной релаксации. Член $\delta_{HF}^{(2)}$ учитывает эффекты индукции более высокого порядка и включен в определение терминов SAPT0. В стандартном виде члены энергии взаимодействия вычисляются как:

$$E_{int} = E_{el} + E_{ex} + E_{ind} + E_{disp},$$

$$\text{где } E_{el} = E_{elst}^{(10)}, E_{ex} = E_{exch}^{(10)}, E_{ind} = E_{ind,resp}^{(20)} + E_{exch-ind,resp}^{(20)} + \delta_{HF}^{(2)}, E_{disp} = E_{disp}^{(20)} + E_{exch-disp}^{(20)}.$$

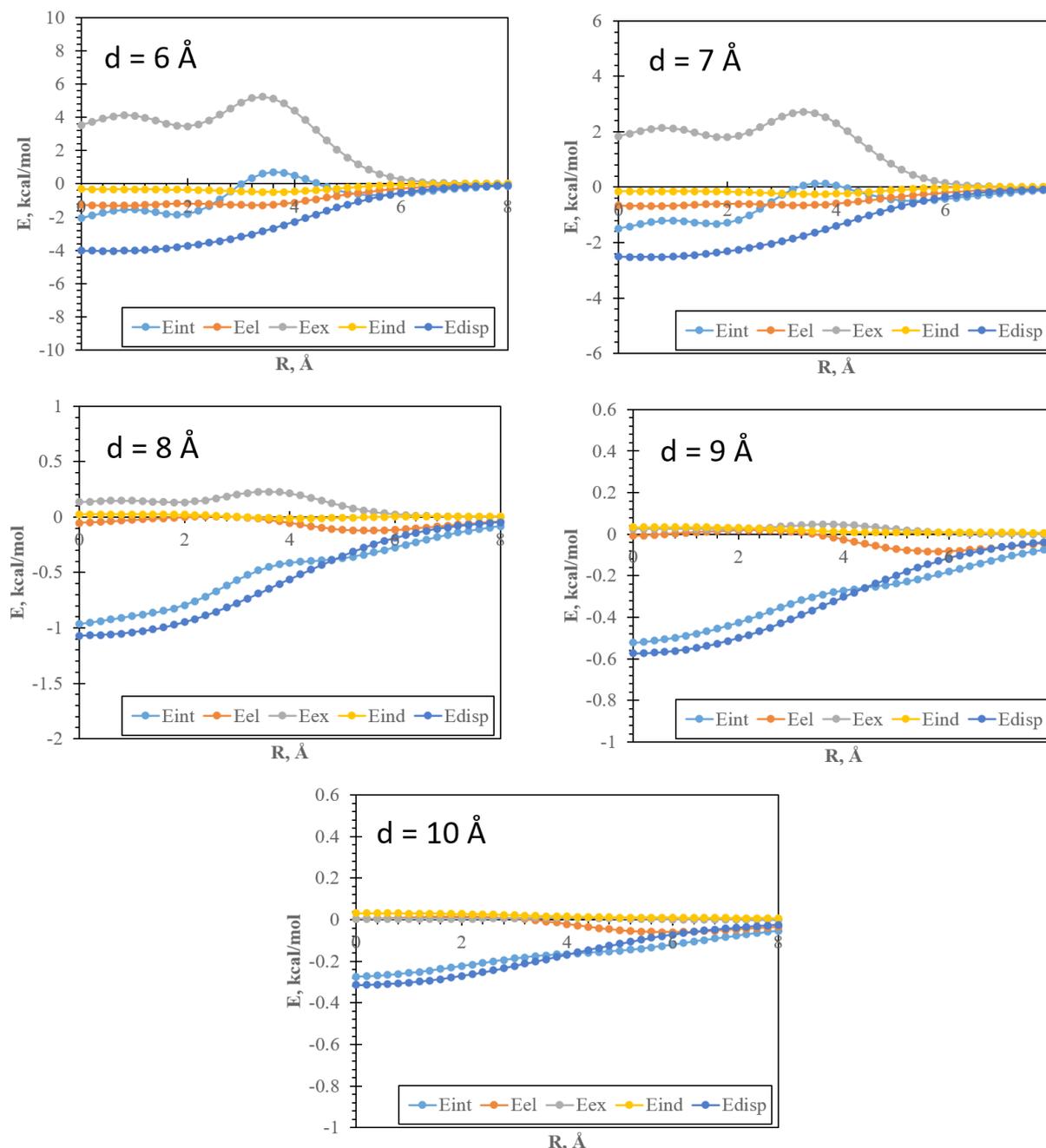


Рис. 2. Графики зависимости энергетических компонент E (ккал/моль) от расстояния R (Å) для введения молекулы H_2 в пору ($d = 6-10$ Å)
Fig. 2. E (kcal/mol) vs. R (Å) graphs for H_2 introduction into the pore ($d = 6-10$ Å)

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Рассмотрим сначала процесс введения молекулы водорода в пору. Для пор наименьшего размера ($d = 4$ и 5 Å) существует значительный энергетический барьер для попадания молекул H_2 (42,26 и 8,26 ккал/моль для пор $d = 4, 5$ Å соответственно), поэтому в дальнейшем они будут исключены из рассмотрения. Следовательно, начнем с анализа пор с $d = 6$ и 7 Å, поскольку поведение компонент энергии при введении H_2 в пору для них схоже (рис. 2).

Дисперсионный (E_{disp}), индукционный (E_{ind}) и электростатический (E_{el}) члены определяют притягивающий характер полной энергии взаимодействия,

в то время как обменный член Паули (E_{ex}) всегда ответствен за отталкивающий характер энергии взаимодействия (всегда положителен). При расстоянии молекулы водорода от центра поры $R = 6-8$ Å все исследуемые компоненты энергии примерно равны нулю, однако при дальнейшем приближении их характер становится различным. В целом, как и ожидалось, сильно положительный член E_{ex} обуславливает поведение энергии взаимодействия. В противовес ему выступают в порядке убывания E_{ind} , E_{el} и E_{disp} . Наблюдаются энергетические барьеры входа молекулы в пору при $R = 3,6$ Å для обеих пор. Кроме того, существуют ярко выраженные миниму-

мы при $R = 0$ и $1,8 \text{ \AA}$ от центра поры для поры $d = 6 \text{ \AA}$ и менее выраженные минимумы при тех же R для поры $d = 7 \text{ \AA}$. В целом последняя пора характеризуется смещением всех исследуемых кривых к оси абсцисс по сравнению с порой $d = 6 \text{ \AA}$.

Для поры $d = 8 \text{ \AA}$ уже не наблюдается барьера для входа в пору, наибольший вклад в энергию притяжения опять вносит дисперсионный член. Однако в сравнении с предыдущими случаями, его абсолютное значение уменьшается $\sim -4,0$; $-2,5$ и $-1,0$ ккал/моль для пор с $d = 6, 7$ и 8 \AA соответственно. Это обусловливается увеличением расстояния между стенками поры, поскольку E_{disp} зависит от числа близлежащих атомов, как это было показано в [38]. Максимальное значение энергии взаимодействия E_{int} составляет ~ -1 ккал/моль при $R = 0$.

Далее был исследован случай поры с $d = 9 \text{ \AA}$, для которой также наблюдается безбарьерный вход в пору, при этом при $R > 6 \text{ \AA}$ электростатические и дисперсионные взаимодействия дают примерно одинаковый вклад в стабилизирующее молекулы притяжение, в то время как при $R < 6 \text{ \AA}$ дисперсионная компонента опять становится преобладающей.

В целом происходит дальнейшее смещение кривых зависимостей E от R в сторону оси абсцисс. В данном случае максимальное значение энергии взаимодействия E_{int} составляет $\sim -0,5$ ккал/моль при $R = 0$.

Наконец, для наибольшей поры с $d = 10 \text{ \AA}$ по аналогии с предыдущим случаем наблюдается безбарьерный вход молекулы водорода в пору, при этом значимые величины принимает только энергетический член E_{disp} , в то время как остальные члены при малых значениях R примерно равны нулю. Наибольшее значение энергии взаимодействия E_{int} составляет $\sim -0,3$ ккал/моль при $R = 0$.

В дальнейшем исследовалась емкость пор по водороду. Для этого добавляли по одной молекуле внутрь поры и оптимизировали геометрию системы после каждого шага. Все поры наполняли до момента «выхода» молекул водорода за края поры. Иными словами, исследуемые молекулы H_2 не выходят за краевые атомы поры при рассмотрении поры сверху. На рис. 3 показаны оптимальные геометрии пор с максимальным наполнением и число молекул водорода, адсорбированных в каждой поре.

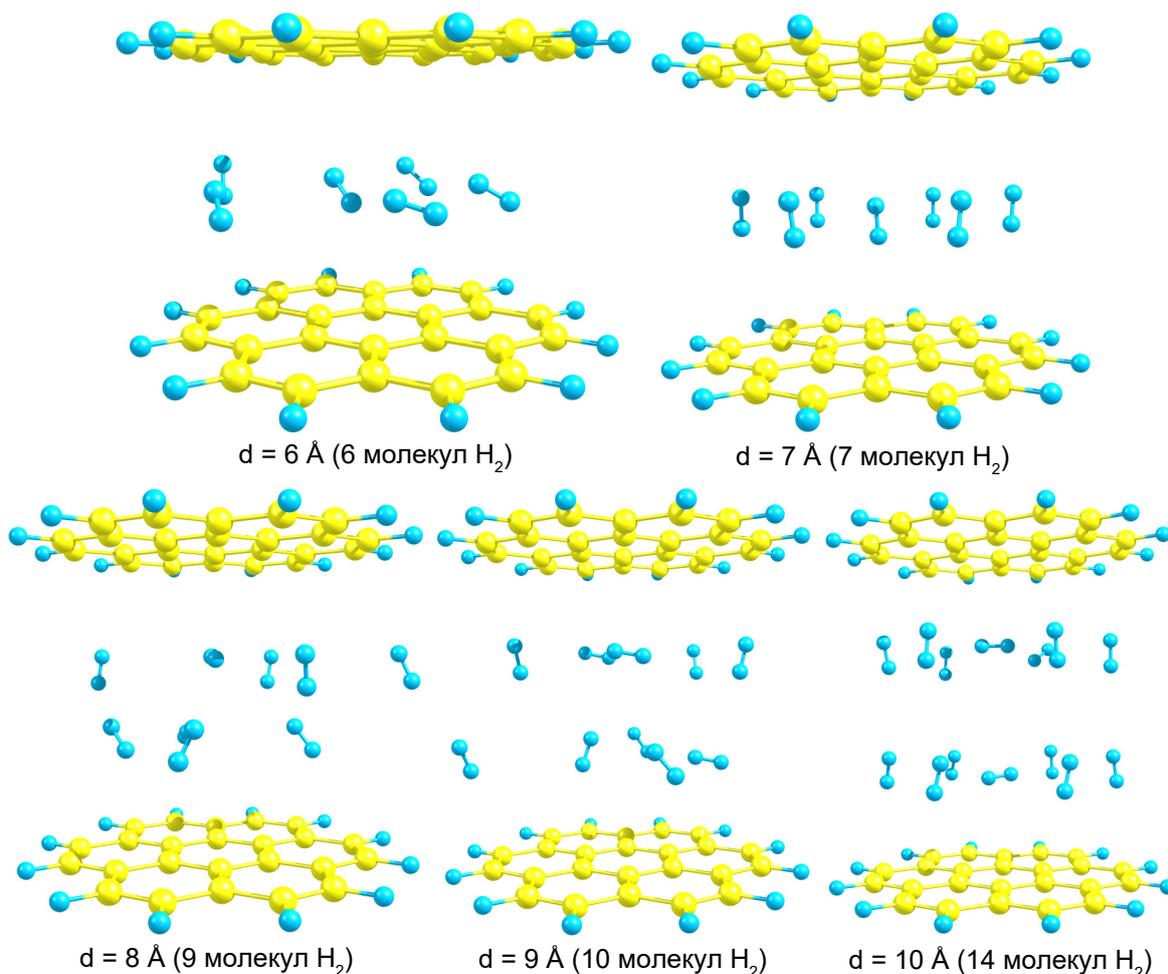


Рис. 3. Поры различных размеров, исследуемые в данной работе. Показаны оптимальные геометрии пор с максимальным количеством адсорбированных молекул водорода.

Цветовая схема: углерод – желтый, водород – голубой

Fig. 3. Pores of different sizes studied in the present work. The optimal geometries with maximal quantity of H_2 molecules adsorbed are shown. Color code: carbon – yellow, hydrogen – light-blue

Энергии, рассчитанные методом SAPT0/jun-cc-pVDZ (ккал/моль), для молекул H₂ в порах (d = 6–10)
 Energies calculated at the SAPT0/jun-cc-pVDZ (kcal/mol) level for H₂ molecules inside the pores (d = 6–10)

Номер молекулы H ₂	E _{el}	E _{ex}	E _{ind}	E _{disp}	E _{int}
d = 6 Å					
1 H ₂	-1,29 (21)	3,98	-0,44 (7)	-4,31 (72)	-2,07
6 H ₂	-1,66 (29)	5,08	-0,6 (10)	-3,57 (61)	-0,74
d = 7 Å					
1 H ₂	-0,40 (15)	1,17	-0,08 (3)	-2,23 (82)	-1,54
7 H ₂	-0,77 (24)	1,85	-0,24 (8)	-2,18 (68)	-1,33
d = 8 Å					
1 H ₂	-0,44 (19)	1,33	-0,09 (4)	-1,79 (77)	-0,98
9 H ₂	-0,79 (27)	2,08	-0,25 (8)	-1,94 (65)	-0,90
d = 9 Å					
1 H ₂	-0,42 (19)	1,13	-0,08 (4)	-1,66 (77)	-1,04
10 H ₂	-0,79 (27)	2,0	-0,22 (8)	-1,92 (65)	-0,89
d = 10 Å					
1 H ₂	-0,43 (20)	1,27	-0,09 (4)	-1,64 (76)	-0,89
14 H ₂	-0,69 (26)	2,03	-0,28 (10)	-1,74 (64)	-0,68

Примечание. Величины в скобках обозначают процентный вклад в энергию притяжения.

Для выявления особенностей адсорбции были рассчитаны энергии взаимодействия и их компоненты методом SAPT0/jun-cc-pVDZ для оптимальных геометрий систем, соответствующих первой и последней адсорбированной молекуле водорода в поре. Результаты расчетов приведены в таблице.

Перейдем к анализу энергий взаимодействия и их компонент для различных пор. Во-первых, отметим значительную величину энергии взаимодействия E_{int} = -2,07 ккал/моль для первой молекулы H₂, адсорбированной в поре с d = 6 Å (см. табл.). Для остальных пор эти значения существенно ниже. Такое значительное превышение обусловливается высоким численным значением члена E_{disp}, которое отражает тот факт, что обе стенки поры с небольшим межплоскостным расстоянием участвуют во взаимодействии с молекулой водорода. При увеличении загрузки поры молекулами наблюдается уменьшение относительного вклада дисперсионных взаимодействий и одновременное увеличение вкладов индукционных и электростатических взаимодействий в энергию притяжения молекул. При этом отметим тот факт, что E_{disp} все еще является доминирующим (72 и 61% для 1-й и 6-й молекул H₂ в поре соответственно). Электростатические взаимодействия дают следующий по важности вклад в полную энергию взаимодействия E_{int}.

Для следующей поры с d = 7 Å наблюдается снижение значения E_{int} для 1-й молекулы и одно-

временное повышение E_{int} для последней. Разность членов E_{int} для этих молекул составляет примерно 0,2 ккал/моль, причем эта разность сохраняется и для более широких пор, как это будет видно далее (см. табл.). В целом соотношение компонент, дающих вклад в притяжение, аналогично предыдущему случаю: E_{disp} > E_{el} > E_{ind}.

Все «шаблоны» распределения молекул внутри пор разной ширины отличны. Оптимизация геометрии пор, наполненных водородом, показала, что в поре d = 6 Å все молекулы занимают наклонные положения, в то время как для поры d = 7 Å оптимальным является вертикальное положение адсорбированных молекул. Для более широких пор становится ясным формирование 2-х рядов адсорбированных молекул. Для пор с d = 7 и 8 Å оптимальным является наклонное положение H₂, а для самой широкой исследуемой поры можно отметить 2 явных слоя с преобладающим вертикальным распределением адсорбированных молекул. Хорошо заметно, что для пор d = 6 и 7 Å энергия взаимодействия для 1-й адсорбированной молекулы H₂ значительно выше, чем для пор большего размера. Это обусловливается взаимодействием молекул водорода сразу с обеими стенками поры. Что касается последующих адсорбированных молекул, то вклад в энергию взаимодействия начинают вносить силы межмолекулярного отталкивания между молекулами во-

дорода. Поэтому E_{int} для последующих молекул в поре становятся значительно меньше. Сравним теперь значения E_{int} , найденные в настоящей работе, с полученными ранее. Так, для адсорбции водорода на «чистом» графене и на графене, допированном атомами бора и азота, значение E_{int} составляет примерно ~ 1 ккал/моль [39], а емкость листа графена по водороду – примерно 3,3% [15]. Таким образом, удвоение энергии взаимодействия свидетельствует о предпочтительном использовании пористых структур для хранения водорода. В то же самое время для пор с $d = 8\text{--}10$ Å наблюдается такая тенденция: значение E_{int} стремится к ~ 1 ккал/моль как для первой, так и для последней молекул водорода, помещенных в пору. Это говорит о формировании в поре мономолекулярных слоев по аналогии с листом графена. Дисперсионные взаимодействия и в этом случае играют значительную роль (вклад в притяжение составляет 76–77% для 1-й адсорбированной молекулы H_2 и 64–65% для последней) (см. табл.). Электростатические взаимодействия дают вклад в 19–27%, в то время как индукционные – 4–10%.

Полезной методикой определения существования нековалентных взаимодействий является модель независимого градиента IGM. На рис. 4 приведены изоповерхности IGM для всех исследуемых пор. В соответствии с этим методом си-

ний, зеленый и красный цвета отражают сильное и слабое притяжение, а также отталкивающие взаимодействия соответственно.

На основании данных рис. 4 можно сделать вывод, что для более узких пор обе стенки поры делают вклад в стабилизирующие молекулы водорода взаимодействия (две зеленых изоповерхности по обе стороны адсорбированных молекул). Напротив, для широких пор происходит обратная ситуация: для каждого адсорбционного слоя вклад в энергию взаимодействия дает только одна стенка. Данное наблюдение находится в согласии с расчетными данными, приведенными в таблице, где показано постепенное уменьшение значений E_{int} в ряду пор при следовании от узких ($d = 6$ Å) к широким ($d = 10$ Å).

Теперь оценим адсорбционную емкость (GD, вес.%) исследуемых пор по водороду. Для этого воспользуемся формулой:

$$GD = \frac{M_{nH_2}}{M_{nH_2} + M_{pore}} \times 100\%,$$

где – это M_{nH_2} – масса n адсорбированных молекул H_2 , а M_{pore} – масса исследуемой поры. Вычисленные значения GD для пор с $d = 6, 7, 8, 9, 10$ Å равны соответственно 1,98; 2,30; 2,93; 3,25; 4,49 вес.%. Теперь сравним полученные величины GD с литературными данными. Здесь приведем значения для тех сред, которые предполагают хранение водорода на основе физической адсорбции. Как было указано выше, это значение для чистого графена составляет 3,3 вес.%, что превышает вычисленные значения для узких пор, но наибольшая пора с $d = 10$ Å имеет большее значение GD. Для планарных N-замещенных графенов были получены следующие величины: значения E_{int} составляли от -1,25 до -1,38 ккал/моль, в то время как величина GD была оценена в 3,43% [11].

В экспериментальных работах [40, 41] приведены соответственно следующие величины для хранения водорода на допированных кислородом планарных листах BN ($E_{int} = -1,5$ ккал/моль, GD = 5,7%) и нанопористых нитридах BC (GD = 1,07%). В работе Д. Бонифаци и соавторов экспериментально определено значение GD = 1,75% для гетероструктур BNC [42]. Хотя некоторые работы демонстрируют поразительные результаты, полученные при низких температурах (например, MOF-210 показывает высокое значение GD для хранения водорода в 17,6 вес.% при $T = 77$ K и $P = 80$ бар) [43], хранение при н.у. до сих пор показывает умеренные значения GD. Так, Ru-декорированный допированный бором углерод демонстрирует GD для водорода, равное 1,26% [44]. Недавно определенная емкость по водороду кораннулена составляет всего 0,1% [45].

В то же время теоретические работы устанавливают значительно более высокие значения GD для наноструктур, особенно «декорированных» атомами и катионами (присоединение катионов происходит по так называемому механизму катион-π взаимодействий [46]). Так, например, декорированный Li^+ кластер тетрабензопентацена де-

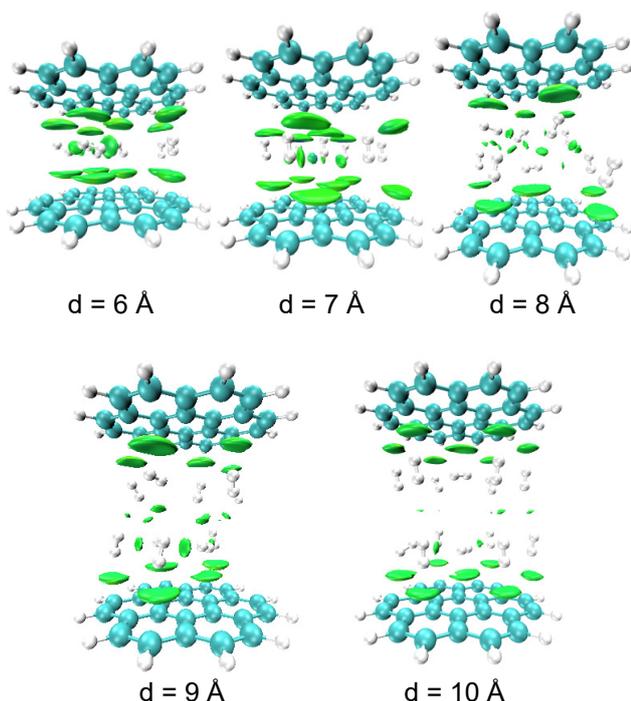


Рис. 4. Изоповерхности нековалентных взаимодействий, полученных в рамках модели IGM. Зеленые изоповерхности обозначают области ван-дер-ваальсовских взаимодействий.

Цветовая схема для обозначения атомов: голубой – углерод, белый – водород

Fig. 4. Isosurfaces of noncovalent interactions obtained by the IGM method. Green isosurfaces denote van der Waals interactions. Color code: carbon – light-green, hydrogen – white

монстрирует емкость по водороду в 4,8% [29]. При этом декорированный Li кластер $(\text{BN})_x\text{C}_{1-x}$ ($x = 1; 0,25; 0,5; 0,75; 0$) демонстрирует емкость по водороду в 8,7% [47]. Декорированные Li^+ неорганические бензолы как предшественники систем для хранения водорода показывают еще большую емкость GD, равную приблизительно 10% [19]. Однако существуют трудности с практической реализацией подобных систем, поэтому пористые углеродные наноструктуры являются удобными кандидатами в качестве систем хранения. Следует отметить, что необходимо тщательно отбирать структуры по размерам пор, потому что, как показано выше, расстояние между стенками пор является ключевым параметром, определяющим характер физической адсорбции, а следовательно, и возможность хранения водорода.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе с помощью современных методов квантовой химии (DFT, SAPTO, IGM) была изучена адсорбция молекулярного водорода в ряде модельных щелевидных углеродных пор. Вычисленные значения энергетических барьеров введения молекулы H_2 в поры с минимальными расстояниями между стенками ($d = 4, 5 \text{ \AA}$) не позволяют использовать их в качестве эффективных сорбентов водорода. Для пор большего раз-

мера установлено, что в зависимости от расстояния между стенками адсорбированные молекулы водорода образуют один ($d = 6, 7 \text{ \AA}$) или два слоя ($d = 8, 9, 10 \text{ \AA}$) внутри поры.

Методом SAPTO получены значения энергии взаимодействия (E_{int}) между молекулами, адсорбированными в поре, и ее стенками. Установлено, что значение E_{int} максимально для самой малой поры ($-2,07 \text{ ккал/моль}$, $d = 6 \text{ \AA}$) и минимально для самой большой ($-0,89 \text{ ккал/моль}$, $d = 10 \text{ \AA}$). С помощью метода IGM удалось определить факт одновременного влияния обеих стенок поры на каждую адсорбированную молекулу H_2 в случае поры с $d = 6 \text{ \AA}$ и влияния только одной стенки в случае поры с $d = 10 \text{ \AA}$.

Разложение энергии взаимодействия на компоненты с помощью метода SAPTO показало, что дисперсионные взаимодействия дают основной вклад в энергию притяжения, причем с увеличением числа молекул H_2 , адсорбированных в поре, их значимость падает, а вклад в притяжение электростатических и индукционных взаимодействий растёт.

Также были вычислены значения гравиметрической плотности GD для пор с $d = 6, 7, 8, 9, 10 \text{ \AA}$, они равны соответственно 1,98; 2,30; 2,93; 3,25; 4,49 вес.%. Полученные результаты важны для разработки пористых материалов для хранения водорода.

REFERENCES

1. Staffell I., Scamman D., Velazquez Abad A., Balcombe P., Dodds P. E., Ekins P., et al. The role of hydrogen and fuel cells in the global energy system. *Energy & Environmental Science*. 2019;(12):463-491. <https://doi.org/10.1039/c8ee01157e>.
2. Glenk G., Reichelstein S. Reversible Power-to-Gas systems for energy conversion and storage. *Nature Communications*. 2022;(13):2010. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29520-0>.
3. Karki S., Chakraborty S. N. A Monte Carlo simulation study of hydrogen adsorption in slit-shaped pores. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2021;317:110970. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2021.110970>.
4. Modi P., Aguey-Zinsou K.-F. Room temperature metal hydrides for stationary and heat storage applications: a review. *Frontiers in Energy Research*. 2021;(9). <https://doi.org/10.3389/fenrg.2021.616115>.
5. Petrushenko I. K., Petrushenko K. B. DFT study of single-walled carbon hollows as media for hydrogen storage. *Computational and Theoretical Chemistry*. 2018;1140:80-85. <https://doi.org/10.1016/j.comptc.2018.08.001>.
6. Murray L. J., Dinca M., Long J. R. Hydrogen storage in metal-organic frameworks. *Chemical Society Reviews*. 2009;38:1294-1314. <https://doi.org/10.1039/b802256a>.
7. Petrushenko I. K., Petrushenko K. B. Adsorption of diatomic molecules on nitrogenated holey graphene: theoretical insights. *Surfaces and Interfaces*. 2021;27:101446. <https://doi.org/10.1016/j.surfin.2021.101446>.
8. Singla M., Jaggi N. Theoretical investigations of hydrogen gas sensing and storage capacity of graphene-based materials: a review. *Sensors and Actuators A: Physical*. 2021;332:113118. <https://doi.org/10.1016/j.sna.2021.113118>.
9. Petrushenko I. K. DFT calculations of hydrogen adsorption inside single-walled carbon nanotubes. *Advances in Materials Science and Engineering*. 2018;1-6. <https://doi.org/10.1155/2018/9876015>.
10. Petrushenko I. K., Petrushenko K. B. Physical adsorption of hydrogen molecules on single-walled carbon nanotubes and carbon-boron-nitrogen heteronanotubes: a comparative DFT study. *Vacuum*. 2019;167:280-286. <https://doi.org/10.1016/j.vacuum.2019.06.021>.
11. Petrushenko I. K., Petrushenko K. B. Hydrogen physisorption on nitrogen-doped graphene and graphene-like boron nitride-carbon heterostructures: a DFT study. *Surfaces and Interfaces*. 2019;17:100355. <https://doi.org/10.1016/j.surfin.2019.100355>.
12. Tachikawa H., Iyama T. Mechanism of hydrogen storage in the graphene nanoflake-lithium-H₂ system. *Journal of Physical Chemistry C*. 2019;123(14):8709-8716. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b01152>.
13. Tachikawa H. Hydrogen atom addition to the surface of graphene nanoflakes: a density functional theory study. *Applied Surface Science*. 2017;396:1335-1342. <https://doi.org/10.1016/j.apusc.2016.11.158>.

14. Geim A. K., Novoselov K. S. The rise of graphene. *Nature Materials*. 2007;(6):183-191. <https://doi.org/10.1038/nmat1849>.
15. Züttel A., Sudan P., Mauron P., Kiyobayashi T., Emmenegger C., Schlapbach L. Hydrogen storage in carbon nanostructures. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2002;27:203-212. [https://doi.org/10.1016/s0360-3199\(01\)00108-2](https://doi.org/10.1016/s0360-3199(01)00108-2).
16. Wang F., Zhang T., Hou X., Zhang W., Tang S., Sun H., et al. Li-decorated porous graphene as a high-performance hydrogen storage material: a first-principles study. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2017;42:10099-10108. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.01.121>.
17. Wang L., Chen X., Du H., Yuan Y., Qu H., Zou M. First-principles investigation on hydrogen storage performance of Li, Na and K decorated borophene. *Applied Surface Science*. 2018;427:1030-1037. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.08.126>.
18. Akilan R., Ravichandran D., Vinnarasi S., Shankar R. Adsorption of H₂ and CO₂ gas molecules on Li/Na decorated Si₂BN nano-sheet for energy harvesting applications – a density functional study. *Materials Letters*. 2020;279:128487. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2020.128487>.
19. Petrushenko I. K., Bettinger H. F. Hydrogen adsorption on inorganic benzenes decorated with alkali metal cations: theoretical study. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2021;23:5315-5324. <https://doi.org/10.1039/d1cp00025j>.
20. Tavhare P., Chaudhari A. Ti decorated heterocyclic rings for hydrogen storage. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2022;47:3948-3960. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.11.031>.
21. Kumar R., Suresh V. M., Maji T. K., Rao C. N. Porous graphene frameworks pillared by organic linkers with tunable surface area and gas storage properties. *Chemical Communications*. 2014;50:2015-2017. <https://doi.org/10.1039/c3cc46907g>.
22. Xia K., Xiong R., Chen Y., Liu D., Tian Q., Gao Q., et al. Tuning the pore structure and surface chemistry of porous graphene for CO₂ capture and H₂ storage. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2021;622:126640. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.126640>.
23. Wang Q., Johnson J. K. Hydrogen adsorption on graphite and in carbon slit pores from path integral simulations. *Molecular Physics*. 2009;95:299-309. <https://doi.org/10.1080/00268979809483162>.
24. Rzepka M., Lamp P., de la Casa-Lillo M. A. Physisorption of hydrogen on microporous carbon and carbon nanotubes. *Journal of Physical Chemistry B*. 1998;102:10894-10898. <https://doi.org/10.1021/jp9829602>.
25. Kowalczyk P., Tanaka H., Holyst R., Kaneko K., Ohmori T., Miyamoto J. Storage of hydrogen at 303 K in graphite slitlike pores from grand canonical Monte Carlo simulation. *Journal of physical chemistry B*. 2005;109:17174-17183. <https://doi.org/10.1021/jp0529063>.
26. Kowalczyk P., Gauden P. A., Terzyk A. P., Bhatia S. K. Thermodynamics of hydrogen adsorption in slit-like carbon nanopores at 77 K. Classical versus path-integral Monte Carlo simulations. *Langmuir*. 2007;23(7):3666-3672. <https://doi.org/10.1021/la062572o>.
27. Lefebvre C., Rubez G., Khartabil H., Boisson J.-C., Contreras-García J., Hénon E. Accurately extracting the signature of intermolecular interactions present in the NCI plot of the reduced density gradient versus electron density. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2017;19(27):17928-17936. <https://doi.org/10.1039/c7cp02110k>.
28. Lefebvre C., Khartabil H., Boisson J.-C., Contreras-García J., Piquemal J.-P., Hénon E. The Independent gradient model: a new approach for probing strong and weak interactions in molecules from wave function calculations. *ChemPhysChem*. 2018;19(6):724-735. <https://doi.org/10.1002/cphc.201701325>.
29. Petrushenko I. K., Tsar'kova A. I., Petrushenko K. B. Hydrogen adsorption on BN-embedded tetrabenzopentacene as a promising nanoflake for energy storage: theoretical insights. *Diamond and Related Materials*. 2020;108:107968. <https://doi.org/10.1016/j.diamond.2020.107968>.
30. Tolmachev A. M., Firsov D. A., Kuznetsova T. A., Anuchin K. M. DFT modeling of the adsorption of benzene, methanol, and ethanol molecules in activated carbon nanopores. *Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces*. 2009;45:163-168. <https://doi.org/10.1134/s2070205109020063>.
31. Lee C., Yang W., Parr R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Physical Review B*. 1988;37:785-789. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.37.785>.
32. Becke A. D. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Physical Review A*. 1988;38:3098-3100. <https://doi.org/10.1103/PhysRevA.38.3098>.
33. Grimme S. Accurate description of van der Waals complexes by density functional theory including empirical corrections. *Journal of Computational Chemistry*. 2004;25:1463-1473. <https://doi.org/10.1002/jcc.20078>.
34. Neese F., Wennmoths F., Becker U., Riplinger C. The ORCA quantum chemistry program package. *Journal of Chemical Physics*. 2020;152:224108. <https://doi.org/10.1063/5.0004608>.
35. Jeziorski B., Moszynski R., Szalewicz K. Perturbation theory approach to intermolecular potential energy surfaces of van der Waals complexes. *Chemical Reviews*. 1994;94:1887-1930. <https://doi.org/10.1021/cr00031a008>.
36. Turney J. M., Simmonett A. C., Parrish R. M., Hohenstein E. G., Evangelista F. A., Fermann J. T., et al. Psi4: an open-source ab initio electronic structure program. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*. 2012;(2):556-565. <https://doi.org/10.1002/wcms.93>.
37. Patkowski K. Recent developments in symmetry-adapted perturbation theory. *WIREs Computational Molecular Science*. 2019;10(3):e1452. <https://doi.org/10.1002/wcms.1452>.
38. Okamoto Y., Miyamoto Y. Ab Initio investiga-

tion of physisorption of molecular hydrogen on planar and curved graphenes. *Journal of Physical Chemistry B*. 2001;105(17):3470-3474. <https://doi.org/10.1021/jp003435h>.

39. Petrushenko I. K., Petrushenko K. B. Adsorption of diatomic molecules on graphene, h-BN and their BNC heterostructures: DFT study. *Diamond and Related Materials*. 2019;100:107575. <https://doi.org/10.1016/j.diamond.2019.107575>.

40. Lei W., Zhang H., Wu Y., Zhang B., Liu D., Qin S., et al. Oxygen-doped boron nitride nanosheets with excellent performance in hydrogen storage. *Nano Energy*. 2014;(6):219-224. <https://doi.org/10.1016/j.nanoen.2014.04.004>.

41. Portehault D., Giordano C., Gervais C., Senkovska I., Kaskel S., Sanchez C., et al. High-surface-area nanoporous boron carbon nitrides for hydrogen storage. *Advanced Functional Materials*. 2010;20:1827-1833. <https://doi.org/10.1002/adfm.201000281>.

42. Bonifazi D., Fasano F., Lorenzo-Garcia M. M., Marinelli D., Oubaha H., Tasseroul J. Boron-nitrogen doped carbon scaffolding: organic chemistry, self-assembly and materials applications of borazine and its de-

rivatives. *Chemical Communications*. 2015;51:15222-15236. <https://doi.org/10.1039/c5cc06611e>.

43. Hirscher M. Hydrogen storage by cryoadsorption in ultrahigh-porosity metal-organic frameworks. *Angewandte Chemie*. 2011;50:581-582. <https://doi.org/10.1002/anie.201006913>.

44. Wang L., Yang R. T. Hydrogen storage properties of N-doped microporous carbon. *Journal of Physical Chemistry C*. 2009;113:21883-21888. <https://doi.org/10.1021/jp908156v>.

45. Gaboardi M., Pratt F., Milanese C., Taylor J., Siegel J., Fernandez-Alonso F. The interaction of hydrogen with corannulene, a promising new platform for energy storage. *Carbon*. 2019;155:432-437. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2019.08.087>.

46. Ma J. C., Dougherty D. A. The cation-pi interaction. *Chemical Reviews*. 1997;97:1303-1324. <https://doi.org/10.1021/cr9603744>.

47. Hu Z. Y., Shao X., Wang D., Liu L. M., Johnson J. K. A first-principles study of lithium-decorated hybrid boron nitride and graphene domains for hydrogen storage. *Journal of Chemical Physics*. 2014;141:084711. <https://doi.org/10.1063/1.4893177>.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРЕ

И. К. Петрушенко,
к.х.н., заведующий лабораторией КПОЭМК,
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
igor.petrushenko@istu.edu
<https://orcid.org/0000-0002-0860-8913>

Вклад автора

Автор выполнил исследовательскую работу, на основании полученных результатов провел обобщение, подготовил рукопись к печати.

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Автор прочел и одобрил окончательный вариант рукописи.

Информация о статье

Поступила в редакцию 01.03.2022.
Одобрена после рецензирования 28.04.2022.
Принята к публикации 15.09.2022.

INFORMATION ABOUT THE AUTHOR

Igor K. Petrushenko,
Cand. Sci. (Chemistry), Head of the laboratory
KPOEMK,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., 664074, Irkutsk,
Russian Federation,
igor.petrushenko@istu.edu
<https://orcid.org/0000-0002-0860-8913>

Contribution of the author

The author performed the research, made a generalization on the basis of the results obtained and prepared the copyright for publication.

Conflict interests

The author declares no conflict of interests regarding the publication of this article.

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

Information about the article

The article was submitted 01.03.2022.
Approved after reviewing 28.04.2022.
Accepted for publication 15.09.2022.

Научная статья
УДК 547.973.4
DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-373-382>



Применение комплекса антоцианов в роли индикаторов для алкалометрического титрования

Светлана Михайловна Дрюцкая, Иван Владимирович Толстенок, Наталья Юрьевна Якушева

Дальневосточный государственный медицинский университет,
г. Хабаровск, Российская Федерация

Автор, ответственный за переписку: Дрюцкая Светлана Михайловна, sveta07027@mail.ru

Аннотация. Помимо существующих синтетических индикаторов, в природе встречается множество иных пигментных веществ, способных реагировать на изменение водородного показателя раствора ярким переходом окраски. Например, такой переход окраски можно наблюдать при использовании антоцианов. Цель исследования – определить возможность применения суммы антоцианов из экстрактов ягод в качестве потенциального кислотно-основного индикатора. Его применение возможно, как и широко используемого для этих целей индикатора фенолфталеина. Исследовали водные и спиртовые экстракты из ягод рябины, облепихи, брусники, черники, смородины, ежевики, клюквы, шиповника, черемухи и боярышника. Наличие антоцианов в исследуемых образцах доказывали с помощью химического и физико-химического методов анализа: качественной реакции, восходящей тонкослойной хроматографии и прямой спектрофотометрии. Количественную оценку содержания антоцианов в ягодах проводили методом pH-дифференциальной спектрофотометрии. В ходе работы установлено, что содержание антоцианов в водных экстрактах намного меньше, чем в спиртовых. Для сравнения индикаторных возможностей фенолфталеина и суммы антоцианов была проведена количественная оценка содержания аскорбиновой кислоты в образцах фруктов методом прямой алкалометрии. Контрольный опыт проводили с 5%-м раствором аскорбиновой кислоты для инъекций. Значение pH водных и спиртовых растворов всех полученных вытяжек из ягод определяли инструментальным методом. Водородный показатель экстрактов находился в интервале от 2,95 до 5,04. Качественно и количественно определено содержание суммы антоцианов в водных и спиртовых экстрактах ягод ежевики, клюквы, черной смородины, черники и брусники в пересчете на цианидин-3-глюкозид. Показана сходимость результатов алкалометрического титрования с использованием в качестве индикатора фенолфталеина и суммы антоцианов, извлеченных из ягод черной смородины 95%-м этиловым спиртом.

Ключевые слова: кислотно-основное титрование, антоцианы, фенолфталеин, индикатор, экстракты

Для цитирования: Дрюцкая С. М., Толстенок И. В., Якушева Н. Ю. Применение комплекса антоцианов в роли индикаторов для алкалометрического титрования // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2022. Т. 12. N 3. С. 373–382. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-373-382>.

CHEMICAL SCIENCES

Original article

Application of anthocyanins as indicators for alkalimetric titration

Svetlana M. Dryutskaya, Ivan V. Tolstenok, Natalya Yu. Yakusheva

Far Eastern State Medical University, Khabarovsk, Russian Federation
Corresponding author: Svetlana M. Dryutskaya, sveta07027@mail.ru

Abstract. Along with synthetic substances, various naturally-occurring pigments can response to pH variations in solutions by changing their colour. Such substances include, for example, anthocyanins. In this study, the possibility of applying a set of anthocyanins obtained from berry extracts as a potential acid-base indicator. This indicator can be a good alternative to the widely-used phenolphthalein test. Aqueous and alcoholic

© Дрюцкая С. М., Толстенок И. В., Якушева Н. Ю., 2022

extracts derived from the fruit of ashberry, sea-buckthorn, lingonberry, blueberry, currant, blackberry, cranberry, rose hip, cherry and hawthorn plants were studied. The presence of anthocyanins in the test samples was confirmed by chemical and physicochemical methods of analysis, including qualitative tests, ascending thin-layer chromatography and direct spectrophotometry. Quantification of anthocyanins was carried out by pH-differential spectrophotometry. Compared to alcoholic extracts, aqueous berry extracts were found to contain anthocyanins in far lesser amounts. In order to compare the pH indicator potential of phenolphthalein and the studied set of anthocyanins, the content of ascorbic acid in the test samples was assessed by direct alkalimetry. A control experiment was performed using a 5% ascorbic acid solution for injection. The pH value of aqueous and alcoholic solutions of all berry extracts was determined by an instrumental procedure. The pH of the extracts ranged from 2.95 to 5.04. The content of the total amount of anthocyanins in aqueous and alcoholic extracts of blackberries, cranberries, black currants, blueberries and lingonberries in terms of cyanidin-3-glucoside was determined both quantitatively and qualitatively. A good agreement was achieved between the results of alkalimetric titration performed using phenolphthalein and the set of anthocyanins extracted from blackcurrant berries with 95% ethanol.

Keywords: acid-base titration, anthocyanins, phenolphthalein, indicator, extracts

For citation: Dryutskaya S. M., Tolstenok I. V., Yakusheva N. Yu. Application of anthocyanins as indicators for alkalimetric titration. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2022;12(3):373-382. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-373-382>.

ВВЕДЕНИЕ

Для определения характера среды любых растворов и в рамках титриметрического анализа в химии используются классические индикаторы: фенолфталеин, лакмус и метилоранж. Но, помимо представленных реагентов, существует множество иных пигментных веществ растительного происхождения, способных выявлять изменение водородного показателя раствора и сигнализировать об этом ярким переходом окраски. К примеру, ярко и показательно с этой задачей справляются антоцианы.

Антоцианы – растительные гликозиды, содержащие в качестве агликона антоцианидины – замещенные 2-фенилхромены, относящиеся к классу флавоноидов. Эти биологически активные вещества (БАВ) могут потенциально являться альтернативой синтетическим индикаторам [1]. Кроме того, в ходе научного поиска обращает на себя внимание информация о том, что БАВ из сырья березы пушистой рассматриваются в качестве металлохромного индикатора для комплексонометрического титрования [2]. Использование различных биообъектов в качестве индикаторов – одно из экологически безопасных и актуальных направлений на сегодняшний момент. Для алкалометрического титрования применение каких-либо растительных индикаторов в ходе научного поиска не было выявлено, что обосновывает актуальность исследования.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследована возможность применения в качестве индикаторов для кислотно-основного титрования водных и спиртовых экстрактов из ягод рябины, облепихи, брусники, черники, смороди-

ны, ежевики, клюквы, шиповника, черемухи и боярышника [3]. Сырье собирали и хранили по требованиям Государственной фармакопеи¹ и ГОСТам^{2,3}. Работа была выполнена на кафедре химии и в Центральной научно-исследовательской лаборатории Дальневосточного государственного медицинского университета.

Проводили водную и спиртовую экстракцию. Спиртовое извлечение, содержащее комплекс антоцианов, получали по методике, представленной в работе С. А. Полиной и А. А. Ефремова [4]. Экстракция этих БАВ также возможна дистиллированной водой без нагревания [5–7]. Для исследования проводили экстракцию по следующей методике: навеску измельченного сырья помещали в колбу и заливали 200 мл воды. Экстракция длилась 12 ч. Извлечения отделяли от остатка сырья фильтрованием через бумажный фильтр на воронке Бюхнера.

Показатель кислотности (рН) измеряли с помощью иономера рХ-150МИ (НПО «Измерительная техника», Россия).

Определение точек перехода окраски в анализируемых экстрактах при добавлении растворов кислоты и щелочи проводили визуально.

Наличие антоцианов в исследуемых образцах доказывали с помощью качественной реакции со щелочным раствором хлористого алюминия в спиртовой среде и восходящей тонкослойной хроматографии (пластинки Silufol, Чехия). Для разделения применяли смесь бутанол–ледяная уксусная кислота–вода (4:1:2). Идентификацию пятен осуществляли после расчета коэффициентов удерживания и сравнения их со свидетелем – 1%-м спиртовым раствором цианидин-3-гликозидом [8–10]. Также снимали спектры полученных спиртовых экстрактов с помощью прямой спектро-

¹Государственная фармакопея Российской Федерации. Издание XIII. М.: Минздрав РФ, 2015. Т. 1. С. 218–220.

²ГОСТ 29187-91. Плоды и ягоды быстрозамороженные. М.: Из-во стандартов, 2004. 21 с.

³ГОСТ 6077-80. Сырье лекарственное растительное. Упаковка, маркировка, транспортирование и хранение. М.: Изд-во стандартов, 2021. 4 с.

фотометрии на приборе UV-2450 PC (Shimadzu, Япония) при pH=4 в интервале длин волн 400–600 нм⁴ [11].

Количественное содержание антоцианов в ягодах определяли методом pH-дифференциальной спектрофотометрии. Измерение оптической плотности проводили на спектрофотометре при длинах волн λ=510 и 700 нм. Результатом измерений являлась разность оптической плотности растворов с pH=1 и 4,5 при длинах волн 510 и 700 нм соответственно, которая пропорциональна массовой концентрации (массовой доле) антоцианов в растворе⁵.

Разность оптической плотности (A) вычисляли как разность оптических плотностей растворов при разных длинах волн и соответствующих значениях pH по формуле:

$$A = (A_{510} - A_{700})_{pH_1} - (A_{510} - A_{700})_{pH_{4,5}}, \quad (1)$$

где A_{510} – оптическая плотность раствора пробы при длине волны 510 нм, е.о.п.; A_{700} – оптическая плотность раствора пробы при длине волны 700 нм, е.о.п.

Массовую концентрацию антоцианов в мг/дм³ в пересчете на цианидин-3-глюкозид вычисляли по формуле:

$$C = \frac{\Delta A \cdot M \cdot V_1 \cdot 10^3}{V_2 \cdot \varepsilon \cdot l}, \quad (2)$$

где ΔA – разность оптической плотности раствора, е.о.п.; M – молекулярная масса цианидин-3-глюкозида, равная 449,2 г/моль; V_1 – вместимость мерной колбы, взятой для разбавления, см³; V_2 – объем аликвоты, взятой на определение, см³; ε – молярный коэффициент экстинкции цианидин-3-глюкозида, 26900 дм³·моль⁻¹·см⁻¹; l – длина оптического пути кюветы, см.

Контрольный индикатор в работе – фенолфталеин, имеющий переход окраски при pH=8,2–10,8 [12]. Водородный показатель его 0,1%-го спиртового раствора, измеренный иономером, имеет значение pH, равное 4,01. Значение водородного показателя фенолфталеина рассчитывали теоретически:

$$C_M = \frac{10 \cdot \rho \cdot \omega}{M} = \frac{10 \cdot 0,719 \cdot 0,1}{318,31} = 0,00226 \frac{\text{моль}}{\text{л}}$$

$$[H^+] = \sqrt{C_M \cdot K_a} = \sqrt{0,00226 \cdot 4 \cdot 10^{-6}} = 0,095 \cdot 10^{-3} \frac{\text{моль}}{\text{л}}$$

$$pH = -\lg[H^+] = -\lg(0,095 \cdot 10^{-3}) = 4,00.$$

Таким образом, теоретическое и практическое значения pH 0,1%-го спиртового раствора фенолфталеина не отличались друг от друга.

Количественное содержание аскорбиновой кислоты во фруктах определяли методом прямой алкалометрии. Этот анализ используется как экспресс-метод определения аскорбиновой кислоты. Он проводится максимально быстро и не требует большого числа манипуляций. Титрование в обоих

случаях осуществляли до 3-х результатов, отличающихся не более чем на 0,1 мл. Для этого навеску фруктов массой 10,00 г измельчали, помещали в колбу и приливали воды до 50 мл, а также несколько капель 1%-го раствора соляной кислоты для предотвращения быстрого разрушения аскорбиновой кислоты. Полученные образцы нагревали в течение 1 ч на водяной бане при температуре 60 °С. Готовые экстракты фильтровали, брали аликвоту для титрования. Точку конца титрования фиксировали в 2-х параллельных анализах с помощью индикатора фенолфталеина и спиртового раствора из ягод черной смородины соответственно. В качестве контрольного опыта проводили титрование 5%-го раствора аскорбиновой кислоты для инъекций. Концентрацию аскорбиновой кислоты в 2-х параллельных опытах определяли по формуле:

$$C_{M(\text{аск.к-ты})} = \frac{V_{(NaOH)} \cdot C_{M(NaOH)}}{V_{(\text{аск.к-ты})}}, \quad (3)$$

где $V_{(NaOH)}$ – объем титранта, использованного для титрования аскорбиновой кислоты, см³; $C_{M(NaOH)}$ – молярная концентрация титранта, 0,01 моль/дм³; $V_{(\text{аск.к-ты})}$ – аликвота раствора аскорбиновой кислоты, 10 см³.

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью метода Стьюдента после проверки на нормальность распределения.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные экстракты имели разную интенсивность окрашивания. Все спиртовые экстракты обладали более насыщенным цветом, чем водные. Значение pH водных и спиртовых растворов всех вытяжек из ягод находилось в пределах от 2,95 до 5,04 (кислая среда). Стоит отметить, что водные экстракты имели более кислую величину pH, чем спиртовые (табл. 1).

Наиболее яркие переходы окраски в кислой (малиновая) и щелочной (пурпурно-синяя) средах

Таблица 1. Значение водородного показателя (pH) извлечений из ягод

Table 1. pH value of berries extracts

Вид ягодного сырья	Величина pH	
	Водный экстракт	Спиртовой экстракт
Ежевика	3,58±0,01	4,68±0,03
Рябина	4,28±0,01	4,71±0,01
Облепиха	4,83±0,01	4,56±0,01
Черника	3,90±0,02	4,30±0,03
Брусника	2,95±0,01	3,88±0,02
Черная смородина	3,92±0,01	4,48±0,01
Клюква	3,43±0,01	4,07±0,02
Шиповник	4,26±0,01	4,81±0,03
Боярышник	4,56±0,01	5,04±0,02
Черемуха	4,71±0,01	4,80±0,01

⁴Петрова И. Б. Исследование содержания специфического профиля антоцианов лекарственного растительного сырья: автореф. канд. фарм. наук. М., 2015. 24 с.

⁵ГОСТ 32709-2014. Методы определения антоцианов. М.: Стандартинформ, 2014. С. 29–36.

наблюдали в водных и спиртовых извлечениях ягод черники, черной смородины и ежевики. В экстрактах ягод облепихи, шиповника, боярышника и рябины, содержащих в основном каротиноиды, не наблюдали перехода окраски при добавлении кислоты и щелочи. Исходя из этого, можно предположить, что извлечения ягод черники, черной смородины и ежевики могут считаться наиболее приемлемыми индикаторами изменения характера среды в растворе. В ягодах черники, черной смородины, ежевики, черемухи, брусники и клюквы содержатся антоцианы [4, 13–15].

Для доказательства присутствия антоцианов в экстрактах проводили качественную реакцию со щелочным раствором хлорида алюминия в спиртовой среде. При наличии антоцианов и их производных спиртовой раствор должен окраситься в фиолетовый цвет. Спиртовые и водные экстракты ягод ежевики, брусники, черники, черной смородины и клюквы дали положительную реакцию на эту пробу. Водные и спиртовые извлечения из ягод шиповника, облепихи, черемухи, рябины и боярышника такого окрашивания не дали, что говорит об отсутствии антоцианов в данных образцах. Эти экстракты были исключены из дальнейшего исследования.

В извлечениях из ягод ежевики, брусники, черники, черной смородины и клюквы определяли цианидин-3-глюкозид с помощью метода восходящей тонкослойной хроматографии. После высушивания пластинки фиксировали пятна фиолетового цвета (свидетель – цианидин-3-глюкозид). Коэффициент удерживания рассчитывали по формуле (4). Полученные данные представлены в табл. 2.

$$Rf = \frac{l_{Ax}}{l_{пф}} \quad (4)$$

Таблица 2. Экспериментальные значения коэффициента удерживания (R_f) цианидин-3-глюкозида

Table 2. Experimental values of the retention factor (R_f) of cyanidin-3-glucoside

Вид ягодного сырья	Цвет пятна	Величина R_f	R_f стандарта
Ежевика	фиолетовый	0,37	0,36
Черника	фиолетовый	0,36	
Черная смородина	фиолетовый	0,36	
Клюква	слабофиолетовый	0,35	
Брусника	фиолетовый	0,36	

С целью подтверждения результатов тонкослойной хроматографии была проведена спектрофотометрия.

Результаты прямой спектрофотометрии представлены в табл. 3 и на рис. 1.

Полученные данные входят в интервал поглощения в диапазоне длин волн 510–540 нм [16, 17].

Исходя из данных табл. 2 и 3, рис. 1 и качественной реакции доказано, что в водных и спир-

Таблица 3. Качественные характеристики спектров поглощения спиртовых экстрактов ягод (pH=4)

Table 3. Qualitative characteristics of the absorption spectra of berries alcohol extracts (pH=4)

Спиртовой экстракт	Максимум поглощения, λ (нм)	Оптическая плотность, A
Ежевика	534,8	0,286
Черника	520,0	0,839
Черная смородина	542,2	0,318
Клюква	536,0	0,122
Брусника	539,8	0,284

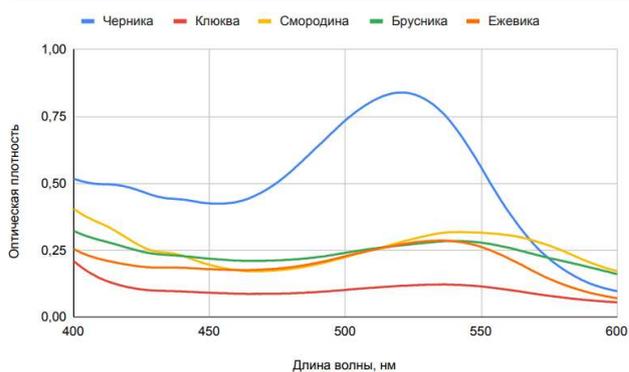


Рис. 1. Спектры поглощения спиртовых экстрактов ягод (pH=4)

Fig. 1. Absorption spectra of berries alcohol extracts (pH=4)

товых растворах ягод черники, ежевики, черной смородины и брусники содержатся антоцианы. Данные хроматографического анализа согласуются с ранее проведенными исследованиями [8, 18–22].

Оценку количественного содержания антоцианов проводили методом рН-дифференциальной спектрофотометрии, описанной ранее. Результаты определения представлены в табл. 4.

По формуле (1) была рассчитана разность оптической плотности водных и спиртовых растворов ягод. Массовую концентрацию суммы антоцианов (мг/дм^3) в пересчете на цианидин-3-глюкозид вычисляли по формуле (2), результаты представлены в табл. 5.

Содержание антоцианов в водных экстрактах намного меньше, чем в спиртовых экстрактах: от 1,2 раза в экстрактах ягод брусники и до 3,4 раза в экстрактах ягод черники. Исключение составили экстракты из ягод клюквы. Следовательно, из выбранных пяти видов ягодного сырья именно ягоды клюквы меньше всего подходят для использования в качестве индикатора.

Таким образом, установлено, что водные и спиртовые растворы ягод ежевики, черники и черной смородины, содержащие большое количество антоцианов, имеют кислую реакцию среды (pH=2,95–5,04). Следовательно, переход окраски (малиновая–пурпурно-синяя) у них будет наблюдаться в щелочной среде. Эти растворы могут быть использованы в качестве природных кислотно-основных индикаторов.

Таблица 4. Оптическая плотность спиртовых и водных растворов

Table 4. Optical density of alcohol and aqueous solutions

Спиртовой экстракт	Значения оптической плотности (A)			
	$\lambda=510$ нм рН=1	рН=4,5	$\lambda=700$ нм рН=1	рН=4,5
Ежевика	0,786	0,099	0,053	0,026
Черника	0,753	0,070	0,025	0,022
Черная смородина	0,750	0,066	0,028	0,013
Клюква	0,130	0,058	0,019	0,017
Брусника	0,298	0,106	0,030	0,040
Водный экстракт	Значения оптической плотности (A)			
	$\lambda=510$ нм рН=1	рН=4,5	$\lambda=700$ нм рН=1	рН=4,5
Ежевика	0,540	0,140	0,037	0,061
Черника	0,274	0,075	0,037	0,038
Черная смородина	0,460	0,083	0,030	0,041
Клюква	0,159	0,046	0,029	0,034
Брусника	0,213	0,044	0,018	0,014

Таблица 5. Количественное содержание антоцианов в экстрактах ягод

Table 5. Quantitative content of anthocyanins in berry extracts

Вид ягодного сырья	Спиртовой экстракт		Водный экстракт	
	ΔA	C_m , мг/л	ΔA	C_m , мг/л
Ежевика	0,660	220,00	0,424	141
Черная смородина	0,669	223,00	0,388	129
Черника	0,680	227,00	0,200	66
Клюква	0,070	23,38	0,118	39
Брусника	0,202	67,00	0,165	55

Для исследования перехода окраски были приготовлены шесть растворов с разным показателем рН (2, 4, 6, 8, 10, 12). Значения рН среды определяли с помощью колориметрического метода⁶. Для экстракта ягод черной смородины переход окраски наблюдали при рН=8–10, для черники и ежевики – при рН=10–12. По данным Ю. Ю. Лурье⁷, переход окраски для раствора фенолфталеина составляет 8,83–9,32. Следовательно, ближе всех к кислотно-основному индикатору фенолфталеину подходит спиртовой экстракт ягод черной смородины. Он же является, по данным исследования, самым перспективным индикатором среди десяти исследованных образцов.

Далее оценивали сходимость результатов алкалометрического титрования с перспективным индикатором в параллели с фенолфталеином. Проводили титриметрический анализ содержания аскорбиновой кислоты и в некоторых плодах. Полученные данные приведены в табл. 6.

Средний объем, использованный для титрования 1 мл аскорбиновой кислоты с фенолфталеином, составляет 2,012 мл, со спиртовым

раствором ягод черной смородины – 2,014 мл. Таким образом, содержание аскорбиновой кислоты при титровании ее с фенолфталеином составляет 0,2012 моль/л, а со спиртовым раствором ягод черной смородины – 0,2014 моль/л, при содержании ее в растворе для инъекций концентрацией 0,2000 моль/л. Статистически достоверных различий при титровании с применением фенолфталеина и экстракта черной смородины выявлено не было.

Методом прямой алкалометрии с индикатором фенолфталеином и спиртовым экстрактом ягод черной смородины определяли содержание аскорбиновой кислоты в кожуре яблока, апельсина, лимона и их мякоти. Полученные данные приведены в табл. 7.

Наименьшее значение аскорбиновой кислоты обнаружено в кожуре яблока и его мякоти. Наибольшее количество аскорбиновой кислоты содержится в кожуре лимона и апельсина. Эти данные сопоставимы с содержанием данного витамина в ранее опубликованных работах⁸ [23–27]. Из результатов, представленных в табл. 7, очевидно, что статистически значимы различия при применении природного индикатора

⁶Государственная фармакопея СССР. Издание XI. М.: Медицина, 1987. Вып. 1. Общие методы анализа. 334 с.

⁷Лурье Ю. Ю. Справочник по аналитической химии. М.: Химия, 1989. 448 с.

Таблица 6. Содержание аскорбиновой кислоты в стандарте с использованием фенолфталеина и спиртового раствора ягод черной смородины

Table 6. Ascorbic acid content in the standard using phenolphthalein and blackcurrant alcohol solution as indicator

№ образца	Индикатор – фенолфталеин		Индикатор – спиртовой раствор ягод черной смородины	
	V титранта, мл	C _м , моль/л	V титранта, мл	C _м , моль/л
1	2,00	0,200	2,00	0,200
2	2,03	0,203	2,03	0,203
3	2,00	0,200	2,02	0,202
4	2,02	0,201	2,00	0,200
5	2,01	0,201	2,02	0,202
Среднее	2,012±0,005*	0,201±0,0006*	2,014±0,006*	0,201±0,0006*

Примечание: * – различия не достоверны, p>0,05.

Таблица 7. Содержание аскорбиновой кислоты в образцах фруктов

Table 7. Ascorbic acid content in fruit samples

Наименование	Индикатор – фенолфталеин				Индикатор – спиртовой раствор ягод черной смородины				Справочные данные по содержанию витамина С, мг/100 г
	V т-та, мл	V _{ср.} , мл	Концентрация аскорбиновой кислоты		V т-та, мл	V _{ср.} , мл	Концентрация аскорбиновой кислоты		
			моль/л	мг/100 г			моль/л	мг/100 г	
Кожура яблока	0,54	0,55	0,00055	9,62±0,12*	0,55	0,55	0,00055	9,75±0,06*	10 [23, 24]
	0,56				0,56				
	0,54				0,55				
Кожура апельсина	9,27	9,26	0,00926	163,87±0,1 ⁺	9,31	9,31	0,00931	163,97±0,10 ⁺	150–180 [25, 26]
	9,26				9,32				
	9,25				9,30				
Кожура лимона	5,68	5,68	0,00568	99,98±0,06 ⁺	5,74	5,73	0,00573	100,92±0,10 ⁺	84–140 [26]
	5,67				5,72				
	5,68				5,73				
Мякоть яблока	1,20	1,19	0,00119	20,96±0,10*	1,20	1,19	0,00119	20,96±0,10*	6–22 [23, 24]
	1,19				1,19				
	1,18				1,18				
Мякоть апельсина	3,55	3,58	0,00358	63,05±0,27*	3,63	3,63	0,00363	63,93±0,20*	60–80 [25, 26]
	3,60				3,65				
	3,59				3,61				
Мякоть лимона	2,28	2,27	0,00227	39,98±0,10*	2,29	2,27	0,00227	39,98±0,10*	38–40 [26]
	2,26				2,27				
	2,27				2,26				

Примечание: * – различия не достоверны, p>0,05; + – различия достоверны, p<0,05.

тора (спиртового экстракта ягод черной смородины) только в образцах кожуры лимона и апельсина.

Таким образом, спиртовой экстракт ягод черной смородины можно рассматривать как возможный индикатор для алкалиметрического титрования. Однако при приготовлении индикатора следует учитывать тот факт, что антоцианы склонны к окислению. Это происходит из-за изменения структуры антоцианов при длительном хранении [28]. Такие индикаторы должны готовиться *ex tempore* перед применением.

ВЫВОДЫ

1. Качественно и количественно определено содержание суммы антоцианов в водных и спиртовых экстрактах ягод ежевики, клюквы, черной смородины, черники и брусники в пересчете на цианидин-3-глюкозид.

2. Установлено, что ближе всех к кислотному индикатору фенолфталеину по интервалу перехода pH соответствует спиртовой экстракт ягод черной смородины.

3. Показана сходимость результатов алкалиметрического титрования с использованием в качестве индикатора фенолфталеина и суммы антоцианов.

⁸Тимофеев Е. Д., Черемисина М. Д. Содержание аскорбиновой кислоты в различных видах цитрусовых // Молодая наука – практическому здравоохранению: материалы 93-й итоговой науч.-практ. конф. студентов, ординаторов, аспирантов, молодых ученых (до 35 лет) ПГМУ им. Е. А. Вагнера. Пермь: ПГМУ им. Е. А. Вагнера, 2020. С. 206–208.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Псарева Д. Ю., Коношина С. Н. Особенности получения и применения натуральных красителей // Наука и образование: новое время. 2017. N 3. С. 754–756.
2. Иванова Н. В. Применение растительных экстрактов в роли индикаторов комплексонометрии // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. 2009. N 6. С. 29–30.
3. Дрюцкая С. М., Толстенюк И. В., Шостак Д. В. Поиски растительных индикаторов для кислотно-основного титрования // Естественные и технические науки. 2022. N 5. С. 32–35.
4. Полина С. А., Ефремов А. А. Состав антоцианов плодов черники обыкновенной, брусники обыкновенной и клюквы обыкновенной Красноярского края по данным ВЭЖХ // Химия растительного сырья. 2014. N 2. С. 103–110.
5. Соломинова Л. В., Онина С. А., Козлова Г. Г. Извлечение и исследование антоцианов растительного сырья // Бюллетень науки и практики. 2019. N 4. С. 69–75. <https://doi.org/10.33619/2414-2948/41/07>.
6. Саласина Я. Ю., Калиникин Д. А., Дейнека В. И., Дейнека Л. А. Некоторые закономерности экстракции антоцианов из растительных источников // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2020. T. 10. N 4. С. 691–699. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-691-699>.
7. Kapasakalidis P. G., Rastall R. A., Gordon M. H. Extraction of polyphenols from processed black currant (*Ribes nigrum* L.) residues // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2006. Vol. 54, no. 11. P. 4016–4021. <https://doi.org/10.1021/jf052999l>.
8. Куркин В. А., Рязанова Т. К. Новые подходы к стандартизации плодов черники обыкновенной // Химия растительного сырья. 2012. N 4. С. 167–173.
9. Патент № 2768114, Российская Федерация, G01J 3/52. Способ экспрессного определения суммарного содержания антоцианов / Е. В. Аверьянова, М. Н. Школьникова; заявитель и патентообладатель Алтайский государственный технический университет им. И. И. Ползунова. Заявл. 12.08.2020; опубл. 23.03.2022. Бюл. № 9.
10. Фролова Н. А., Резниченко И. Ю. Исследование химического состава плодово-ягодного сырья Дальневосточного региона как перспективного источника пищевых и биологически активных веществ // Вопросы питания. 2019. T. 88. N 2. С. 83–90. <https://doi.org/10.24411/0042-8833-2019-10021>.
11. Брежнева Т. А., Логвинова Е. Е., Сливкин А. И., Тарабрина В. Н. Спектральные характеристики антоциановых соединений плодов рябины черноплодной // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2013. N 2. С. 169–172.
12. Колпаков А. К. Синтез и свойства фенолфталеина // Ratio et Natura. 2020. N 2. С. 53.
13. Матназарова Д. И. Оценка биохимического состава ягод ежевики в связи с использованием в селекции // Вестник аграрной науки. 2020. N 5. С. 170–176. <https://doi.org/10.17238/issn2587-666X.2020.5.170>.
14. Колдаев В. М. Оптические свойства антоцианосодержащих извлечений из растительного сырья // Тихоокеанский медицинский журнал. 2018. N 2. С. 50–52. <https://doi.org/10.17238/PmJ1609-1175.2018.2.50-52>.
15. Петрова С. Н., Кузнецова А. А. Состав плодов и листьев смородины черной *Ribes nigrum* (обзор) // Химия растительного сырья. 2014. N 4. С. 43–50.
16. Basílio N., Pina F. Chemistry and photochemistry of anthocyanins and related compounds: a thermodynamic and kinetic approach // Molecules. 2016. Vol. 21, no. 11. P. 1502. <https://doi.org/10.3390/molecules21111502>.
17. Vagiri M., Ekholm A., Andersson S. C., Johansson E., Rumpunen K. An optimized method for analysis of phenolic compounds in buds, leaves, and fruits of black currant (*Ribes nigrum* L.) // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2012. Vol. 60, no. 42. P. 10501–10510. <https://doi.org/10.1021/jf303398x>.
18. Егорова О. С., Розина Л. И., Акбулатова Д. Р., Шилкин А. А., Свиридов Д. А., Апрелев А. В. [и др.]. Анализ антоцианового комплекса красителей, полученных из вторичных ресурсов плодового виноделия // Пиво и напитки. 2021. N 4. С. 38–41. <https://doi.org/10.52653/PIN.2021.4.4.010>.
19. Willemse C. M., Stander M. A., de Villiers A. Hydrophilic interaction chromatographic analysis of anthocyanins // Journal of Chromatography A. 2013. Vol. 1319. P. 127–140. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.10.045>.
20. Deineka V. I., Saenko I. I., Deineka L. A., Blinova I. P. Hydrophilic interaction chromatography as an alternative to reversed-phase HPLC in determining anthocyanins and betacyanins // Journal of Analytical Chemistry. 2016. Vol. 71, no. 3. P. 297–301. <https://doi.org/10.1134/S1061934816030035>.
21. Deineka V. I., Deineka L. A., Makarevich S. L. Hydrophilic interaction chromatography on silica: group analysis of grape anthocyanins // Journal of Analytical Chemistry. 2018. Vol. 73, no. 2. P. 190–194. <https://doi.org/10.1134/S106193481802003X>.
22. Дейнека В. И., Олейниц Е. Ю., Павлов А. А., Михеев А. Ю., Шелепова О. В., Волкова О. Д. [и др.]. Определение антоцианов плодов некоторых растений рода *Ribes* методами обращенно-фазовой ВЭЖХ и гидрофильной хроматографии // Химия растительного сырья. 2020. N 1. С. 81–88. <https://doi.org/10.14258/jcprm.2020016331>.
23. Виденева А. П. Исследование содержания аскорбиновой кислоты в яблоках по мере их хранения и при воздействии высоких и низких темпера-

тур // Е-SCIO. 2020. N 5. С. 473–479.

24. Мищенко Е. О., Фандо Г. П. Исследование динамики содержания аскорбиновой кислоты (витамина С) в яблоках различных сортов в зависимости от сроков хранения и термической кулинарной обработки // *Инновации в медицине и фармации*. 2015. С. 894–899.

25. Макарова Н. В., Зюзина А. В., Мирошкина Ю. И. Антиоксидантная активность цитрусовых плодов // *Известия высших учебных заведений. Пищевая технология*. 2010. N 1. С. 30–32.

26. Мирзоев Г. С., Османов Т. Р., Самедов Э. А. Экспертиза показателей качества цитрусовых плодов (лимонов и мандаринов), реализуемых в торго-

вой сети // *Вестник науки и образования*. 2016. N 7. С. 30–32.

27. Bałowska-Barczak A. M. Acylated anthocyanins as stable, natural food colorants – a review // *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 2005. Vol. 14/55, no. 2. P. 107–116. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.1987.tb00123.x>.

28. Макаревич А. М., Шутова А. Г., Спиридович Е. В., Решетников В. Н. Функции и свойства антоцианов растительного сырья // *Труды Белорусского государственного университета. Серия: Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем*. 2009. Т. 4. N 2. С. 147–157.

REFERENCES

1. Psareva D. Yu., Konoshina S. N. Features of obtaining and using natural dyes. *Nauka i obrazovanie: novoye vremya*. 2017;(3):754-756. (In Russian).

2. Ivanova N. V. The use of plant extracts as indicators of complexometry. *Aktual'nye problemy gumanitarnykh i estestvennykh nauk*. 2009;6:29-30. (In Russian).

3. Dryutskaya S. M., Tolstenok I. V., Shostak D. V. Search for plant indicators for acid-base titration. *Estestvennye i tekhnicheskie nauki = Natural and Technical Sciences*. 2022;(5):32-35. (In Russian).

4. Polina S. A., Efremov A. A. Composition of anthocyanins in the fruits of blueberries, lingonberries and cranberries of the Krasnoyarsk Territory according to HPLC data. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*. 2014;(2):103-110. (In Russian).

5. Solominova L. V., Onina S. A., Kozlova G. A. Extraction and study anthocyanins plant material. *Byulleten' nauki i praktiki = Bulletin of Science and Practice*. 2019;(4):69-75. <https://doi.org/10.33619/2414-2948/41/07>.

6. Salasina Y. Yu., Kalinikin D. S., Deineka V. I., Deineka L. A. Some regularities in the process of anthocyanin extraction from vegetable sources. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(4):691-699. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-691-699>.

7. Kapasakalidis P. G., Rastall R. A., Gordon M. H. Extraction of polyphenols from processed black currant (*Ribes nigrum* L.) residues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006;54(11):4016-4021. <https://doi.org/10.1021/jf052999i>.

8. Kurkin V. A., Ryazanova T. K. New approaches to the standardization of blueberries. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*. 2012;(4):167-173. (In Russian).

9. Averyanova E. V., Shkolnikova M. N. Method for express determination of the total content of anthocyanins. Patent RF, no. 2768114; 2022. (In Russian).

10. Frolova N. A., Reznichenko I. Yu. Investigation of the chemical composition of fruit and berry raw materials of the far eastern region as a perspective source of nutrients and bioactive compounds. *Voprosy pitani-*

ya = Problems of Nutrition. 2019;88(2):83-90. <https://doi.org/10.24411/0042-8833-2019-10021>.

11. Brezhneva T. A., Logvinova E. E., Slivkin A. I., Tarabrina V. N. Spectral characteristics of compounds of fruit. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya = Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2013;(2):169-172. (In Russian).

12. Kolpakov A. K. Synthesis and properties of phenolphthalein. *Ratio et Natura*. 2020;(2):53.

13. Matnazarova D. I. Assessment of the biochemical composition of blackberries in connection with the use in breeding. *Vestnik agrarnoi nauki = Bulletin of Agrarian Science*. 2020;(5):170-176. <https://doi.org/10.17238/issn2587-666X.2020.5.170>.

14. Koldaev V. M. The optical properties of including anthocyan extracts from plant's material. *Tikhookeanskii meditsinskii zhurnal = Pacific Medical Journal*. 2018;(2):50-52. <https://doi.org/10.17238/PmJ1609-1175.2018.2.50-52>.

15. Petrova S. N., Kuznetsova A. A. Composition of fruits and leaves of blackcurrant *Ribes nigrum* (review). *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*. 2014;(4):43-50. (In Russian).

16. Basílio N., Pina F. Chemistry and photochemistry of anthocyanins and related compounds: a thermodynamic and kinetic approach. *Molecules*. 2016;21(11):1502. <https://doi.org/10.3390/molecules21111502>.

17. Vagiri M., Ekholm A., Andersson S. C., Johansson E., Rumpunen K. An optimized method for analysis of phenolic compounds in buds, leaves, and fruits of black currant (*Ribes nigrum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012;60(42):10501-10510. <https://doi.org/10.1021/jf303398x>.

18. Egorova O. S., Rozina L. I., Akbulatova D. R., Shilkin A. A., Sviridov D. A., Aprelev A. V., et al. Analysis of the anthocyanin complex of dyes obtained from fruit winemaking secondary resources. *Pivo i napitki = Beer and Beverages*. 2021;(4):38-41. (In Russian). <https://doi.org/10.52653/PIN.2021.4.4.010>.

19. Willemse C. M., Stander M. A., de Villiers A.

Hydrophilic interaction chromatographic analysis of anthocyanins. *Journal of Chromatography A*. 2013;1319:127-140. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.10.045>.

20. Deineka V. I., Saenko I. I., Deineka L. A., Bli-nova I. P. Hydrophilic interaction chromatography as an alternative to reversed-phase HPLC in determining anthocyanins and betacyanins. *Journal of Analytical Chemistry*. 2016;71(3):297-301. <https://doi.org/10.1134/S1061934816030035>.

21. Deineka V. I., Deineka L. A., Makarevich S. L. Hydrophilic interaction chromatography on silica: group analysis of grape anthocyanins. *Journal of Analytical Chemistry*. 2018;73(2):190-194. <https://doi.org/10.1134/S106193481802003X>.

22. Deineka V. I., Oleinits E. Yu., Pavlov A. A., Mikheev A. Yu., Shelepova O. V., Volkova O. D., et al. Determination of anthocyanins of fruits of some plants of the genus *Ribes* by reversed-phase hplc and hydrophilic interaction chromatography (HILIC). *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*. 2020;(1):81-88. (In Russian). <https://doi.org/10.14258/jcprm.2020016331>.

23. Videneva A. P. The study of ascorbic acid content in apples as they are stored and when exposed to high and low temperatures. *E-SCIO*. 2020;(5):473-479.

24. Mishchenko E. O., Fando G. P. Study of the dy-

namics of the content of ascorbic acid (vitamin C) in apples of various varieties depending on the shelf life and thermal cooking. *Innovatsii v meditsine i farmatsii*. 2015;894-899. (In Russian).

25. Makarova N. V., Zyuzina A. V., Miroshkina Yu. I. Antioxidant activity of citrus fruits. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedenii. Pishchevaya tekhnologiya = Izvestiya Vuzov. Food Technology*. 2010;(1):30-32. (In Russian).

26. Mirzoev G. S., Osmanov T. R., Samedov E. A. Examination of quality indicators of citrus fruits (lemons and tangerines) sold in the distribution network. *Vestnik Nauki i Obrazovaniya*. 2016;(7):30-32. (In Russian).

27. Bałowska-Barczak A. M. Acylated anthocyanins as stable, natural food colorants – a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 2005;14/55(2):107-116. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.1987.tb00123.x>.

28. Makarevich A. M., Shutova A. G., Spiridovich E. B., Reshetnikov B. H. Functions and properties of anthocyanins of vegetable raw materials. *Trudy Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Fiziologicheskoe, biokhimicheskoe i molekulyarnye osnovy funktsionirovaniya biosistem = Proceedings of the Belarusian State University. Series of Physiological, Biochemical and Molecular Biology Sciences*. 2009;4(2):147-157. (In Russian).

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

С. М. Дрюцкая,

к.б.н., доцент, доцент кафедры химии,
Дальневосточный государственный медицинский университет,
680000, г. Хабаровск, ул. Муравьева-Амурского,
35, Российская Федерация,
sveta07027@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8951-5777>

И. В. Толстенок,

к.б.н., доцент,
Дальневосточный государственный медицинский университет,
680000, г. Хабаровск, ул. Муравьева-Амурского,
35, Российская Федерация,
toiv@bk.ru
<https://orcid.org/0000-0002-0822-3431>

Н. Ю. Якушева,

к.фарм.н., доцент,
доцент кафедры фармации и фармакологии,
Дальневосточный государственный медицинский университет,
680000, г. Хабаровск, ул. Муравьева-Амурского,
35, Российская Федерация,
whiteout@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1561-5465>

Вклад авторов

С. М. Дрюцкая, И. В. Толстенок – выполнение экспериментальной работы, обобщение результатов, написание рукописи.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Svetlana M. Dryutskaya,

Cand. Sci. (Biology), Associate Professor,
Far Eastern State Medical University,
35, Muravyov-Amursky St., 680000, Khabarovsk,
Russian Federation,
sveta07027@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8951-5777>

Ivan V. Tolstenok,

Cand. Sci. (Biology), Associate Professor,
Far Eastern State Medical University,
35, Muravyov-Amursky St., 680000, Khabarovsk,
Russian Federation,
toiv@bk.ru
<https://orcid.org/0000-0002-0822-3431>

Natalya Yu. Yakusheva,

Cand. Sci. (Pharmacy), Associate Professor,
Department of Pharmacy and Pharmacology,
Far Eastern State Medical University,
35, Muravyov-Amursky St., 680000, Khabarovsk,
Russian Federation,
whiteout@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1561-5465>

Contribution of the authors

S. M. Dryutskaya, I. V. Tolstenok – performed the experiments, summarised the results, wrote the manuscript.

Н. Ю. Якушева – выполнение экспериментальной работы.

N. Yu. Yakusheva – performed the experiments.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict interests

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

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

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

Информация о статье

*Поступила в редакцию 21.06.2022.
Одобрена после рецензирования 02.09.2022.
Принята к публикации 15.09.2022.*

Information about the article

*The article was submitted 21.06.2022.
Approved after reviewing 02.09.2022.
Accepted for publication 15.09.2022.*

Обзорная статья
УДК 581.6:581.192
DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-383-393>



Перспективы химической и биотехнологической переработки мискантуса

Надежда Александровна Шавыркина, Юлия Александровна Гисматулина,
Вера Владимировна Будаева

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

Автор, ответственный за переписку: Шавыркина Надежда Александровна, 32nadina@mail.ru

Аннотация. Переработка растительной биомассы в востребованные и экономически обоснованные продукты на сегодняшний момент является признанным мировым трендом. Среди альтернативных энергетических направлений конверсия биомассы – наиболее прогнозируемый и устойчивый углеродный ресурс, способный заменить ископаемые виды топлива. Уже на сегодняшний момент растительная биомасса обеспечивает почти 25% мирового энергоснабжения. В данном обзоре приведены сведения о наиболее перспективных направлениях химической и биотехнологической переработки биомассы такого энергетического растения, как мискантус. Выбор мискантуса обусловлен его высокой урожайностью (до 40 т/га посевной площади) и высоким выходом энергии (140–560 ГДж/га) по сравнению с другим растительным сырьем. Кроме того, мискантус способен расти на маргинальных землях и не требует особых агрономических мероприятий, при этом в процессе его культивирования происходит обогащение почвы органическими веществами и ее очистка от загрязняющих веществ. В обзоре отражены направления переработки нативной биомассы и биомассы, подвергнутой предварительной обработке. Биомассу мискантуса, помимо переработки в энергоресурсы, можно фракционировать и трансформировать во множество высокоценных продуктов – целлюлозу, нитраты целлюлозы, этилен, гидроксиметилфурфурол, фурфурол, фенолы, этиленгликоль. Варочные растворы после азотнокислой предобработки биомассы мискантуса могут выступать в роли лигногуминовых удобрений. Кроме того, на основе гидролизатов целлюлозы мискантуса можно получать доброкачественные питательные среды для биотехнологической трансформации в бактериальную наноцеллюлозу, для накопления и выделения всевозможных микробных ферментов.

Ключевые слова: мискантус, углеродный след, промышленная переработка, возобновляемые источники энергии, экология мискантуса

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 22-13-00107, <https://rscf.ru/project/22-13-00107/>.

Для цитирования: Шавыркина Н. А., Гисматулина Ю. А., Будаева В. В. Перспективы химической и биотехнологической переработки мискантуса // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2022. Т. 12. N 3. С. 383–393. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-383-393>.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Review article

Prospects for chemical and biotechnological processing of miscanthus

Nadezhda A. Shavyrkina, Yuliya A. Gismatulina, Vera V. Budaeva

Institute for Problems of Chemical and Energetic Technologies SB RAS, Biysk, Russian Federation
Corresponding author: Nadezhda A. Shavyrkina, 32nadina@mail.ru

Abstract. The processing of plant biomass into demanded and economically viable products is currently a recognized global trend. Among alternative energy directions, biomass conversion is the most predictable and sustainable carbon resource that can replace fossil fuels. Already today, plant biomass provides almost 25% of the world's energy supply. This review provides information on the most promising areas of chemical and

© Шавыркина Н. А., Гисматулина Ю. А., Будаева В. В., 2022

biotechnological processing of the biomass of such an energy plant as miscanthus. The choice of miscanthus is due to its high yield (up to 40 t/ha of sown area) and high energy yield (140–560 GJ/ha) compared to other plant materials. In addition, miscanthus is able to grow on marginal lands and does not require special agronomic measures, while in the process of its cultivation, the soil is enriched with organic substances and it is cleaned from pollutants. The review reflects the directions of processing of native biomass and pretreated biomass. Miscanthus biomass, in addition to processing into energy resources, can be fractionated and transformed into many high-value products - cellulose, cellulose nitrates, ethylene, hydroxymethylfurfural, furfural, phenols, ethylene glycol, cooking solutions after nitric acid pretreatment of miscanthus biomass can act as lignohumic fertilizers. In addition, on the basis of miscanthus cellulose hydrolysates, it is possible to obtain benign nutrient media for biotechnological transformation into bacterial nanocellulose, for the accumulation and isolation of various microbial enzymes.

Keywords: *Miscanthus, carbon footprint, industrial processing, renewable energy sources, Miscanthus ecology*

Funding. *The research was carried out at the expense of the grant of the Russian Science Foundation no. 22-13-00107, <https://rscf.ru/project/22-13-00107/>.*

For citation: Shavyrkina N. A., Gismatulina Yu. A., Budaeva V. V. Prospects for chemical and biotechnological processing of miscanthus. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2022;12(3):383-393. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-383-393>.

ВВЕДЕНИЕ

В свете все более усугубляющихся энергетических и экологических проблем в мировом масштабе совершенно очевидным становится тот факт, что решение этих проблем лежит в области поиска альтернативных возобновляемых источников энергии. При этом необходимо двигаться в 2-х направлениях: увеличивать рентабельность энергоресурсов и в то же время снижать энергопотребление, совершенствуя энергосберегающие технологии в различных сферах человеческой деятельности.

Несомненным преимуществом возобновляемых сырьевых ресурсов является возможность их использования не только в качестве биотоплива напрямую путем сжигания или в преобразованном виде, но и возможность их трансформации в различные высокоценные продукты путем фракционирования и дальнейшей модификации [1]. Кроме того, одним из самых важных современных критериев качества энергетических ресурсов является их экологичность, в частности величина углеродного следа при использовании этих ресурсов. Экологические последствия, такие как резкое изменение климата, чрезмерный выброс парниковых газов в атмосферу и повышение цен на топливо за последние несколько лет, являются следствием крайней зависимости от невозобновляемых ресурсов [2]. Общее конечное потребление энергии увеличилось вдвое с 1973 года, достигнув 9425 млн тонн нефтяного эквивалента в 2014 году [3].

ВОЗОБНОВЛЯЕМЫЕ И НЕВОЗОБНОВЛЯЕМЫЕ СЫРЬЕВЫЕ РЕСУРСЫ

Углекислый газ, выступающий основным компонентом парниковых газов, является естественным конечным продуктом окисления всех органических веществ, т. е. человечество во всех сферах

своей деятельности генерирует его в различных объемах: мы дышим, мы сжигаем топливо, ведем химические и биотехнологические процессы, перерабатываем все возрастающие объемы отходов – во время всех этих процессов выделяется углекислый газ. Таким образом, энергетический углеродный след складывается из следующих составляющих: количество CO_2 , которое выделяется при добыче и использовании топлива, минус количество CO_2 , которое поглощается при формировании этого топлива и возможной переработке отходов.

Невозобновляемые источники энергии (нефть, каменный уголь, газ) сформировались очень давно и не обеспечивают фиксации углекислого газа, только его выделение. Небольшого эффекта сокращения углеродного следа можно достичь переработкой отходов различной полимерной продукции, получаемой из этих невозобновляемых источников. Кроме того, совершенно необходимым условием предотвращения глобальных экологических последствий является сокращение уровня потребления всевозможных товаров и, как следствие, производства огромного количества различных видов полимерной упаковки, для переработки которой природе требуются десятилетия. Вопросы совершенствования упаковочных материалов однозначно должны переместиться в область поиска и разработки технологий производства биоразлагаемых полимеров [4].

Солнечная, гидроэнергия, энергия ветра, биомасса растений относятся к числу возобновляемых источников энергии, которым уделяется наибольшее внимание [2]. Среди этих альтернативных энергетических направлений конверсия биомассы является наиболее прогнозируемым и устойчивым углеродным ресурсом, способным заменить ископаемые виды топлива [5, 6]. Уже на сегодняшний момент растительная биомасса обеспечивает почти 25% мирового энергоснабжения [7, 8].

Интересное исследование проведено в Сербии

[9], произведены расчеты выбросов CO_2 от посадки мискантуса до получения и использования топливных брикетов из его высушенной биомассы: наибольший углеродный след приходится на операцию брикетирования из-за высокого потребления электроэнергии, которая вырабатывается в основном из невозобновляемых источников энергии, при этом результаты исследования показали резкое снижение выбросов CO_2 – до 4000 раз в случае использования возобновляемых источников для производства электроэнергии.

Преимущества биомассы в качестве альтернативного возобновляемого энергоресурса достаточно очевидны: ежегодная воспроизводимость в значительных количествах, низкая стоимость, умеренное количество примесей [10, 11]. Углеродный след при использовании растительного сырья будет складываться из следующих компонентов: $+\text{CO}_2$ (увеличение углеродного следа) – затраты энергоресурсов на посадку и выращивание, сжигание и трансформацию (химическую, биотехнологическую) биомассы; $-\text{CO}_2$ (снижение углеродного следа) – фиксация углекислого газа посредством фотосинтеза при выращивании биомассы, возможность снятия многократного урожая с одной плантации, широкий спектр продуктов, которые можно получить из растительного сырья, возможность повторной переработки полученных материалов без ущерба для окружающей среды. Таким образом, использование возобновляемых растительных сырьевых ресурсов во всех областях человеческой деятельности однозначно будет способствовать снижению углеродного следа.

БИОХИМИЧЕСКИЕ И ВИДОВЫЕ ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТУРЫ *MISCANTHUS*, СПОСОБСТВУЮЩИЕ СНИЖЕНИЮ УГЛЕРОДНОГО СЛЕДА

Практически все растения используют энергию солнечного света для преобразования углекислого газа и воды в кислород и сахара посредством фотосинтеза. Растения поглощают углекислый газ из атмосферы. Большинство растений используют ферментативный путь, который называется фотосинтезом C_3 . Некоторые растения способны более активно фиксировать углекислый газ, интенсивность фотосинтеза у них выше. Такой тип преобразования солнечной энергии, называемый фотосинтезом C_4 , сопряжен с механизмом, который увеличивает уровень углекислого газа в клетках [12], т. е. растения, реализующие такой путь фотосинтеза, поглощают из окружающей среды больше углекислого газа и способны более существенно снизить его уровень в атмосфере.

Биоэнергетические культуры подразделяются на три основные категории: 1) культуры, содержащие крахмал и сахара, используемые в производстве топливного этанола; 2) масличные культуры, из которых получают биодизельное топливо; 3) лигноцеллюлозные культуры, богатые целлюлозой, гемицеллюлозой лигнином, используемые для выработки тепла, электроэнергии,

биогаза и этанола. Лигноцеллюлозная биомасса является перспективным сырьем для производства биоэтанола [13, 14]. Такие энергетические культуры, как мискантус (*Miscanthus*) – многолетнее травянистое растение с фотосинтетическим путем C_4 , сочетают высокую продуктивность и эффективность использования ресурсов с низкими требованиями к агрономическим ресурсам, т. е. они обладают способностью высокоэффективно преобразовывать солнечную энергию в биомассу [15].

Биомасса мискантуса набирает популярность в качестве биоэнергетического сырья во всем мире из-за ее высокой урожайности (до 40 т/га посевной площади) и высокого выхода энергии (140–560 ГДж/га) по сравнению с другим сырьем [16, 17]. Мискантус растет на маргинальных или неиспользуемых землях, привлекает внимание не только как биоинтермедиат, способствующий сокращению выбросов углекислого газа на суше, но и как растительный ресурс, способный обеспечить реальную, масштабируемую и устойчивую альтернативу невозобновляемым ресурсам. При этом мискантус не имеет свойства разрастаться бесконтрольно на всей доступной ему территории, т. е. он не будет вытеснять традиционные для данной местности виды растительности и нарушать биоценозы [18, 19]. Таким образом, использование биомассы мискантуса для энергетических нужд приведет к сокращению углеродного следа в Центральной Европе до 30,6 т $\text{CO}_{2\text{-экв}}$ /га в год, а в странах с холодным климатом (в том числе и России) эта позитивная тенденция составит порядка 19 т $\text{CO}_{2\text{-экв}}$ /га в год [20].

Кроме того, мискантус успешно выполняет экологические и средоулучшающие функции: защищает ландшафты от эрозии, способствует накоплению органического вещества в почве, значительно уменьшая эмиссию CO_2 [21]. При произрастании мискантуса происходит обогащение почвы органическими веществами и повышение ее дыхательной активности. Таким образом, выращивание мискантуса позволяет связывать в органическом веществе почвы значимое количество углерода. В работах [22, 23] представлены экспериментальные данные об увеличении гумуса в верхнем слое почвы при выращивании мискантуса и высоком соотношении энергии, содержащейся в наземной биомассе с суммарными затратами технической энергии на возделывание и уборку урожая, что свидетельствует о высокой агрономической, энергетической и экологической эффективности возделывания мискантуса. По оценке авторов [24], выращивание мискантуса приведет к компенсации выбросов парниковых газов до 4,08 т $\text{CO}_{2\text{-экв}}$ на гектар в год, что благоприятно отразится на мировой экологической обстановке.

Виды *Miscanthus giganteus* и *Miscanthus sinensis* характеризуются высоким уровнем производства биомассы на гектар. Виды *Miscanthus giganteus* и *Miscanthus sacchariflorus*, для которых характерно высокое содержание лигнина, представляются более подходящими для процессов термохимического

преобразования. Напротив, виды *M. sinensis* и *некоторые подвиды M. giganteus* с низким содержанием лигнина представляют интерес для процессов биохимической конверсии. *M. sacchariflorus* из-за его низкой зольности интересен как исходный вариант для селекционных программ, позволяющих получить биомассу различного состава, в зависимости от запроса, и реализовать всевозможные процессы преобразования биоэнергии [25]. *M. sacchariflorus* сорта Сорановский способен накапливать биомассу в краткосрочную вегетативную фазу в суровом континентальном климате Сибири с коротким засушливым летом, он морозоустойчив, устойчив к вредителям и заболеваниям, не нуждается в удобрении плантации во время вегетативной фазы – все это обещывает перспективность мискантуса в качестве легковозобновляемого лигноцеллюлозного сырья для переработки в суровых условиях сибирского климата [13, 26, 27]. Кроме того, проведенные в условиях лесостепи Западной Сибири исследования показывают, что освещенность местности произрастания не оказывает существенного влияния на качественный и количественный состав биомассы *M. sacchariflorus*: число побегов зависит не от экологических условий, а от возраста плантации, растения на полутенистых участках образовывали до 89,34% побегов в сравнении с растениями на освещенных участках, что не оказывало существенного влияния на величину надземной массы и содержание в ней целлюлозы [28].

Уже на сегодняшний день в мировой научной литературе описано множество способов приложения биомассы мискантуса как в качестве биоэнергоресурса, так и в качестве исходного сырья для получения широкого спектра продуктов, при этом предполагается использование либо нативной биомассы, либо подвергнутой предобработке различными способами.

В самом простом варианте мискантус высаживают на очистных сооружениях, вокруг промышленных предприятий и свалок, где они собирают загрязняющие вещества и тем самым делают более эффективным процесс очистки сточных вод, способствуют удалению из почвы загрязняющих веществ, например, тяжелых металлов [29]. В работе [30] приведены данные об эффективной ремедиации почвы, загрязненной нефтью, при выращивании на ней культуры *M. giganteus*. Солома мискантуса отличается хорошей впитывающей способностью, поэтому ее используют в качестве подстилки для сельскохозяйственных животных [31].

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИСКАНТУСА В БИОЭНЕРГЕТИКЕ

Если рассматривать энергетическое приложение мискантуса, то наиболее простым способом является производство топливных пеллет из мискантуса. Результаты исследований показывают, что пеллеты из мискантуса оказывают меньшее воздействие на окружающую среду по сравнению с древесными, в основном из-за меньшего потребления энергии во время гранулирования. В част-

ности, 1 т пеллет из мискантуса дает углеродный след 121,6 кг $\text{CO}_2\text{-экв}$, что примерно на 8% ниже по сравнению с древесными пеллетами [32]. Описан способ получения биоугля из мискантуса методом медленного пиролиза с последующей грануляцией [33]. В результате по расчетам общий углеродный след снизился на 737 кг $\text{CO}_2\text{-экв}$ /т высушенного сырья. При этом указывается, что полученный биоуголь, используемый в качестве добавки к почве, может значительно повысить ее характеристики: улучшается здоровье и плодородие, структура почвы, доступность питательных веществ, способность почвы удерживать воду, а также такая обработка способствует длительной сохранности углерода в почве. Связывание углерода в почвах можно рассматривать не только как стратегию смягчения глобального изменения климата, но и как источник прибыли для компаний через применение углеродных квот.

Еще одним перспективным направлением трансформации мискантуса в биотопливо является предварительная предобработка его биомассы с последующим метановым сбраживанием и, соответственно, получением биогаза на выходе [34]. Кроме того, поскольку биомасса мискантуса содержит значительное количество целлюлозы (порядка 50%), после предварительной обработки ее можно гидролизовать до раствора простых сахаров и посредством спиртового брожения получить биоэтанол [14, 35], который может быть использован в качестве энергосырьевой либо как прекурсор для дальнейших трансформаций, например, в этилен [36].

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОМАССЫ МИСКАНТУСА В СОСТАВЕ КОМПОЗИТОВ

Интересным и перспективным подходом к проблеме энергосбережения является разработка легких и прочных композитов для обеспечения теплоизоляции зданий и сооружений, поскольку значительное количество энергии расходуется на их отопление. Известно, что приблизительно 45% глобальных выбросов парниковых газов вызваны строительством и эксплуатацией зданий. Теплоизоляция зданий в современных условиях изменения климата является хорошо известной стратегией повышения их энергоэффективности. Разработка возобновляемого изоляционного материала может преодолеть недостатки широко используемых изоляционных систем на основе полистирола или минеральной ваты. В исследованиях [37] анализируется устойчивость и теплопроводность новых изоляционных материалов, изготовленных из волокон *M. giganteus*, пенообразователей и связующего вещества, активируемого щелочью. По результатам, опубликованным в последние годы, величина углеродного следа колеблется в широком диапазоне от 300 до 3300 кг $\text{CO}_2\text{-экв}$ /т. Общий углеродный след изоляционной системы на основе волокон мискантуса со свойствами, соответствующими действующим нормам теплоизоляции, достигает до 95% экономии выбросов CO_2 по срав-

нению с обычными системами. В другом исследовании предлагается использовать солому мискантуса в производстве легких бетонных блоков для применения в стеновых конструкциях [38]. Еще одной интересной разработкой является получение саморастущего биокомпозитного строительного изоляционного материала на основе *M. giganteus* и грибного мицелия [39]. Наилучшими свойствами характеризовалась композиция 0,3:1:0,1, состоящая из мицелия гриба *Ganoderma resinaceum*, волокон *M. giganteus* и картофельного крахмала. Установлено, что полученный новый композит обладает сравнительно лучшими свойствами, чем традиционные изоляционные материалы, и удовлетворяет большинству требований, предъявляемых к применению внутри помещений.

ФРАКЦИОННАЯ ПЕРЕРАБОТКА МИСКАНТУСА

Мискантус относится к целлюлозосодержащим сырьевым ресурсам, поэтому выделенная из него целлюлоза может быть использована для различных приложений. Целлюлозу мискантуса успешно используют в качестве компонента определенных видов бумаги для замены древесной целлюлозы [14, 40]. Наноцеллюлозу, полученную из целлюлозы мискантуса, вводят в состав бумаги для улучшения ее характеристик [41]. Целлюлоза, полученная из мискантуса, может быть использована в качестве прекурсора востребованных нитратов целлюлозы [1, 42].

Широчайшие перспективы представляет ферментативный гидролиз предварительно обработанной биомассы мискантуса для получения сахаросодержащих питательных сред с целью последующей микробной трансформации в высокоценные продукты, такие, например, как бактериальная целлюлоза [27, 43–45], или с целью извлечения из культуральной жидкости различных ферментов [46], в частности разработан способ непрерывной подачи лигноцеллюлозной биомассы, подвергнутой паровому взрыву, для индукции и производства целлюлазы из *Trichoderma reesei* RUT C30. Результаты экспериментов показали, что непрерывное введение лигноцеллюлозных индукторов приводило к более высокой активности продукции целлюлазы, чем периодическая и прерывисто-периодическая подкормка.

Кроме того, существуют исследования, позволяющие оценить не только перспективы использования продуктов ферментативного гидролиза мискантуса, но и варочных растворов, которые образуются после предварительной обработки биомассы: после обработки мискантуса разбавленными растворами азотной кислоты отработанный раствор, нейтрализованный гидратом аммония, применялся в качестве комбинированного лигногуминового удобрения. Была исследована рострегулирующая активность препарата на примере семян гороха посевного: установлено, что в диапазоне степени разведения от 1:100 до 1:10 000 наблюдается повышение энергии прорастания и

всхожести на 2–6% по сравнению с контролем и стимулируется рост корней на 21–29%, т. е. проявляется ауксиноподобное ростстимулирующее действие [47].

Мискантус также может быть вовлечен в различные проекты в рамках концепции глубокой переработки биомассы для получения ценных химических веществ, таких как гидроксиметилфурфурол, фурфурол, фенолы [48], этиленгликоль [49].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, можно сказать, что на сегодняшний день мискантус является одним из наиболее перспективных растительных объектов, который можно использовать в качестве исходного сырья для всевозможных хозяйственных приложений с тенденцией существенного сокращения углеродного следа:

– уже само выращивание данной культуры способно значительно повлиять на экологию местности произрастания – усиленный C_4 механизм фотосинтеза позволяет поглощать из атмосферы более высокие концентрации CO_2 по сравнению с растениями, в которых реализуется C_3 -фотосинтез. Для культивирования мискантуса подойдут бросовые земли, которые непригодны для выращивания других культурных растений. При этом мискантус не требует специальных агротехнических мероприятий, дает высокий урожай, который можно снимать много лет подряд, способствует накоплению органического вещества в почве, значительно уменьшая эмиссию CO_2 . Немаловажным свойством культуры является ее способность восстанавливать загрязненные тяжелыми металлами или нефтяными выбросами почвы;

– реализация потенциала мискантуса в энергетике в различных формах (от сжигания в виде топливных пеллет и биоугля до биотрансформации в биогаз и биоэтанол) приведет к значительному сокращению углеродного следа;

– чрезвычайно широки перспективы использования биомассы мискантуса в составе строительных композитов: полученные составы более легкие с пониженной теплопроводностью, что позволит сократить энергозатраты на отопление зданий и сооружений;

– биомассу мискантуса можно использовать в качестве исходного сырья для получения широкого круга высокоценных веществ: целлюлозы и ее нитратов, бумаги, этилена, гидроксиметилфурфурола, фурфурола, фенолов. Гидролизаты целлюлозной части биомассы мискантуса можно применять в биотехнологиях как основу питательных сред для биосинтеза бактериальной наноцеллюлозы и всевозможных ферментов.

Таким образом, целенаправленное культивирование и глубокая переработка биомассы мискантуса позволят достичь значительного сокращения углеродного следа, при этом существенно улучшить экологию планеты и снять напряженность в энергетической сфере.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Tang R., Xie M. Y., Li M., Cao L., Feng S., Li Z., et al. Nitrocellulose membrane for paper-based biosensor // *Applied Materials Today*. 2022. Vol. 26. P. 101305. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2021.101305>.
2. Gross R., Leach M., Bauen A. Progress in renewable energy // *Environment International*. 2003. Vol. 29, no. 1. P. 105–122. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(02\)00130-7](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(02)00130-7).
3. Holmatov B., Hoekstra A. Y., Krol M. S. Land, water and carbon footprints of circular bioenergy production systems // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2019. Vol. 111. P. 224–235. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.04.085>.
4. Vieira I. R. S., de Carvalho A. P. A., Conte-Junior C. A. Recent advances in biobased and biodegradable polymer nanocomposites, nanoparticles, and natural antioxidants for antibacterial and antioxidant food packaging applications // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2022. Vol. 21, no. 4. P. 3673–3716. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12990>.
5. Hassain A., Arif S. M., Aslam M. Emerging renewable energy technologies: state of the art // *Renewable and Sustainable Reviews*. 2017. Vol. 71. P. 12–28. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.033>.
6. Cintas O., Berndes G., Cowie A. L., Egnell G., Holmström H., Marland G., et al. Carbon balances of bioenergy systems using biomass from forests managed with long rotations: bridging the gap between stand and landscape assessments // *GCB Bioenergy*. 2017. Vol. 9, no. 7. P. 1238–1251. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12425>.
7. Kuna E., Behling R., Valange S., Chatel G., Colmenares J. C. Sonocatalysis: a potential sustainable pathway for the valorization of lignocellulosic biomass and derivatives // *Chemistry and Chemical Technologies in Waste Valorization*. 2017. P. 1–20. https://doi.org/10.1007/978-3-319-90653-9_1.
8. Vanneste J., Ennaert T., Vanhulsel A., Sels B. Unconventional pretreatment of lignocellulose with low-temperature plasma // *ChemSusChem*. 2017. Vol. 10, no. 1. P. 14–31. <https://doi.org/10.1002/cssc.201601381>.
9. Djordjevic L., Peric M., Dzoljic J. Carbon footprint of miscanthus biomass // *KNOWLEDGE-International Journal*. 2021. Vol. 49, no. 3. P. 481–485.
10. Tekin K., Karagöz S., Bektas S. A review of hydrothermal biomass processing // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2014. Vol. 40. P. 673–687. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.07.216>.
11. Gunnarsson I. B., Svensson S. E., Johansson E., Karakashev D., Angelidaki I. Potential of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) as a biorefinery crop // *Industrial Crops and Products*. 2014. Vol. 56. P. 231–240. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.01.024>.
12. Blätke M. A., Bräutigam A. Evolution of C₄ photosynthesis predicted by constraint-based modelling // *Elife*. 2019. Vol. 8. P. 49305. <https://doi.org/10.7554/eLife.49305>.
13. Капустянич С. Ю., Якименко В. Н. Мискантус – перспективная сырьевая, энергетическая и фитомелиоративная культура (литературный обзор) // *Почвы и окружающая среда*. 2020. Т. 3. N 3. С. 38–51. <https://doi.org/10.31251/pos.v3i3.126>.
14. Капустянич С. Ю., Якименко В. Н., Гисматулина Ю. А., Будаева В. В. Мискантус – перспективная энергетическая культура для промышленной переработки // *Экология и промышленность России*. 2021. Т. 25. N 3. С. 66–71. <https://doi.org/10.18412/1816-0395-2021-3-66-71>.
15. Lobell D. B., Burke M. B., Tebaldi C., Mastandrea M. D., Falcon W. P., Naylor R. L. Prioritizing climate change adaptation needs for food security in 2030 // *Science*. 2008. Vol. 319, no. 5863. P. 607–610. <https://doi.org/10.1126/science.1152339>.
16. Turner W., Greetham D., Mos M., Squance M., Kam J., Du C. Exploring the bioethanol production potential of Miscanthus Cultivars // *Applied Sciences*. 2021. Vol. 11, no. 21. P. 9949. <https://doi.org/10.3390/app11219949>.
17. Chandel H., Kumar P., Chandel A. K., Verma M. L. Biotechnological advances in biomass pretreatment for bio-renewable production through nanotechnological intervention // *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2022. P. 1–23. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02746-0>.
18. Heaton E. A., Long S. P., Voigt T. B., Jones M. B., Clifton-Brown J. Miscanthus for renewable energy generation: European union experience and projections for Illinois // *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*. 2004. Vol. 9, no. 4. P. 433–451. <https://doi.org/10.1023/B:MITI.0000038848.94134.be>.
19. Heaton E., Voigt T., Long S. P. A quantitative review comparing the yields of two candidate C₄ perennial biomass crops in relation to nitrogen, temperature and water // *Biomass and Bioenergy*. 2004. Vol. 27, no. 1. P. 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2003.10.005>.
20. Lewandowski J., Clifton-Brown J., Trindade L. M., vanderLinden G. C., Schwarz K.-U., Müller-Sämann K., et al. Progress on optimizing miscanthus biomass production for the European bioeconomy: results of the EU FP7 project OPTIMISC // *Frontiers in Plant Science*. 2016. Vol. 7. P. 1620. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01620>.
21. Анисимов А. А., Хохлов Н. Ф., Тараканов И. Г. Мискантус (*Miscanthus* spp.) в России: возможности и перспективы // *Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования*. 2016. N 12. С. 3–5.
22. Булаткин Г. А., Митенко Г. В., Гурьев И. Д. Энергетическая и экологическая эффективность выращивания растительной биомассы мискантуса китайского в ЦФО России // *Использование и охрана природных ресурсов в России*. 2015. N 6. С. 39–45.
23. Капустянич С. Ю., Лихенко И. Е., Данилова А. А. Продуктивность мискантуса сорта Сорановский первого года вегетации и дыхательная активность почвы // *Пермский аграрный вестник*. 2016. N 4. С. 82–87.

24. Wang C., Kong Y., Hu R., Zhou G. *Miscanthus*: a fast-growing crop for environmental remediation and biofuel production // GCB Bioenergy. 2021. Vol. 13, no. 1. P. 58–69. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12761>.
25. Arnoult S., Brancourt-Hulmel M. A review on *Miscanthus* biomass production and composition for bioenergy use: genotypic and environmental variability and implications for breeding // BioEnergy Research. 2015. Vol. 8, no. 2. P. 502–526. <https://doi.org/10.1007/s12155-014-9524-7>.
26. Гисматулина Ю. А., Будаева В. В., Сакович Г. В., Васильева О. Ю., Зуева Г. А., Гусар А. С. [и др.]. Особенности ресурсного вида *Miscanthus sacchariflorus* (Maxim.) Hack. при интродукции в Западной Сибири // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019. Т. 23. N 7. С. 933–940. <https://doi.org/10.18699/VJ19.569>.
27. Капустянчик 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>.
28. Дорогина О. В., Нуждина Н. С., Зуева Г. А., Гисматулина Ю. А., Васильева О. Ю. Особенности побегообразования в популяциях *Miscanthus Sacchariflorus* (Poaceae) под влиянием экологических факторов и паспортизация с помощью ISSR-маркеров // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2022. Т. 26. N 1. P. 22–29. <https://doi.org/10.18699/VJGB-22-04>.
29. Kowalczyk-Juško A., Mazur A., Pochwatka P., Janczak D., Dach J. Evaluation of the effects of using the giant *Miscanthus (Miscanthus giganteus)* biomass in various energy conversion processes // Energies. 2022. Vol. 15, no. 10. P. 3486. <https://doi.org/10.3390/en15103486>.
30. Nebeska D., Trögl J., Ševců A., Špánek R., Marková K., Davis L., et al. *Miscanthus giganteus* role in phytodegradation and changes in bacterial community of soil contaminated by petroleum industry // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2021. Vol. 224. P. 112630. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112630>.
31. Wolfzorn J., Harding D., Davis A., Santiago M., Porr C. *Miscanthus* and hemp as alternative bedding material for horses. In: Proceedings of the conference of the National Association of Equine Academics and the symposium of the Society for the Scientific Research of Equine. Asheville, North Carolina, 2019. Vol. 76. P. 97–98. <https://digitalcommons.murraystate.edu/orcagrants/45>.
32. Fusi A., Bacenetti J., Proto A. R., Tedesco D. E., Pessina D., Facchinetti D. Pellet production from *Miscanthus*: energy and environmental assessment // Energies. 2020. Vol. 14, no. 1. P. 73. <https://doi.org/10.3390/en14010073>.
33. Bartocci P., Bidini G., Saputo P., Fantozzi F. Biochar pellet carbon footprint // Chemical Engineering Transactions. 2016. Vol. 50. P. 217–222. <https://doi.org/10.3303/CET1650037>.
34. Thomas H. L., Arnoult S., Brancourt-Hulmel M., Carrère H. Methane production variability according to *Miscanthus* genotype and alkaline pretreatments at high solid content // BioEnergy Research. 2019. Vol. 12, no. 2. P. 325–337. <https://doi.org/10.1007/s12155-018-9957-5>.
35. Скиба Е. А., Миронова Г. Ф. Преимущества совмещения биокаталических стадий в синтезе биоэтанола из целлюлозосодержащего сырья // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2016. Т. 6. N 4. С. 53–60. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2016-6-4-53-60>.
36. Skiba E. A., Ovchinnikova E. V., Budaeva V. V., Banzaraktseva S. P., Kovgan M. A., Chumachenko V. A., et al. *Miscanthus* bioprocessing using HNO₃-pretreatment to improve productivity and quality of bioethanol and downstream ethylene // Industrial Crops and Products. 2022. Vol. 177. P. 114448. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114448>.
37. Witzleben S. Minimizing the global warming potential with geopolymer-based insulation material with *Miscanthus* fiber // Polymers. 2022. Vol. 14, no. 15. P. 3191. <https://doi.org/10.3390/polym14153191>.
38. Ntimugura F., Vinai R., Harper A. B., Walker P. Environmental performance of *Miscanthus*-lime lightweight concrete using life cycle assessment: application in external wall assemblies // Sustainable Materials and Technologies. 2021. Vol. 28. P. e00253. <https://doi.org/10.1016/j.susmat.2021.e00253>.
39. Dias P. P., Jayasinghe L. B., Waldmann D. Investigation of Mycelium-*Miscanthus* composites as building insulation material // Results in Materials. 2021. Vol. 10. P. 100189. <https://doi.org/10.1016/j.rinma.2021.100189>.
40. Tsalagkas D., Börcsök Z., Páztory Z., Gogate P., Csóka L. Assessment of the papermaking potential of processed *Miscanthus giganteus* stalks using alkaline pre-treatment and hydrodynamic cavitation for delignification // Ultrasonics Sonochemistry. 2021. Vol. 72. P. 105462. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105462>.
41. Barbash V. A., Yashchenko O. V., Vasylieva O. A. Preparation and application of nanocellulose from *Miscanthus giganteus* to improve the quality of paper for bags // SN Applied Sciences. 2020. Vol. 2, no. 4. P. 1–12. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-2529-2>.
42. Gismatulina Y. 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>.
43. 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>.
44. Son J., Lee K. H., Lee T., Kim H. S., Shin W. H., Oh J. M., et al. Enhanced production of bacterial cellulose from *Miscanthus* as Sustainable feedstock through statistical optimization of culture conditions // International Journal of Environmental Research and

Public Health. 2022. Vol. 19, no. 2. P. 866. <https://doi.org/10.3390/ijerph19020866>.

45. Гладышева Е. К., Голубев Д. С., Скиба Е. А. Исследование биосинтеза бактериальной наноцеллюлозы продуцентом *Medusomyces gisevii* Sa-12 на ферментативном гидролизате продукта щелочной делигнификации мискантуса // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2019. Т. 9. N 2. С. 260–269. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-2-260-269>.

46. Xiang J., Wang X., Sang T. Cellulase production from *Trichoderma reesei* RUT C30 induced by continuous feeding of steam-exploded *Miscanthus lutarioriparius* // Industrial Crops and Products. 2021. Vol. 160. P. 113129. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.113129>.

47. Скиба Е. А., Скиба М. А., Пятунина О. И. Рас-твор азотной кислоты после обработки мисканту-са как регулятор роста гороха посевного (*Pisum sativum* L.) // 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>.

48. Götz M., Rudi A., Heck R., Schultmann F., Kruse A. Processing Miscanthus to high-value chemicals: a techno-economic analysis based on process simulation // GCB Bioenergy. 2022. Vol. 14, no. 4. P. 447–462. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12923>.

49. Pang J., Zheng M., Wang A., Sun R., Wang H., Jiang Y., et al. Catalytic conversion of concentrated miscanthus in water for ethylene glycol production // AIChE Journal. 2014. Vol. 60, no. 6. P. 2254–2262. <https://doi.org/10.1002/aic.14406>.

REFERENCES

1. Tang R., Xie M. Y., Li M., Cao L., Feng S., Li Z., et al. Nitrocellulose membrane for paper-based bio-sensor. *Applied Materials Today*. 2022;26:101305. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2021.101305>.

2. Gross R., Leach M., Bauen A. Progress in renewable energy. *Environment International*. 2003;29(1):105-122. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(02\)00130-7](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(02)00130-7).

3. Holmatov B., Hoekstra A. Y., Krol M. S. Land, water and carbon footprints of circular bioenergy production systems. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2019;111:224-235. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.04.085>.

4. Vieira I. R. S., de Carvalho A. P. A., Conte-Junior C. A. Recent advances in biobased and biodegradable polymer nanocomposites, nanoparticles, and natural antioxidants for antibacterial and anti-oxidant food packaging applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2022;21(4):3673-3716. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12990>.

5. Hassain A., Arif S. M., Aslam M. Emerging renewable energy technologies: state of the art. *Renewable and Sustainable Reviews*. 2017;71:12-28. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.033>.

6. Cintas O., Berndes G., Cowie A. L., Egnell G., Holmström H., Marland G., et al. Carbon balances of bioenergy systems using biomass from forests managed with long rotations: bridging the gap between stand and landscape assessments. *GCB Bioenergy*. 2017;9(7):1238-1251. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12425>.

7. Kuna E., Behling R., Valange S., Chatel G., Colmenares J. C. Sonocatalysis: a potential sustainable pathway for the valorization of lignocellulosic biomass and derivatives. *Chemistry and Chemical Technologies in Waste Valorization*. 2017;1-20. https://doi.org/10.1007/978-3-319-90653-9_1.

8. Vanneste J., Ennaert T., Vanhulsel A., Sels B. Unconventional pretreatment of lignocellulose with low-temperature plasma. *ChemSusChem*. 2017;10(1):14-31. <https://doi.org/10.1002/cssc.201601381>.

9. Djordjevic L., Peric M., Dzoljic J. Carbon foot-

print of miscanthus biomass. *KNOWLEDGE-International Journal*. 2021;49(3):481-485.

10. Tekin K., Karagöz S., Bektas S. A review of hydrothermal biomass processing. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2014;40:673-687. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.07.216>.

11. Gunnarsson I. B., Svensson S. E., Johansson E., Karakashev D., Angelidaki I. Potential of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) as a biorefinery crop. *Industrial Crops and Products*. 2014;56:231-240. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.01.024>.

12. Blätke M. A., Bräutigam A. Evolution of C₄ photosynthesis predicted by constraint-based modelling. *Elife*. 2019;8:49305. <https://doi.org/10.7554/eLife.49305>.

13. Kapustyanchik S. Yu., Yakimenko V. N. Miscanthus is a promising raw material, energy and phytomeliorative crop (literature review). *Pochvy i okruzhayushchaya sreda = Soils and Environment*. 2020;3(3):38-51. (In Russian). <https://doi.org/10.31251/pos.v3i3.126>.

14. Kapustyanchik S. Yu., Yakimenko V. N., Gismatulina Yu. A., Budaeva V. V. Miscanthus is a promising energy crop for industrial processing. *Ekologiya i promyshlennost' Rossii = Ecology and Industry of Russia*. 2021;25(3):66-71. (In Russian). <https://doi.org/10.18412/1816-0395-2021-3-66-71>.

15. Lobell D. B., Burke M. B., Tebaldi C., Mas-trandrea M. D., Falcon W. P., Naylor R. L. Prioritizing climate change adaptation needs for food security in 2030. *Science*. 2008;319(5863):607-610. <https://doi.org/10.1126/science.1152339>.

16. Turner W., Greetham D., Mos M., Squance M., Kam J., Du C. Exploring the bioethanol production potential of Miscanthus Cultivars. *Applied Sciences*. 2021;11(21):9949. <https://doi.org/10.3390/app11219949>.

17. Chandel H., Kumar P., Chandel A. K., Verma M. L. Biotechnological advances in biomass pretreatment for bio-renewable production through nanotechnological intervention. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2022;1-23. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02746-0>.

18. Heaton E. A., Long S. P., Voigt T. B., Jones M. B., Clifton-Brown J. Miscanthus for renewable energy generation: European union experience and projections for Illinois. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*. 2004;9(4):433-451. <https://doi.org/10.1023/B:MITI.0000038848.94134.be>.
19. Heaton E., Voigt T., Long S. P. A quantitative review comparing the yields of two candidate C₄ perennial biomass crops in relation to nitrogen, temperature and water. *Biomass and Bioenergy*. 2004;27(1):21-30. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2003.10.005>.
20. Lewandowski L., Clifton-Brown J., Trindade L. M., van der Linden G. C., Schwarz K.-U., Müller-Sämann K., et al. Progress on optimizing miscanthus biomass production for the European bioeconomy: results of the EU FP7 project OPTIMISC. *Frontiers in Plant Science*. 2016;7:1620. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01620>.
21. Anisimov A. A., Hohlov N. F., Tarakanov I. G. Miscanthus (*Miscanthus* spp.) in Russia: opportunities and prospects. *Novye i netradicionnye rasteniya i perspektivy ih ispol'zovaniya*. 2016;(12):3-5. (In Russian).
22. Bulatkin G. A., Mitenko G. V., Gur'ev I. D. Energy and ecological efficiency of growing plant biomass of chinese Miscanthus in the Central Federal District of Russia. *Ispol'zovanie i ohrana prirodnih resursov v Rossii*. 2015;(6):39-45. (In Russian).
23. Kapustyanchik S. Yu., Lihenko I. E., Danilova A. A. Productivity of Miscanthus cultivar Soranovsky in the first year of vegetation and soil respiration activity. *Permskij agrarnyj vestnik = Perm Agrarian Journal*. 2016;(4):82-87. (In Russian).
24. Wang C., Kong Y., Hu R., Zhou G. *Miscanthus*: a fast-growing crop for environmental remediation and biofuel production. *GCB Bioenergy*. 2021;13(1):58-69. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12761>.
25. Arnoult S., Brancourt-Hulmel M. A review on Miscanthus biomass production and composition for bioenergy use: genotypic and environmental variability and implications for breeding. *BioEnergy Research*. 2015;8(2):502-526. <https://doi.org/10.1007/s12155-014-9524-7>.
26. Gismatulina Yu. A., Budaeva V. V., Sakovich G. V., Vasil'eva O. Yu., Zueva G. A., Gusar A. S., et al. Features of the resource species *Miscanthus sacchariflorus* (Maxim.) Hack. when introduced in Western Siberia. *Vavilovskij zhurnal genetiki i selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(7):933-940. (In Russian). <https://doi.org/10.18699/VJ19.569>.
27. Kapustyanchik S. Yu., Pocoluev O. M., Galicyng G. Yu., Lihenko I. E., Budaeva V. V., Gismatulina Yu. A., et al. Ecological and biological assessment of a promising industrial crop *Miscanthus sacchariflorus*. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK = Achievements of Science and Technology of the Agro-Industrial Complex*. 2020;34(1):42-46. (In Russian). <https://doi.org/10.24411/0235-2451-2020-10108>.
28. Dorogina O. V., Nuzhdina N. S., Zueva G. A., Gismatulina Yu. A., Vasil'eva O. Yu. Features of shoot formation in populations of *Miscanthus Sacchariflorus* (Poaceae) under the influence of environmental factors and certification using ISSR markers. *Vavilovskij zhurnal genetiki i selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(1):22-29. (In Russian). <https://doi.org/10.18699/VJGB-22-04>.
29. Kowalczyk-Juško A., Mazur A., Pochwatka P., Janczak D., Dach J. Evaluation of the effects of using the giant Miscanthus (*Miscanthus giganteus*) biomass in various energy conversion processes. *Energies*. 2022;15(10):3486. <https://doi.org/10.3390/en15103486>.
30. Nebeska D., Trögl J., Ševců A., Špánek R., Marková K., Davis L., et al. *Miscanthus giganteus* role in phytodegradation and changes in bacterial community of soil contaminated by petroleum industry. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2021;224:112630. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112630>.
31. Wolfzorn J., Harding D., Davis A., Santiago M., Porr C. Miscanthus and hemp as alternative bedding material for horses. In: *Proceedings of the conference of the National Association of Equine Academics and the symposium of the Society for the Scientific Research of Equine*. Asheville, North Carolina; 2019, vol. 76, p. 97-98. <https://digitalcommons.murraystate.edu/orcagrants/45>.
32. Fusi A., Bacenetti J., Proto A. R., Tedesco D. E., Pessina D., Facchinetti D. Pellet production from Miscanthus: energy and environmental assessment. *Energies*. 2020;14(1):73. <https://doi.org/10.3390/en14010073>.
33. Bartocci P., Bidini G., Saputo P., Fantozzi F. Biochar pellet carbon footprint. *Chemical Engineering Transactions*. 2016;50:217-222. <https://doi.org/10.3303/CET1650037>.
34. Thomas H. L., Arnoult S., Brancourt-Hulmel M., Carrère H. Methane production variability according to miscanthus genotype and alkaline pretreatments at high solid content. *BioEnergy Research*. 2019;12(2):325-337. <https://doi.org/10.1007/s12155-018-9957-5>.
35. Skiba E. A., Mironova G. F. Advantages of combining biocatalytic stages in the synthesis of bioethanol from cellulose-containing raw materials. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2016;6(4):53-60. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2016-6-4-53-60>.
36. Skiba E. A., Ovchinnikova E. V., Budaeva V. V., Banzaraksaeva S. P., Kovgan M. A., Chumachenko V. A., et al. Miscanthus bioprocessing using HNO₃-pretreatment to improve productivity and quality of bioethanol and downstream ethylene. *Industrial Crops and Products*. 2022;177:114448. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114448>.
37. Witzleben S. Minimizing the global warming potential with geopolymer-based insulation material with Miscanthus fiber. *Polymers*. 2022;14(15):3191. <https://doi.org/10.3390/polym14153191>.
38. Ntimugura F., Vinai R., Harper A. B., Walker P. Environmental performance of miscanthus-lime lightweight concrete using life cycle assessment: application in external wall assemblies. *Sustainable Materials and Technologies*. 2021;28:e00253. <https://doi.org/10.1016/j.susmat.2021.e00253>.

39. Dias P. P., Jayasinghe L. B., Waldmann D. Investigation of Mycelium-Miscanthus composites as building insulation material. *Results in Materials*. 2021;10:100189. <https://doi.org/10.1016/j.rinma.2021.100189>.
40. Tsalagkas D., Börcsök Z., Pásztor Z., Gogate P., Csóka L. Assessment of the papermaking potential of processed *Miscanthus giganteus* stalks using alkaline pre-treatment and hydrodynamic cavitation for delignification. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2021;72:105462. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105462>.
41. Barbash V. A., Yashchenko O. V., Vasylieva O. A. Preparation and application of nanocellulose from *Miscanthus giganteus* to improve the quality of paper for bags. *SN Applied Sciences*. 2020;2(4):1-12. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-2529-2>.
42. Gismatulina Y. A., Budaeva V. V. 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>.
43. 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;252:117178. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117178>.
44. Son J., Lee K. H., Lee T., Kim H. S., Shin W. H., Oh J. M., et al. Enhanced production of bacterial cellulose from Miscanthus as Sustainable feedstock through statistical optimization of culture conditions. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2022;19(2):866. <https://doi.org/10.3390/ijerph19020866>.
45. Gladysheva E. K., Golubev D. S., Skiba E. A. Investigation of bacterial nanocellulose biosynthesis by *Medusomyces gisevii* Sa-12 from enzymatic hydrolyzate obtained by alkaline delignification of miscanthus. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2019;9(2):260-269. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-2-260-269>.
46. Xiang J., Wang X., Sang T. Cellulase production from *Trichoderma reesei* RUT C30 induced by continuous feeding of steam-exploded *Miscanthus lutarioriparius*. *Industrial Crops and Products*. 2021;160:113129. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.113129>.
47. 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.). *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>.
48. Götz M., Rudi A., Heck R., Schultmann F., Kruse A. Processing Miscanthus to high-value chemicals: a techno-economic analysis based on process simulation. *GCB Bioenergy*. 2022;14(4):447-462. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12923>.
49. Pang J., Zheng M., Wang A., Sun R., Wang H., Jiang Y., et al. Catalytic conversion of concentrated miscanthus in water for ethylene glycol production. *AIChE Journal*. 2014;60(6):2254-2262. <https://doi.org/10.1002/aic.14406>.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Н. А. Шавыркина,
к.т.н., доцент, старший научный сотрудник,
Институт проблем химико-энергетических
технологий СО РАН,
659322, г. Бийск, ул. Социалистическая, 1,
Российская Федерация,
32nadina@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5572-1476>

Ю. А. Гисматулина,
к.т.н., старший научный сотрудник,
Институт проблем химико-энергетических
технологий СО РАН,
659322, г. Бийск, ул. Социалистическая, 1,
Российская Федерация,
julja.gismatulina@rambler.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5480-7449>

В. В. Будаева,
к.х.н., доцент, ведущий научный сотрудник,
Институт проблем химико-энергетических
технологий СО РАН,

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Nadezhda A. Shavyrkina,
Cand. Sci. (Engineering), Associate Professor,
Senior Researcher,
Institute for Problems of Chemical and Energetic
Technologies SB RAS,
1, Sotsialisticheskaya St., 659322, Biysk,
Russian Federation,
32nadina@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5572-1476>

Yuliya A. Gismatulina,
Cand. Sci. (Engineering), Senior Researcher,
Institute for Problems of Chemical and Energetic
Technologies SB RAS,
1, Sotsialisticheskaya St., 659322, Biysk,
Russian Federation,
julja.gismatulina@rambler.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5480-7449>

Vera V. Budaeva,
Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Leading Researcher,
Institute for Problems of Chemical and Energetic

659322, г. Бийск, ул. Социалистическая, 1,
Российская Федерация,
budaeva@ipcet.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1628-0815>

Technologies SB RAS,
1, Sotsialisticheskaya St., 659322, Biysk,
Russian Federation,
budaeva@ipcet.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1628-0815>

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.*

Информация о статье

*Поступила в редакцию 15.06.2022.
Одобрена после рецензирования 14.09.2022.
Принята к публикации 15.09.2022.*

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.*

Information about the article

*The article was submitted 15.06.2022.
Approved after reviewing 14.09.2022.
Accepted for publication 15.09.2022.*

Original article

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-394-405>



Influence of endophytic and epiphytic nitrogen-fixing bacteria on the content of negative allelopathic compounds in root exudates of pea (*Pisum sativum* L.) seedlings

Lyudmila E. Makarova*, Irina G. Petrova*, Natalia A. Sokolova*,
Sviatoslav S. Makarov**, Vladimir A. Pionkevich**

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

**Irkutsk National Research Technical University, Irkutsk, Russian Federation

Corresponding author: Lyudmila E. Makarova, makarova@sifibr.irk.ru

Abstract. Substances that have a harmful effect on living organisms include N-phenyl-2-naphthylamine and phthalates, which are synthesized and widely used in the chemical industry. At the same time, N-phenyl-2-naphthylamine was found in the aerial parts and in the roots of some plant species, phthalates were found in many plant species and in bacteria. The aim of this research was to study the protective (antimicrobial) reaction of pea (*Pisum sativum* L.) seedlings of the Torsdag variety to the inoculation with bacteria *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (endosymbiont) and *Azotobacter chroococcum* (ectosymbiont) introduced into the aqueous medium of root growth were studied. Changes in the content of negative allelopathic compounds (pisatin, N-phenyl-2-naphthylamine, phthalates) in root exudates were the reaction indicators. After the inoculation, the seedlings grew for 24 h in the BINDER KBW-240 chamber at 21 °C, with lighting of 81 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ and a 16/8 h day/night photoperiod. In ethyl acetate extracts from the aqueous medium where the seedling roots were immersed, the content of the compounds was determined by HPLC, while changes in the composition and ratio of phthalates were determined by GC-MS. Data indicating the different ability of both bacterial species to degrade N-phenyl-2-naphthylamine to phthalates and the dependence of this process activity in the bacteria studied on its concentration in the medium were presented. N-phenyl-2-naphthylamine differently but negatively affected the viability and growth of the bacteria used in the experiments. A different effect of rhizobia and azotobacter on the content of the above named compounds and on the ratio of types of phthalates in root exudates was elicited.

Keywords: *Pisum sativum* L., root exudates, *Rhizobium*, *Azotobacter*, pisatin, N-phenyl-2-naphthylamine, phthalates

Acknowledgements. The authors express their deep gratitude to the research member of Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, PhD A. S. Moritz, I. S. Kapustina for his technical assistance. Analytical work was performed with the equipment of the Common Use Center "Bioanalytics" of Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS (Irkutsk).

For citation: Makarova L. E., Petrova I. G., Sokolova N. A., Makarov S. S., Pionkevich V. A. Influence of endophytic and epiphytic nitrogen-fixing bacteria on the content of negative allelopathic compounds in root exudates of pea (*Pisum sativum* L.) seedlings. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya* = *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2022;12(3):394-405. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-394-405>.

Влияние эндофитных и эпифитных азотфиксирующих бактерий на содержание негативных аллелопатических соединений в корневых экссудатах проростков гороха (*Pisum sativum* L.)

Людмила Евгеньевна Макарова*, Ирина Георгиевна Петрова*,
Наталья Александровна Соколова*, Святослав Станиславович Макаров**,
Владимир Андреевич Пионкевич**

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

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

Автор, ответственный за переписку: Макарова Людмила Евгеньевна, makarova@sifibr.irk.ru

Аннотация. К веществам, оказывающим вредное воздействие на живые организмы, относятся *N*-фенил-2-нафтиламин и фталаты, которые синтезируются и широко используются в химической промышленности. В то же время *N*-фенил-2-нафтиламин был обнаружен в надземных частях и в корнях некоторых видов растений, фталаты были найдены во многих видах растений и в бактериях. Исследование направлено на изучение защитной (антимикробной) реакции проростков гороха (*Pisum sativum* L.) сорта Торсдаг на инокуляцию бактериями *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* (эндосимбионт) и *Azotobacter chroococcum* (эктосимбионт), вносимыми в водную среду роста корней. Показателями реакции были изменения содержания негативных аллелопатических соединений (пизатин, *N*-фенил-2-нафтиламин, фталаты) в корневых экссудатах. После инокуляции проростки росли одни сутки в камере BINDER KBW-240 при температуре 21 °С, освещении 81 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{c}^{-1}$ и фотопериоде 16/8 ч (день/ночь). В этилацетатных экстрактах из водной среды, куда погружали корни проростков, содержание соединений определяли методом ВЭЖХ, а изменения в составе и соотношении фталатов – методом ГХ-МС. Установлено различное влияние ризобий и азотобактера на содержание вышеперечисленных соединений и на соотношения видов фталатов в корневых экссудатах. Представлены данные, указывающие на разную способность обоих видов бактерий деградировать *N*-фенил-2-нафтиламин до фталатов и на зависимость активности данного процесса у исследуемых бактерий от его концентрации в среде. *N*-фенил-2-нафтиламин по-разному, но негативно влиял на жизнеспособность и рост использованных в экспериментах бактерий.

Ключевые слова: *Pisum sativum* L., корневые экссудаты, *Rhizobium*, *Azotobacter*, пизатин, *N*-фенил-2-нафтиламин, фталаты

Благодарности. Авторы выражают глубокую признательность научному сотруднику Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН, к.т.н. А. С. Морицу, а также И. С. Капустину за техническую помощь. Аналитическая работа выполнена на оборудовании ЦКП «Биоаналитика» Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск).

Для цитирования: Макарова Л. Е., Петрова И. Г., Соколова Н. А., Макаров С. С., Пионкевич В. А. Влияние эндофитных и эпифитных азотфиксирующих бактерий на содержание негативных аллелопатических соединений в корневых экссудатах проростков гороха (*Pisum sativum* L.) // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2022. Т. 12. N 3. С. 394–405. (In English). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-394-405>.

INTRODUCTION

N-phenyl-2-naphthylamine and phthalates are well known compounds, synthesized in chemical industry. These chemicals are known to be toxic for living organisms. At the same time *N*-phenyl-2-naphthylamine was found in plants [1–4], phthalates were found both in plants and bacteria [4, 5].

N-phenyl-2-naphthylamine and phthalates can inhibit bacterial growth [6, 7], apparently similar

to phytoalexins [8]. At the same time, bacteria can catabolize *N*-phenyl-2-naphthylamine with the formation of phthalates [6, 9], which, probably, with the predominant formation of phthalates of negative action by bacteria of certain species, is important in the competitive interaction between bacteria of the soil microbiome [10]. The foregoing suggests that *N*-phenyl-2-naphthylamine and phthalates found in the root exudates of legumes [4] act as regulators of the bac-

terial concentration and composition in the root zone of these plants. Changes in the content of these compounds in root exudates may be due to the effect of biotic and abiotic factors on plants [10].

Soil microorganisms, including intracellular, endophytic and epiphytic nitrogen fixers, are known to play a special role in supplying plants with nitrogen [11]. Bacteria that settle in root and stem nodules developing in plants are characterized by higher nitrogen fixation efficiency. It is believed that rhizospheric free-living nitrogen-fixing bacteria genera *Azotobacter*, *Azospirillum*, and *Bacillus* serve as possible suppliers of nitrogen compounds available for a legume plant that are necessary at early stages of the formation of nodule nitrogen-fixing structures [12].

According to the research results [13], the combined effect of bacteria genera *Rhizobium* and *Azotobacter* on a legume plant is useful for its growth. It was shown that the free-living bacteria *Azotobacter chroococcum*, in common with rhizobia, can cause protective reactions in root cells of legume plants in the initial periods after inoculation. The reactions can be even more noticeable than nodule bacteria.

Protective reactions of plants in response to the introduction of infection appear not only at the level of cells of their organs. They also appear via the excretion of components with antimicrobial effects by their root cells into the root zone. The substances of acts of that nature include compounds with different structures. First of all, they include phytoalexins, which differ in chemical structure not only in different plant genera, but also in species of the same genus [14]. These compounds are intensely synthesized by plants not only when phytopathogens act on them. They are also intensely synthesized when bacteria entering into a mutualistic relationship with the plant act on them. Biotic stresses are one more reason for these compounds to be synthesized intensely [8, 15]. At high concentrations, a number of low-molecular-weight compounds synthesized by plants can also have antimicrobial effects. These compounds are called phytoanticipins [16]. Probably, phytoanticipins are aromatic compounds found in plant cells in their normal living conditions; they are highly accumulated in plant tissues under stress and are secreted by the plant into exudates. Cinnamyl phenols, 2'-methoxychalcone and isoflavonoids, which were found in tissues of pea plants under stress conditions, can be reckoned among such compounds [17]. Along with the phytoalexin pisatin, N-phenyl-2-naphthylamine and phthalates found in roots and root exudates of legume plants can be named among the compounds, which are synthesized in pea and other legume plants, and which have negative effects on soil microflora [4]. Currently, N-phenyl-2-naphthylamine and phthalates are considered as substances dangerous to living organ-

isms [18, 19]. The negative role of pisatin was also shown for certain plant species [20].

As a result of the set of our experiments [10], the dependence of the content of pisatin, N-phenyl-2-naphthylamine, and dibutyl phthalate in the root exudates of pea seedlings on the size of the root and on the type of effect on the roots by the bacteria have been studied. The influence of lighting conditions and temperature on the amount of N-phenyl-2-naphthylamine and phthalates, and the influence of temperature conditions on the composition of phthalates have been observed.

When considering the significance of the above compounds in the interaction between macro- and micropartners, their role as negative regulators of bacterial growth should be the first thing to be taken into account. As it was noted above, N-phenyl-2-naphthylamine and phthalates can inhibit the growth of bacteria entering into symbiotic relationships with pea plants. In the issue of the relationship of a legume plant with free-living nitrogen-fixing bacteria that do not penetrate its tissue, the participation of these compounds has not been studied yet. It is our belief that N-phenyl-2-naphthylamine and phthalates, together with pisatin, are potential candidates for controlling the growth of associative bacteria similarly, which can accumulate in the root zone of a pea plant together with endophytic bacteria.

The well-known characteristic of rhizobacteria (the ability to catabolize many aromatic compounds) can be important for determining the role of these compounds in relation to the bacterial microflora. That is, along with aromatic compounds secreted into the environment by the plant, their biodegradation products can well turn out to be modulation factors for metabolic processes in bacterial cells. In terms of determining the mechanism of the negative effect of one of the components of root exudates of legume plants N-phenyl-2-naphthylamine on bacteria, the feature of some species of soil bacteria to degrade it to phthalates and actively secrete the latter to the environment may cause interest [6, 7]. Thus bacteria can contribute to changes in the concentration of N-phenyl-2-naphthylamine and the quantitative ratio in the composition of phthalates in the root zone of a plant.

The aim of this research was to compare the protective (antimicrobial) reaction of pea seedlings, which appears at the rhizosphere level in the initial periods of infection of their roots with nitrogen-fixing bacteria *R. leguminosarum* bv. *viceae* and *Azotobacter chroococcum*, different in their specificity of relations with pea plants (endosymbiont-mutualist and free-living bacteria). For this purpose, changes in the content of probable negative regulators of reproduction of both bacterial species (pisatin, N-phenyl-2-naphthylamine, and phthalates) were studied in the root exudates of pea seedlings 24 h after the inoculation with the bacteria.

EXPERIMENTAL SECTION

Research objects. Pea (*Pisum sativum* L.) seedlings of the Torsdag variety and bacteria *R. legumi-nosarum* bv. *viceae* (strain RCAM1022, obtained from the All-Russian Research Institute of Agricultural Microbiology, Pushkin, Russia) and *Azotobacter chroococcum* (strain Az d10 VKM B-2272 D from the collection of the Collective Use Center "Bioresource Center" of Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Irkutsk, Russia) were the research objects.

Plant material. Pea seeds were decontaminated by washing with tap water and soap, followed by treatment with a 3% hydrogen peroxide solution. Seed germination and seedling growth took place for 48 h on sterile filter paper moistened with tap water, in a thermostat at 21 °C, without lighting. Further growth of seedlings took place in the BINDER KBW-240 chamber at 21 °C, with lighting of 81 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$, and a 16/8 h photoperiod (day/night) for 24 h. It was performed after immersing the roots of the seedlings in aqueous solutions containing microelements [10]; the solutions were poured into glass vessels with the outer surface darkened with a light-tight film. The volume of the solution in the vessels was 250 ml; the number of seedlings per 1 vessel was 36. The average sizes of the roots of the initial seedlings were 35–38 mm in length; at the end of the experiment they were 45–50 mm long. To inoculate plants, the bacterial culture was introduced into the aqueous medium in the form of an aqueous wash off from a solid agar medium to a concentration of 4.0×10^5 cells/ml. The inoculation was carried out simultaneously with the placement of the roots of the seedlings in the aqueous medium. Same-aged uninoculated seedlings served as control.

Cultures of bacteria. When growing on solid agarized media, they were prepared according to the previously accepted scheme [4] for nodule bacteria; they were prepared according to Ashby for associative bacteria. Planktonic cultures of bacteria used to obtain growth indicators and to study the degradation products of N-phenyl-2-naphthylamine were grown in a minimal liquid medium. The medium was prepared in the way described in the research, but glucose was used as a carbohydrate food source for bacteria [6]. After the preliminary 24 h adaptation in the indicated medium, the bacteria were grown in the presence of 10 or 100 μM N-phenyl-2-naphthylamine (commercial preparation, Sigma, USA) for 24–48 h in flasks in a rotatory shaker at 20–22 °C in the dark. The bacterial titer in the media was 1.5×10^3 cell/mL at the start of the experiments in which N-PNA degradation was analyzed; it was 4.5×10^3 cells/mL at the start of the experiments studying the effects of N-phenyl-2-naphthylamine on the bacterial growth. The bacterial titer was determined by the optical density

of the bacteria-containing media measured in the Im-munochem-2100 plate spectrophotometer at 675 nm (High Technology Inc., United States).

Study of the effect of N-phenyl-2-naphthylamine on the growth of the bacteria. The growth of the bacteria in the presence of 10 or 100 μM N-phenyl-2-naphthylamine, which was carried out in flasks with a minimal liquid medium, prepared according to [21] was controlled by the colonies of forming units (CFUs) indices. To calculate the number of CFUs, a bacterial suspension from the 1- and 2-day culture media was plated onto solid agarized media, the preparation methods of which are named above.

The bacterial titer in the media was 4.5×10^3 cells/mL at the start of the experiments studying the effects on the bacterial growth. The bacterial titer was determined by the optical density of bacterial-containing media, as described above.

Preparation of extracts with allelopathic substances from root exudates and culture media. Phenolic compounds of the root exudates were extracted from the aqueous medium (into which the roots of the seedlings had been previously immersed) after the acidification with HCl solution to pH 3.0. Three-stage extraction was carried out using ethyl acetate (1:1, v/v), which was then evaporated with a cold air stream in the dark. The dry residue was dissolved in 1.0 ml of methanol. The compounds contained in the methanol extract were studied by HPLC. After that, the 0.8 ml from remaining part of the same extract was evaporated in a vacuum until the removal of methanol, the residue was re-dissolved into ethyl acetate and after silylation (BSA + GMDS) by GC-MS analysis, the composition of phthalates was studied in it.

Before the extracts from the culture media containing aromatic products of N-phenyl-2-naphthylamine degradation were obtained, the grown culture was centrifuged at 8000 g for 20 min at 4 °C using a centrifuge of the Avanti J-26 XP JLA model (Beckman Coulter, USA). The aromatic compounds were extracted from the supernatant with ethyl acetate in the way described above. The obtained extracts were vacuum-evaporated in the dark to small volumes for conducting GC-MS analysis of the compounds present in them without prior silylation. In all cases, extracts (methanol and ethyl acetate) were placed in glass vials.

Determination of the content of allelopathic compounds by HPLC. The content of pisatin, N-phenyl-2-naphthylamine, and dibutyl phthalate was determined by HPLC using the Shimadzu LC-10ATvp chromatograph with a UV detector (Shimadzu, Japan). The compounds in the adsorption profiles were identified by the retention time of taps, which was confirmed by UV spectra obtained in a stopped eluent flow for taps and for the substances under study. Authentic samples of N-phenyl-2-naphthylamine

(Sigma, USA), dibutyl phthalate (Reachim, Russia), and pisatin, which had been kindly provided earlier by Prof. H. D. VanEtten (Department of Plant Sciences, University of Arizona, United States), were used to identify and construct calibration curves. The phenolic components contained in the extracts were separated on a Perfect Bond column (250×4.6 mm, 5 μm) (MZ Analisentechnik, Germany) in an increasing A:B gradient from 30 to 90% for 80 min at a rate of 0.5 mL/min (A—acetonitrile and B—0.2 N Li perchlorate in 0.1% aqueous solution of trifluoroacetic acid, pH 4.0). The compounds were detected at 280 nm. The calculations were based on adsorption profiles of peak heights with the calibration curves constructed for different N-PNA concentrations of the compounds studied. R-squared values (R^2) were: 0.96 for N-phenyl-2-naphthylamine, 0.98 for dibutyl phthalate, 0.99 for ethyl phthalate and 0.99 for pisatin.

Study of the composition of aromatic compounds in extracts by GC-MS analysis. The composition of aromatic compounds in extracts was analyzed in the 7000 QQQ Triple Quad/7890A MSD/DS GC/MS (Agilent Technology, USA). The injected sample volume was 0.2 μL. The evaporator temperature was 250 °C, the ion source temperature was 230 °C, the detector temperature was 150 °C, and the temperature of the transfer line between the gas chromatograph and mass spectrometer was 280 °C. The scanning range was between 50 and 600 Da. The capillary column was HP-5MS (30 m×0.250 mm×0.50 μm); the stationary phase was (5% phenyl) methylpolysiloxane. The temperature gradient was from 100 to 280 °C at the rate of 5 °C/min, 2 min at 280 °C, and then from 280 to 340 °C at the rate of 5 °C/min. The mobile phase was helium, and the gas-flow rate was 1 mL/min. The current flow division mode was 5:1. The electron ionization mode had ionization energy of 70 eV. The analysis was performed in total ion current registration mode (SCAN). The NIST08 and WILEY7 mass-spectra libraries, along with the comparison with the authentic dibutyl phthalate (Reakhim, Russia), bis(2-ethylhexyl) phthalate (synonymous to dioctyl phthalate), and diethyl phthalate (Sigma Aldrich, Germany) samples, were used to identify the analyzed compounds.

Statistics. The results obtained were statistically processed; the Figures and Tables show the mean values and their standard deviations obtained from three independent experiments.

RESULTS AND DISCUSSION

When comparing the data obtained by HPLC for the control plants and ones inoculated with *R. leguminosarum* *bv. viceae* and *Azotobacter chroococcum*, a different character of the effect of the two bacterial species on the content of pisatin, N-phenyl-2-naphthylamine, diethyl phthalate and dibutyl phthalate in

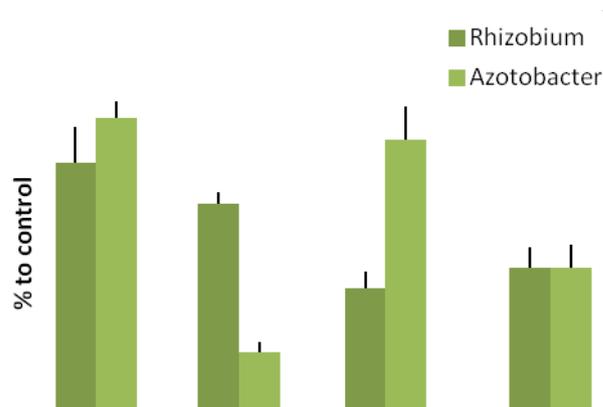


Fig. 1. Changes in the content of pisatin, N-phenyl-2-naphthylamine (N-PNA), diethyl phthalate (DEP) and dibutyl phthalate (DBP) in the pea seedling root growth medium after the addition of *Rhizobium leguminosarum* *bv. viceae* (Rhizobium), *Azotobacter chroococcum* (Azotobacter). Y-axis: % to control (control – seedlings not inoculated with bacteria)

Рис. 1. Изменение содержания пизатина, N-фенил-2-нафтиламина (N-PNA), диэтилфталата (DEP), дибутилфталата (DBP) в среде роста корней проростков гороха после внесения в нее *Rhizobium leguminosarum* *bv. viceae* (Rhizobium), *Azotobacter chroococcum* (Azotobacter). По оси ординат: % к контролю (контроль – неинокулированные бактериями проростки)

the root growth medium is observed (Fig. 1). The inoculation with *Rhizobium* contributed to an increase in the total content of the above listed negative allelopathic compounds; it happened mainly due to pisatin. As a result of the inoculation with *Azotobacter*, the content of N-phenyl-2-naphthylamine decreased by more than 10 times; the content of pisatin and dibutyl phthalate decreased by 1.2 and 1.4 times, respectively. In summation, the total number of these compounds per 1 seedling in the aqueous medium of root growth in the presence of rhizobia was 2.3 times higher than in the presence of azotobacter.

Four types of phthalates were identified in the root exudates of pea seedlings by GC-MS analysis: dibutyl phthalate, dioctyl phthalate, diethyl phthalate and butyl tetradecyl phthalate (Fig. 2).

According to the percentage of peak area values, dibutyl phthalate and dioctyl phthalate were almost equally dominant in the control plants and in those inoculated with rhizobia in their root growth medium. When inoculated with azotobacter, dioctyl phthalate predominated among the phthalates: its peak area was almost 2 times higher than those for dibutyl phthalate and diethyl phthalate. In plants of all growing options, the content of butyl-tetradecyl phthalate (an intermediate compound in the formation of diphthalates with the same hydrocarbon chains) was 3–6%.

The inoculation with *Rhizobium* was mentioned above to contribute to an increase in the total content of negative allelopathic compounds in the root growth

medium, which happened mainly due to pisatin (Fig. 1). This phytoalexin is synthesized in pea plant cells. Among the compounds analyzed, it is most studied by its antifungal and antibacterial characteristics, which are important for inter-relationships amongst organisms. In pea plants, increased accumulation of pisatin was observed under the influence of fungal and bacterial infections, as well as under the conditions of abiotic stress [8, 15, 16].

Pisatin can suppress bacteria genus *Rhizobium* that nodulate roots of legume plants [8, 22]. Different strains of *Rhizobium leguminosarum* show uneven susceptibility to pisatin. A decrease in susceptibility to pisatin in some representatives of fungal pathogens of legumes genus *Fusarium* was associated with their ability to degrade this compound [16]. Similar phenomena of pisatin degradation in bacteria have not been noted in the scientific literature, but there are some reasons to believe their existence in these microorganisms [22]. Within our research, a decrease in pisatin level in the growth medium of the roots of pea seedlings, which arose under the influence of *Azotobacter chroococcum*, indirectly indicates its degradation by bacteria, as compared with the control plants (Fig. 1).

As it was said above, when inoculated with *Azotobacter*, the total content of the studied substances with a negative effect in the root growth medium decreased mainly due to N-phenyl-2-naphthylamine. In case of the inoculation with *Rhizobium* and *Azotobacter*, we bind the difference in the content of this compound in the composition of root exudates to the uneven activity of this compound degradation in the cells of the same species of bacteria. We believe that, when inoculated with *Azotobacter*, a decrease in the content of N-phenyl-2-naphthylamine in the growth

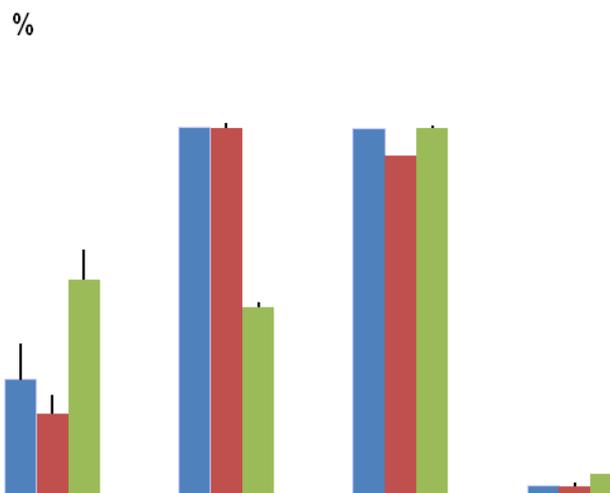


Fig. 2. The effect of bacteria on the ratio of phthalates in the root exudates of pea seedlings 1 day after inoculation. 1 – diethyl phthalate; 2 – dibutyl phthalate; 3 – dioctyl phthalate; 4 – butyl tetradecyl phthalate; Контроль – without bacteria, + *Rhizobium* and + *Azotobacter* – introduction of bacteria *R. leguminosarum* bv. *viciae* and *Azotobacter chroococcum*, respectively; S, % – relative area indicator for peaks in the chromatogram (GC-MS) for phthalates

Рис. 2. Влияние бактерий на соотношении фталатов в корневых экссудатах через одни сутки после инокуляции. 1 – диэтилфталат; 2 – дибутилфталат; 3 – диоктилфталат; 4 – бутилтетрадецилфталат. Контроль – рост без бактерий, + *Rhizobium* и + *Azotobacter* – инокуляция бактериями *R. leguminosarum* bv. *viciae* и *Azotobacter chroococcum* соответственно. S, % – относительная площадь для пиков фталатов на хроматограмме (ГХ-МС)

medium of the seedling roots occurred due to its active destruction in the cells of this bacterial species. The ability to catabolize N-phenyl-2-naphthylamine with the formation of phthalates was previously determined in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* [6].

The composition of the compounds in ethyl acetate extracts from the culture media of bacteria that grew 24 h with 10 µM or 48 h with 100 µM N-phenyl-2-naphthylamine

Состав соединений в этилацетатных экстрактах из культуральных сред с бактериями, росшими 24 ч с 10 µM или 48 ч с 100 µM N-фенил-2-нафтиламином

Compound	RT, min	Ver, %	S, %			
			10 µM		100 µM	
			<i>Rhizobium</i>	<i>Azotobacter</i>	<i>Rhizobium</i>	<i>Azotobacter</i>
Phthalic anhydride	8.0	50.5	0.32	-	0.4	-
Diethyl phthalate	14.1	35.5	-	8.4	1.3	2.6
Butyl octyl phthalate	19.9	11.8	-	3.3	-	-
Dibutyl phthalate	21.6	29.3	3.20	100.0	4.3	0.7
N-phenyl-2-naphthylamine	26.6	47.5	30.20	0.0	100.0	100.0
bis(2-ethylhexyl) phthalate (synonym, dioctyl phthalate)	31.7	71.5	100.00	57.7	0.6	-
bis(7-methyloctyl) phthalate (synonym, diisononyl phthalate)	35.0	65.9	1.20	-	-	-

Note. RT – retention time; Ver.; % – probability; S, % relative peak area. Mean S, % for three experiments are provided ± the standard deviations. *Rhizobium* – *R. leguminosarum* bv. *viciae*; *Azotobacter* – *Azotobacter chroococcum*.

In culture media containing 10 μM N-phenyl-2-naphthylamine, where *Azotobacter chroococcum* was added, the products of its degradation (phthalates) were also found [7]. The difference between the degrading ability of *Azotobacter* compared to *Rhizobium* (with respect to N-phenyl-2-naphthylamine explains the difference in their content in the root growth media under their influence (Tab.). According to Table it is also possible to observe a decrease in the activity of N-phenyl-2-naphthylamine degradation in the studied bacteria at its 100 μM concentration in the medium. This decrease is found when comparing the peak percentages for phthalates and for N-phenyl-2-naphthylamine introduced into the culture media at 10 and 100 μM , as well as when taking into account the different cultivation durations.

Differences in the catabolism activity of aromatic compounds in the compared bacterial species are most likely predetermined at the genetic level. According to the cited literature [23], the inducible synthesis of enzymes involved in the catabolism of these compounds is a characteristic feature of the biodegradation of this type of compounds for *Rhizobium*. The activity during the degradation of N-phenyl-2-naphthylamine in the strain Az d10 VKM B-2272 D of *Azotobacter chroococcum* used in our experiments is higher than that of rhizobia. It makes it possible to suggest that the synthesis of enzymes, which are necessary for the named compound biodegradation, is expressed constitutively in these bacteria. The constant presence of these enzymes in the cells of the above mentioned strain of *Azotobacter* explains its resistance to deltamethrin, one of the indicators which was followed during its selection [24].

The negative effect of N-phenyl-2-naphthylamine on the growth and the viability rhizospheric bacteria including the bacteria *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* is confirmed by the results of the research [4, 6]. The data presented in Fig. 3 show the different nature of the effect of the compound discussed on the growth of the bacteria *Rhizobium* and *Azotobacter*. When analyzing them, it is necessary to take into account the low content of carbohydrate food source for the bacterial growth in our experiments (see Methodology). This circumstance led to a decrease in their viability on the 2nd day of exposure [7]. The introduction of N-phenyl-2-naphthylamine into the culture medium further decreased the viability indices and they were decreased to a greater extent at 100 μM .

The same oligotrophic nutritional conditions affected the growth indices (CFU) of the control bacteria *Rhizobium* and *Azotobacter* differently. On the 1st day of the growth, the CFU index of *Azotobacter* was 2.5 times higher than that of *Rhizobium*. On the 2nd day of the exposure, this index was almost unchanged in *Azotobacter*, while it was more than 1.2 times lower in *Rhizobium* compared to the 1st day. Relative indices calculated with CFU (% of control,

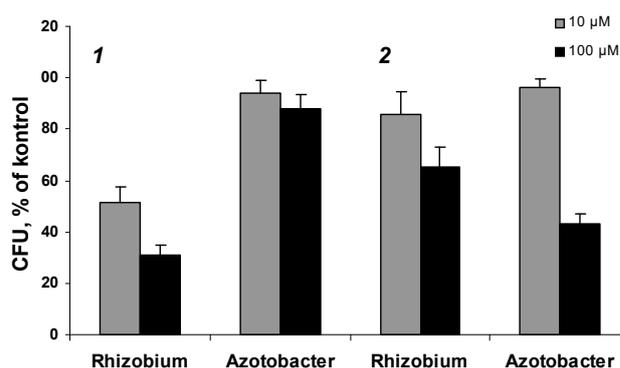


Fig. 3. Percentage of CFU relative to the control for bacteria grown in planktonic cultures without application (control) and with the addition of 10 and 100 μM N-phenyl-2-naphthylamine into the medium for 1(1) and 2(2) days. *Rhizobium* and *Azotobacter*, respectively, bacteria *R. leguminosarum* bv. *viciae* and *Azotobacter chroococcum*. CFU – the colonies of forming units

Рис. 3. Процент КОЕ относительно контроля для бактерий, выращенных в планктонной культуре без внесения (контроль) и с внесением 10 и 100 μM N-фенил-2-нафтиламина в среде за 1(1) и 2(2) суток. *Rhizobium* и *Azotobacter* соответственно бактерии *R. leguminosarum* bv. *viciae* и *Azotobacter chroococcum*. КОЕ – колониеобразующие единицы

see Fig. 3) allow us to trace the occurrence nature of the bacterial growth reaction to the action of 10 and 100 μM N-phenyl-2-naphthylamine during both periods of observation. The effect of N-phenyl-2-naphthylamine on the compared bacterial species differed in the degree of inhibition of their growth at different periods of exposure; it increased at 100 μM . On the 1st day of exposure, *Azotobacter* showed a weak negative reaction to the effect of both concentrations of N-phenyl-2-naphthylamine (differences in the effect of 10 and 100 μM were not significant). A significant suppression of their growth occurred on the 2nd day of the exposure only at 100 μM . The *Rhizobium* bacterial growth was inhibited by N-phenyl-2-naphthylamine to a greater extent on the 1st day; at 100 μM , the growth inhibition increased by about 20% in both periods of the exposure.

The research results make it possible to associate the increased inhibition of the bacterial growth at 100 μM (Fig. 3) with the catabolism inhibition of N phenyl-2-naphthylamine at the same concentration in the bacterial cells (Tab.). Probably, when the concentration of N phenyl-2-naphthylamine is high, its increased accumulation in the bacterial cells leads to the inhibition of their metabolic processes. The physico-chemical properties of the compound, such as high lipophilicity and high antioxidant activity [18, 25], can contribute to this process.

The third group of substances in the field of sight of our research is phthalates; they are also classified as antimicrobial substances. The results of studies that revealed the specific effects of phthalates as in-

hibitors of bacterial growth indicate the role of negative regulators in the plant rhizosphere for phthalates secreted by root cells into the environment [4, 9, 26]. The degree of the negative effect of phthalates was found to be determined not only according to their concentration in the medium, but according to the type of alkyl groups in their molecules linked to o-phthalic acid via the ester bond as well. The degree also depends on the species of bacteria experiencing the action of phthalates [19]. The research [9] demonstrated the ambiguous effect of phthalates on the growth of bacteria in planktonic culture and in biofilms. At the same time, many free-living microorganisms are able to use o-phthalic acid esters as a source of carbon and energy; that gives them certain selective advantages [27].

According to the data in Fig. 1 and 2, it is possible to trace the changes in the composition of phthalates, which arose under the effect of *Rhizobium* and *Azotobacter* in the growth medium of pea seedling roots, compared to the control. According to the comparison with the control plants, the inoculation with rhizobia led to a slight increase in the amount of dibutyl phthalate and a slight decrease in the percentage of dioctyl phthalate and diethyl phthalate. As affected by *azotobacter*, along with a decrease in the amount of dibutyl phthalate, the percentage ratio of the other three types of phthalates to this phthalate increased significantly. At the same time, dioctyl phthalate was dominant among the representatives of the group of substances under study. The data [9, 26, 28] demonstrated the antibacterial properties of dioctyl and diethyl phthalates. Taking the data into account, it can be assumed that with the changes in the composition of phthalates, *Azotobacter* grew the potential to increase their competitiveness.

Changes in the phthalate ratios in the growth medium of pea seedling roots as affected by the studied bacterial species can occur due to their possibility to degrade N-phenyl-2-naphthylamine to the phthalate formation and to convert phthalates of one type into other types by changing the length of their alkyl chains linked to o-phthalic acid via the ester bond. The second of the properties was noted by [27] for some representatives of soil bacteria and was confirmed by our studies [6]. The ability of bacteria to convert phthalates of one type into other types can explain the inconsistency of the ratios between the

types of phthalates in culture media (Tab.) and in the root growth medium (Fig. 2).

CONCLUSION

Ambiguous trends in the content of the compounds with a negative effect on living organisms, pisatin, N-phenyl-2-naphthylamine, and phthalates, have been determined in the growth medium of pea seedling roots as affected by the bacteria *Rhizobium* and *Azotobacter*. Differences in their content in the root growth medium prove the dissimilar nature of the protective antimicrobial reaction display in the plant under study when interacting with coexistent bacteria of the endophytic and epiphytic types. The increase in the total content of the studied compounds in the growth medium of pea seedling roots 1 day after the inoculation with endosymbiotic bacteria is clear evidence of the increase in their protective reaction. This increase is probably due to the processes characteristic of this period of the legume-rhizobial symbiosis formation: adhesion of rhizobia on the root surface and the beginning of the process of their penetration into the root hairs [29]. Based on the above noticed changes in the total content of compounds with a negative effect, the inhibition of bacterial growth in the root zone of pea seedlings in the case of their interaction with rhizobia is assumed to be quite probable.

A decrease in the amount of the discussed compounds in the root growth medium during the same period of interaction of pea seedlings with *Azotobacter* indicates a weakening of the protective reaction of these plants against the bacteria. It is to be supposed, the conditions for the rhizosphere bacteria existence in the root zone of pea seedlings are more comfortable in this case. The increase in the proportion of antimicrobial phthalates (dioctyl phthalate and diethyl phthalate) found in the root growth medium after the inoculation with *Azotobacter* is likely to increase the competitiveness of this species among rhizosphere bacteria.

To sum up, it is possible to conclude that the concentration of negative substances with antimicrobial activity in plant root growth is not only due to their exudation by the root cells. Rhizosphere bacteria in the root zone also modify their content. In all probability, the level of metabolic activity in bacterial cells during the degradation of aromatic compounds determines the degree of these modifications.

REFERENCES

1. Sultankhodzhaev M. N., Tadzhibaev M. M. Phenyl- β -naphthylamine from three plant species. *Khimiya prirodnikh soedinenii = Chemistry of Natural Compounds*. 1976;12(3):406. (In Russian).
2. Evstratova R. I., Zapesochnaya G. G. N-phenyl-2-naphthylamine from *Centaurea salonitana*. *Khimiya prirodnikh soedinenii = Chemistry of Natural Compounds*. 1977;(4):582. (In Russian).
3. Zhanaeva T. A., Krivoshchekova O. E., Semenov A. A., Minaeva V. G. N-phenyl-2-naphthylamine from *Burleorum aureum* flowers. *Khimiya prirodnikh soedinenii = Chemistry of Natural Compounds*. 1989;25(3):377. (In Russian).

4. Makarova L. E., Smirnov V. I., Klyba L. V., Petrova I. G., Dudareva L. V. Role of allelopathic compounds in the regulation and development of legume-rhizobial symbiosis. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2012;48(4):355-362. <https://doi.org/10.1134/S0003683812030064>.
5. Enikeev A. G., Semenov A. A., Permyakov A. V., Sokolova N. A., Gamburg K. Z., Dudareva L. V. Biosynthesis of ortho-phthalic acid esters in plant and cell cultures. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2019;55(3):282-285. <https://doi.org/10.1134/S0003683819020066>.
6. Makarova L. E., Moritz A. S., Sokolova N. A., Petrova I. G., Semenov A. A., Dudareva L. V., et al. Degradation of N-phenyl-2-naphthylamine by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *Pseudomonas syringae* pv. *pisii*, and *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* bacteria. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2020;56(2):202-210. <https://doi.org/10.1134/S0003683820010123>.
7. Makarova L. E., Moritz A. S., Sokolova N. A. Formation of phthalates during the degradation of N-phenyl-2-naphthylamine by soil bacteria. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(1):107-115. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-107-115>.
8. Novak K. Induction of phytoalexin in pea roots by Rhizobia. *Development in Soil Science*. 1989;18:63-66. [https://doi.org/10.1016/S0166-2481\(08\)70197-1](https://doi.org/10.1016/S0166-2481(08)70197-1).
9. Shafikova T. N., Omelichkina Yu. V., Enikeev A. G., Boyarkina S. V., Gvil'dis D. E., Semenov A. A. Esters of orthophthalic acid inhibit the ability of phytopathogens to form biofilms. *Doklady Akademii nauk*. 2018;480(3):381-383. (In Russian). <https://doi.org/10.7868/S0869565218150264>.
10. Makarova L. E., Dudareva L. V., Petrova I. G., Vasil'eva G. G. Secretion of phenolic compounds into root exudates of pea seedlings upon inoculation with *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* or *Pseudomonas syringae* pv. *pisii*. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2016;52(2):205-209. <https://doi.org/10.1134/S0003683816020095>.
11. Provorov N. A., Vorob'ev N. I. *Genetic foundations of the evolution of plant-microbial symbiosis: monograph*. St. Petersburg: Inform-Navigator; 2012. 400 p. (In Russian).
12. Melnykova N. M., Mykhalkiv L. M., Omelchuk S. V., Beregovenko S. K. Rhizosphere microorganisms as a factor influencing the rhizobia-legume symbiosis. *Plant Physiology and Genetics*. 2018;50(4):299-321. <https://doi.org/10.15407/frg2018.04.299>.
13. Akimova G. P., Verkhoturov V. V., Sokolova M. G., Belopukhov S. L. Modulation of pro / antioxidant peroxidase activity in pea seedling roots inoculated with *Rhizobium* and *Azotobacter*. *Izvestiya Timiryazevskoi sel'skokhozyaistvennoi akademii = Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy*. 2019;(1):138-145. (In Russian). <https://doi.org/10.34677/0021-342X-2019-1-138-145>.
14. Makoi J. H. R., Ndakidemi P. A. Biological, ecological and agronomic significance of plant phenolic compounds in rhizosphere of the symbiotic legumes (review). *African Journal of Biotechnology*. 2007;6(12):1358-1368.
15. Sweigard J. A., Matthews D. E., Vanetten H. D. Synthesis of the phytoalexin pisatin by a methyltransferase from pea. *Plant Physiology*. 1986;80(1):277-279. <https://doi.org/10.1104/pp.80.1.277>.
16. Vanetten H. D., Temporini E., Wassman C. Phytoalexin (and phytoanticipin) tolerance as a virulence trait: why is it not required by all pathogens? *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2001;68(2):1276-1283. <https://doi.org/10.1006/pmpp.2001.0350>.
17. Carlson R. E., Dolphin D. H. *Pisum sativum* stress metabolites: two cinnamylphenols and 2'-methoxychalcone. *Phytochemistry*. 1982;21(7):1733-1736. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(82\)85049-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(82)85049-8).
18. Altenburger R., Brack W., Greco W. R., Groot M., Jung K., Ovari A., et al. On the mode of action of N-phenyl-2-naphthylamine in plants. *Environmental Science & Technology*. 2006;40(19):6163-6169. <https://doi.org/10.1021/es060338e>.
19. Hauser R., Calafat A. M. Phthalates and human health. *Occupational and Environmental Medicine*. 2005;62(11):806-818. <https://doi.org/10.1136/oem.2004.017590>.
20. Kato-Noguchi H. Isolation and identification of an allelopathic substance in *Pisum sativum*. *Phytochemistry*. 2003;62(7):1141-1144. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00673-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00673-8).
21. Hartwig U. A., Josef C. M., Phillips D. A. Flavonoid released naturally from alfalfa seeds enhance growth rate of *Rhizobium meliloti*. *Journal of Plant Physiology*. 1991;95(3):797-803. <https://doi.org/10.1104/pp.95.3.797>.
22. Cruickshank I. A. M. Studies of phytoalexins. IY. The antimicrobial spectrum of pisatin. *Australian Journal of Biological Sciences*. 1962;15(5):141-159. <https://doi.org/10.1071/B19620147>.
23. Parke D., Ornston L. N. Enzymes of the β -ketoacid pathway are inducible in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. and constitutive in *Bradyrhizobium* spp. *Journal of Bacteriology*. 1986;165(1):288-292. <https://doi.org/10.1128/jb.165.1.288-292.1986>.
24. Vaishlya O. B., Bondarenko A. A. *Strain of bacterium AZ D10 VKM B-2272 D eliciting growth-stimulating properties and resistant to deltamethrin*. Patent RF, no. 2231546; 2004. (In Russian).
25. Marek E. V., Koslitz S., Weiss T., Fartasch M., Schlüter G., Käfferlein H. U., et al. Quantification

of N-phenyl-2-naphthylamine by gas chromatography and isotope-dilution mass spectrometry and its percutaneous absorption ex vivo under workplace conditions. *Archives of Toxicology*. 2017;91(11):3587-3596. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-2046-2>.

26. AlimAl-Bari M. A., Sayeed M. A., Rahman M. S., Mossadik M. A. Characterization and antimicrobial activities of a phenolic acid derivative produced by *Streptomyces bangladesiensis*, a novel species collected in Bangladesh. *Research Journal of Medical Sciences*. 2006;1(2):77-81.

27. Pastukhova E. S., Egorova V. O., Sokolova N. A., Plotnikova E. G. Ortho-phthalic acid degrading bacteria isolated from potash waste. *Vestnik Permskogo*

universiteta. Seriya: Biologiya = Bulletin of Perm University. Biology. 2010;(3):227-232.

28. Kim S. M., Yoo J. A., Baek J. M., Cho K. H. Diethyl phthalate exposure is associated with embryonic toxicity, fatty liver changes, and hypolipidemia via impairment of lipoprotein functions. *Toxicology in Vitro*. 2015;30(1):383-393. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.09.026>.

29. Mathesius U., Bayliss C., Weinman J. J., Schlaman H. R. M., Spaink H. P., Rolfe B. G., et al. Flavonoids synthesized in cortical cells during nodule initiation are early developmental markers in white clover. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 1998;11(12):1223-1232. <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI.1998.11.12.1223>.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Султанходжаев М. Н., Таджибаев М. М. Фенил-β-нафтиламин из трех видов растений // Химия природных соединений. 1976. Т. 12. N 3. С. 406.

2. Евстратова Р. И., Запесочная Г. Г. N-фенил-2-нафтиламин из *Centaurea salonitana* // Химия природных соединений. 1977. N 4. С. 582.

3. Жанаева Т. А., Кривошекова О. Е., Семенов А. А., Минаева В. Г. N-фенил-2-нафтиламин из цветов *Burleum aureum* // Химия природных соединений. 1989. Т. 25. N 3. С. 377.

4. Makarova L. E., Smirnov V. I., Klyba L. V., Petrova I. G., Dudareva L. V. Role of allelopathic compounds in the regulation and development of legume-rhizobial symbiosis // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2012. Vol. 48, no. 4. P. 355–362. <https://doi.org/10.1134/S0003683812030064>.

5. Enikeev A. G., Semenov A. A., Permyakov A. V., Sokolova N. A., Gamburg K. Z., Dudareva L. V. Biosynthesis of ortho-phthalic acid esters in plant and cell cultures // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2019. Vol. 55, no. 3. P. 282–285. <https://doi.org/10.1134/S0003683819020066>.

6. Makarova L. E., Moritz A. S., Sokolova N. A., Petrova I. G., Semenov A. A., Dudareva L. V., et al. Degradation of N-phenyl-2-naphthylamine by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, and *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* bacteria // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2020. Vol. 56, no. 2. P. 202–210. <https://doi.org/10.1134/S0003683820010123>.

7. Макарова Л. Е., Мориц А. С., Соколова Н. А. Образование фталатов при деградации N-фенил-2-нафтиламина почвенными бактериями // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т. 11. N 1. С. 107–115. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-107-115>.

8. Novak K. Induction of phytoalexin in pea roots by Rhizobia // *Development in Soil Science*. 1989. Vol. 18. P. 63–66. <https://doi.org/10.1016/S0166->

2481(08)70197-1.

9. Шафикова Т. Н., Омеличкина Ю. В., Еникеев А. Г., Бояркина С. В., Гвильдис Д. Э., Семенов А. А. Эфиры ортофталевой кислоты подавляют способность фитопатогенов образовывать биопленки // Доклады Академии наук. 2018. Т. 480. N 3. С. 381–383. <https://doi.org/10.7868/S0869565218150264>.

10. Makarova L. E., Dudareva L. V., Petrova I. G., Vasil'eva G. G. Secretion of phenolic compounds into root exudates of pea seedlings upon inoculation with *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* or *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*. // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2016. Vol. 52, no. 2. P. 205–209. <https://doi.org/10.1134/S0003683816020095>.

11. Проворов Н. А., Воробьев Н. И. Генетические основы эволюции растительно-микробного симбиоза: монография. СПб.: Информ-Навигатор, 2012. 400 с.

12. Melnykova N. M., Mykhalkiv L. M., Omelchuk S. V., Beregovenko S. K. Rhizosphere microorganisms as a factor influencing the rhizobia-legume symbiosis // *Plant Physiology and Genetics*. 2018. Vol. 50, no. 4. P. 299–321. <https://doi.org/10.15407/frg2018.04.299>.

13. Акимова Г. П., Верхотуров В. В., Соколова М. Г., Белопухов С. Л. Модуляция про/антиоксидантной активности пероксидазы в корнях проростков гороха, инокулированных *Rhizobium* и *Azotobacter* // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. 2019. N 1. С. 138–145. <https://doi.org/10.34677/0021-342X-2019-1-138-145>.

14. Makoi J. H. R., Ndakidemi P. A. Biological, ecological and agronomic significance of plant phenolic compounds in rhizosphere of the symbiotic legumes (review) // *African Journal of Biotechnology*. 2007. Vol. 6, no. 12. P. 1358–1368.

15. Sweigard J. A., Matthews D. E., Vanetten H. D. Synthesis of the phytoalexin pisatin by a methyltransferase from pea // *Plant Physiology*. 1986. Vol. 80, no. 1. P. 277–279. <https://doi.org/10.1104/pp.80.1.277>.

16. Vanetten H. D., Temporini E., Wassman C.

Phytoalexin (and phytoanticipin) tolerance as a virulence trait: why is it not required by all pathogens? // *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2001. Vol. 68, no. 2. P. 1276–1283. <https://doi.org/10.1006/pmpp.2001.0350>.

17. Carlson R. E., Dolphin D. H. *Pisum sativum* stress metabolites: two cinnamylphenols and 2'-methoxychalcone // *Phytochemistry*. 1982. Vol. 21, no. 7. P. 1733–1736. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(82\)85049-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(82)85049-8).

18. Altenburger R., Brack W., Greco W. R., Groot M., Jung K., Ovari A., et al. On the mode of action of N-phenyl-2-naphthylamine in plants // *Environmental Science & Technology*. 2006. Vol. 40, no. 19. P. 6163–6169. <https://doi.org/10.1021/es060338e>.

19. Hauser R., Calafat A. M. Phthalates and human health // *Occupational and Environmental Medicine*. 2005. Vol. 62, no. 11. P. 806–818. <https://doi.org/10.1136/oem.2004.017590>.

20. Kato-Noguchi H. Isolation and identification of an allelopathic substance in *Pisum sativum* // *Phytochemistry*. 2003. Vol. 62, no. 7. P. 1141–1144. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00673-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00673-8).

21. Hartwig U. A., Josef C. M., Phillips D. A. Flavonoid released naturally from alfalfa seeds enhance growth rate of *Rhizobium meliloti* // *Journal of Plant Physiology*. 1991. Vol. 95, no. 3. P. 797–803. <https://doi.org/10.1104/pp.95.3.797>.

22. Cruickshank I. A. M. Studies of phytoalexins. IY. The antimicrobial spectrum of pisatin // *Australian Journal of Biological Sciences*. 1962. Vol. 15, no. 5. P. 141–159. <https://doi.org/10.1071/BI9620147>.

23. Parke D., Ornston L. N. Enzymes of the β -ketoacid pathway are inducible in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. and constitutive in *Bradyrhizobium* spp. // *Journal of Bacteriology*. 1986. Vol. 165, no. 1. P. 288–292. <https://doi.org/10.1128/jb.165.1.288-292.1986>.

24. Пат. № 2231546, Российская Федерация,

C12 N1/20// (C12 N1/20, C12 R1:065). Штамм бактерий AZ D10 VKM B-2272 Д, обладающий ростостимулирующими свойствами и устойчивый к дельтаметрину / О. Б. Вайшля, А. А. Бондаренко; заявитель и патентообладатель Томский государственный университет. Заявл. 28.08.2002; опублик. 27.06.2004.

25. Marek E. V., Koslitz S., Weiss T., Fartasch M., Schlüter G., Käßlerlein H. U., et al. Quantification of N-phenyl-2-naphthylamine by gas chromatography and isotope-dilution mass spectrometry and its percutaneous absorption ex vivo under workplace conditions // *Archives of Toxicology*. 2017. Vol. 91, no. 11. P. 3587–3596. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-2046-2>.

26. Alim Al-Bari M. A., Sayeed M. A., Rahman M. S., Mossadik M. A. Characterization and antimicrobial activities of a phenolic acid derivative produced by *Streptomyces bangladeshiensis*, a novel species collected in Bangladesh // *Research Journal of Medical Sciences*. 2006. Vol. 1, no. 2. P. 77–81.

27. Пастухова Е. С., Егорова В. О., Соколова Н. А., Плотникова Е. Г. Бактерии-деструкторы ортофталевой кислоты, выделенные из отходов калийного производства // *Вестник Пермского университета. Серия: Биология*. 2010. N 3. С. 227–232.

28. Kim S. M., Yoo J. A., Baek J. M., Cho K. H. Diethyl phthalate exposure is associated with embryonic toxicity, fatty liver changes, and hypolipidemia via impairment of lipoprotein functions // *Toxicology in Vitro*. 2015. Vol. 30, no. 1. P. 383–393. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.09.026>.

29. Mathesius U., Bayliss C., Weinman J. J., Schlaman H. R. M., Spaik H. P., Rolfe B. G., et al. Flavonoids synthesized in cortical cells during nodule initiation are early developmental markers in white clover // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 1998. Vol. 11, no. 12. P. 1223–1232. <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI.1998.11.12.1223>.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Lyudmila E. Makarova,
Dr. Sci. (Biology), Chief Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., 664033, Irkutsk,
Russian Federation,
makarova@sifibr.irk.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4582-8245>

Irina G. Petrova,
Lead Technologist,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., 664033, Irkutsk,
Russian Federation,
hplc_04@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8382-873X>

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Л. Е. Макарова,
д.б.н., главный научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии и биохимии
растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
makarova@sifibr.irk.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4582-8245>

И. Г. Петрова,
ведущий технолог,
Сибирский институт физиологии и биохимии
растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
hplc_04@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8382-873X>

Natalia A. Sokolova,
Lead Technologist,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., 664033, Irkutsk,
Russian Federation,
fhma_lab@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7161-9204>

Sviatoslav S. Makarov,
Engineer,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., 664074, Irkutsk,
Russian Federation,
makarov@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-2145-9502>

Vladimir A. Pionkevich,
Cand. Sci. (Engineering), Associate Professor,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., 664074, Irkutsk,
Russian Federation,
pionkevichva@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2002-415X>

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.*

Information about the article

*The article was submitted 04.03.2022.
Approved after reviewing 14.04.2022.
Accepted for publication 15.09.2022.*

Н. А. Соколова,
ведущий технолог,
Сибирский институт физиологии и биохимии
растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
fhma_lab@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7161-9204>

С. С. Макаров,
инженер по автоматизации,
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
makarov@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-2145-9502>

В. А. Пионкевич,
к.т.н., доцент,
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
pionkevichva@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2002-415X>

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.*

Информация о статье

*Поступила в редакцию 04.03.2022.
Одобрена после рецензирования 14.04.2022.
Принята к публикации 15.09.2022.*

Научная статья

УДК 579.2; 543.42:57

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-406-416>



Применение сканирующей электронной микроскопии и ИК-спектроскопии для экспресс-оценки морфологии и химического состава бактериальных пленок при периодическом культивировании

Джигангир Асхатович Файзуллин*, Алексей Витальевич Кобелев**, Святослав Владимирович Клементьев**, Александр Семенович Сироткин**, Алексей Михайлович Рогов***, Вадим Владимирович Сальников*, Ольга Николаевна Макшакова*, Юрий Федорович Зуев*

*Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН, г. Казань, Российская Федерация

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

***Казанский федеральный университет, г. Казань, Российская Федерация

Автор, ответственный за переписку: Кобелев Алексей Витальевич, alexei-ksu@mail.ru

Аннотация. Основной формой существования бактерий в природе являются биопленки – прикрепленные к субстрату ассоциации клеток, окруженные полимерным матриксом. Изучение образования и функционирования биопленок имеет фундаментальное значение для управления процессами формирования микробных ассоциатов в экологии, биотехнологии и медицине. Поставленная цель требует разработки аналитических подходов, позволяющих при сохранении интактной структуры биопленок получать оперативную информацию на протяжении всего цикла жизнедеятельности микробного сообщества. В задачу работы входила адаптация методов сканирующей электронной микроскопии и ИК-спектроскопии в качестве экспресс-метода анализа микробных биопленок. Для этого проведено сопоставительное изучение кинетики роста культуры бактерий *Bacillus subtilis* в течение 24 ч культивирования на твердом субстрате методами классической микробиологии и биохимии, электронной сканирующей микроскопии и Фурье ИК-спектроскопии. Установлено, что морфология биопленки меняется от равномерного заселения поверхности носителя планктонными клетками на начальной стадии роста (6 ч) до накопления внеклеточного матрикса и образования микроколоний в экспоненциальной и стационарной фазе (12–18 ч) и постепенного истощения матрикса в фазе отмирания клеток (24 ч). Результаты ИК-спектроскопии коррелируют с результатами биохимических исследований, что, в свою очередь, позволяет проводить оперативную оценку накопления белков, полисахаридов и нуклеиновых кислот и получать информацию об их структурном состоянии в биопленке. По итогам исследования можно заключить, что сканирующая электронная микроскопия и Фурье ИК-спектроскопия в предложенном варианте применения позволяют получать взаимодополняющую информацию о морфологии и химическом составе микробных биопленок в процессе культивирования.

Ключевые слова: *Bacillus subtilis*, микробные биопленки, Фурье ИК-спектроскопия, сканирующая электронная микроскопия

Благодарности. Авторы выражают благодарность коллективному спектро-аналитическому Центру физико-химических исследований строения, свойств и состава веществ и материалов (ЦКП-САЦ) ФИЦ «Казанский научный центр РАН» за возможность проведения экспериментальных исследований, а также Казанскому (Приволжскому) федеральному университету за электронную микроскопию образцов в Междисциплинарном центре «Аналитическая микроскопия».

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Казанского научного центра РАН № 122011800137-0.

Для цитирования: Файзуллин Д. А., Кобелев А. В., Клементьев С. В., Сироткин А. С., Рогов А. М., Сальников В. В., Макшакова О. Н., Зуев Ю. Ф. Применение сканирующей электронной микроскопии и ИК-спектроскопии для экспресс-оценки морфологии и химического состава бактериальных пленок при периодическом культивировании // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2022. Т. 12. N 3. С. 406–416. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-406-416>.

© Файзуллин Д. А., Кобелев А. В., Клементьев С. В., Сироткин А. С., Рогов А. М., Сальников В. В., Макшакова О. Н., Зуев Ю. Ф., 2022

Application of scanning electron microscopy and IR spectroscopy for a timely evaluation of the morphology and chemical composition of bacterial films during batch cultivation

Djigangir A. Faizullin*, Aleksei V. Kobelev**, Svyatoslav V. Klement'ev**, Alexander S. Sirotkin**, Aleksei M. Rogov***, Vadim V. Salnikov*, Olga N. Makshakova*, Yurii F. Zuev*

*Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics FRC KazSC RAS, Kazan, Russian Federation

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

***Kazan Federal University, Kazan, Russian Federation

Corresponding author: Aleksei V. Kobelev, alexei-ksu@mail.ru

Abstract. Bacteria most commonly exist in nature in the form of bacterial biofilms, i.e. associations of cells attached to a substrate surrounded by a polymer matrix. Research into biofilm formation and functioning is fundamental to the management of microbial associations in ecology, biotechnology and medicine. This task requires the development of analytical approaches capable of providing timely information throughout the life cycle of microbial communities at the same time as maintaining their intact structure. In this paper, we apply scanning electron microscopy and IR spectroscopy as rapid methods for analysing microbial biofilms. To this end, the growth kinetics of a *Bacillus subtilis* culture cultivated on a solid substrate for 24 h was comparatively studied by the methods of classical microbiology and biochemistry, electron scanning microscopy and Fourier-transform IR spectroscopy. The biofilm morphology was found to vary from a uniform settlement of planktonic cells over the substrate surface at the initial stage of growth (6 h) followed by the accumulation of the extracellular matrix and the formation of microcolonies at the exponential and stationary stage (12–18 h) and a gradual depletion of the matrix at the stage of cell death (24 h). The results of IR spectroscopy were established to agree well with those of biochemical studies, thereby demonstrating the potential of the method for a timely evaluation of the accumulation of proteins, polysaccharides and nucleic acids and for obtaining information about their structural state in the studied biofilm. It is concluded that scanning electron microscopy and Fourier-transform IR spectroscopy can be used for obtaining complementary information about the morphology and chemical composition of microbial biofilms during their cultivation.

Keywords: *Bacillus subtilis*, microbial biofilms, Fourier-transform IR spectroscopy, scanning electron microscopy

Acknowledgements. The authors express their gratitude to the collective Spectro-Analytical Center for Physical and Chemical Studies of the Structure, Properties, and Composition of Substances and Materials (CKP-SAC) of the Federal Research Center "Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences" for the opportunity to conduct experimental studies. The authors thank the Kazan (Volga Region) Federal University for the electron microscopy of samples at the Interdisciplinary Center "Analytical Microscopy".

Funding. The work was carried out within the framework of the government assignment 122011800137-0 for Federal Research Center Kazan Scientific Center of RAS.

For citation: Faizullin D. A., Kobelev A. V., Klement'ev S. V., Sirotkin A. S., Rogov A. M., Salnikov V. V., Makshakova O. N., Zuev Yu. F. Application of scanning electron microscopy and IR spectroscopy for a timely evaluation of the morphology and chemical composition of bacterial films during batch cultivation. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2022;12(3):406-416. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-406-416>.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что в большинстве случаев в медицинской и биотехнологической практике активность микробных сообществ обусловлена образованием и функционированием микробных биопленок, представляющих собой полимерный матрикс с

иммобилизованными клетками, потребляющих питательные вещества и выделяющих во внешнюю среду продукты метаболизма и сигнальные молекулы¹. Для понимания этих процессов требуются методы изучения, позволяющие сохранить интактную структуру биопленок и получать оперативную

¹Марданова А. М., Кабанов Д. А., Рудакова Н. Л., Шарипова М. Р. Биопленки: основные методы исследования: учеб.-метод. пос. Казань: К(П)ФУ, 2016. 42 с.

информацию на протяжении всего цикла жизнедеятельности микробного сообщества.

«Золотым стандартом» для исследования морфологии биопленок считается метод сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) [1]. Однако он является дорогостоящим, требует длительной и квалифицированной подготовки образцов, в ходе которой биопленки теряют жизнеспособность, а их дальнейшее использование для анализа или рекультивации становится невозможным.

Использование классических методов микробиологии и биохимии для анализа химического состава связано с разрушением биопленок, выделением и раздельным анализом их компонентов. Таким образом, несмотря на то, что эти методы характеризуются высокой точностью и селективностью, они являются трудоемкими и недостаточными для характеристики динамики развития микробного сообщества. Совершенствование и применение спектроскопических методов позволяет в значительной степени решить задачу неdestructивного анализа сложных объектов, к каковым относятся биопленки.

Метод инфракрасной спектроскопии успешно применяется для характеристики вегетативных клеток микроорганизмов, спор бактерий, а также биопленок [2–4]. Установлено [2, 4], что разные виды микроорганизмов характеризуются индивидуальными ИК-спектрами, что обусловлено уникальным для каждого вида набором макромолекул (белков, липидов, углеводов, нуклеиновых кислот). Показано, что с помощью ИК-спектроскопии можно дифференцировать штаммы одного рода бактерий с высокой точностью (до 97%) [5] и получать информацию о химической структуре определенных компонентов бактерий – клеточных стенок, цитоплазматического вещества, пептидогликана, тейхоевых кислот, ДНК [6–8]. Исследования бактериальных культур с равным успехом могут проводиться в виде водных суспензий или сухих порошков. Исследование биопленок затрудняется тем, что биопленки формируются на поверхности субстратов, которые могут иметь собственное поглощение в ИК-диапазоне. В ряде работ перед снятием спектров зрелые биопленки отделяли от субстрата [9]. Однако этот способ неприемлем для изучения биопленок на ранних стадиях роста из-за их низкой механической прочности. Выращивание и исследование биопленок *in situ* на поверхности элемента нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) [10] позволяет устранить это ограничение, однако это технически сложно осуществимо из-за необходимости длительного время поддерживать температуру и условия стерильности в измерительном отсеке спектрометра.

Выращивание биопленок *ex situ* на подложках из оптически прозрачного материала в ИК-диапазоне [11] представляется с практической точки зрения наиболее приемлемым, хотя требование прозрачности и биологической инертности ограничивает выбор подложек по химическому составу.

Регистрация спектров биопленок на просвет имеет преимущество перед методом НПВО также в том, что основной вклад в интенсивность спектра дает вещество в объеме биопленки, а не с ее поверхности, на которой могут адсорбироваться элементы питательной среды.

Настоящее исследование посвящено сопоставительному изучению кинетики роста модельной микробной культуры *Bacillus subtilis* на твердом субстрате с использованием комплекса методов классической микробиологии и биохимии, СЭМ и ИК-Фурье спектроскопии с целью оценки релевантности применения методов ИК-спектроскопии и СЭМ для получения оперативной информации о структуре и химическом составе биопленки на разных стадиях роста.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовалась культура *Bacillus subtilis* [12], полученная из лекарственного препарата «Споробактерин» (ООО «Бакорен», г. Оренбург, Россия).

Культивирование бактерий и получение образцов биопленок. Периодическое культивирование бактерий *B. subtilis* проводили в конических колбах на 250 мл на перемешивающем устройстве Incubator ES-20/60 (SIA Biosan, Латвия) при температуре 37 °С, скорости перемешивания 120 об/мин в течение 36 ч с отбором проб через каждые 6 ч. В качестве питательных сред использовался мясopептонный бульон (МПБ) и МПБ с красителем Конго красным (0,8 г/л), стерилизация которых проводилась в автоклаве в течение 30 мин при 0,5 ати².

Биопленки выращивали на подложках из фтористого кальция или предметных стеклах путем внесения в чашки Петри со стерильной средой и подложками 18-часового инокулята в соотношении 1:45 и последующей инкубации в течение 24 ч с отбором проб через каждые 6 ч.

Анализ формирования и микроструктуры биопленок. Отбор проб биопленки для анализа бактериального роста осуществляли в процессе культивирования *B. subtilis* вплоть до 36 ч. Число клеток *B. subtilis* в биопленке определяли путем их окрашивания генцианвиолетом [13, 14]. По полученным данным строили кривую роста. Количество жизнеспособных клеток определяли методом Коха.

Количество белка в биопленке *B. subtilis* определяли по методу Брэдфорда³. Предварительно биопленку, сформированную на поверхности предметных стекол, гидролизовали с помощью 2н NaOH в термоблоке при 90 °С в течение 30 мин. В полученных растворах определяли содержание белка.

Для оценки биосинтеза экзополисахаридов в биопленке *B. subtilis* исследуемые образцы, выращенные на МПБ с красителем Конго красным, отмывали в физиологическом растворе, проводили экстракцию красителя 96%-м раствором этанола и измеряли оптическую плотность экстракта [14, 15].

²Нетрусов А. И. Практикум по микробиологии. М.: Академия, 2005. 608 с.

Для проведения анализа ИК-спектроскопией биопленки выращивали по методу, описанному выше, используя в качестве подложек пластины из CaF_2 . В отличие от традиционного способа подготовки образцов биопленок для регистрации ИК-спектров, состоящего в соскабливании пленки с подложки, измельчении и запрессовке в матрицу из KBr [16], в данном исследовании использовались интактные биопленки. Для этого пластины на разных стадиях роста биопленки извлекали из питательной среды и высушивали при комнатной температуре и влажности. Биопленки не промывали, чтобы не нарушить их структуру. Пластины помещали в кюветный отсек Фурье ИК-спектрофотометра IR-Affinity 1 (Shimadzu, Япония) и регистрировали спектры на просвет в интервале волновых чисел 4000–900 cm^{-1} при спектральном разрешении 4 cm^{-1} с усреднением 64 индивидуальных сканов. Спектрометр продували сухим азотом для устранения мешающего влияния паров воды и углекислого газа. Для каждого образца регистрировали спектры с нескольких участков поверхности, которые затем усредняли.

ИК-спектры бактерий снимали аналогично, предварительно высушив водную суспензию клеток на поверхности пластины из CaF_2 .

Исходные спектры подвергали предварительной обработке, состоящей в вычитании базовой линии и сглаживании.

Для выделения отдельных компонентов многокомпонентных полос поглощения вычисляли вторую производную спектров. Отнесение полос проводили на основе данных работ [17–19].

Для исследования методом СЭМ биопленки выращивали на предметных стеклах. После извлечения из питательной среды подложки с биопленками высушивали и фиксировали в 2%-м глутаровом альдегиде на фосфатном буфере (pH 7,3) в течение 1 ч. После постфиксации в 1%-й осмиевой кислоте в течение 1 ч образцы промывали в буфере и дистиллированной воде и подвергали ступенчатой дегидратации в растворах спирта, после чего покрывали золотом [20]. Образцы исследовали на сканирующем электронном микроскопе Merlin (Carl Zeiss, Германия) Междисциплинарного центра аналитической микроскопии Казанского федерального университета.

Обработка результатов экспериментов проводилась с помощью пакета программ Microsoft Excel 2007 с оценкой достоверности по критерию Стьюдента–Фишера⁴. Использовали параметрический *t*-критерий Стьюдента, достоверными считали различия при вероятности ошибки $p < 0,05$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Формирование биопленок в процессе микробного роста. На рис. 1 представлены микрофотографии поверхности субстрата после 6 и 24 ч роста

биопленки, полученные методом СЭМ. Изображения показывают, что по истечении 6 ч на поверхности субстрата (подложки) присутствуют преимущественно разрозненные палочкообразные образования без заметного количества матрикса (рис. 1, а). Размеры объектов соответствуют ожидаемым для бактерий *B. subtilis*: длина отдельных клеток варьируется от 0,7 до 3 мкм, диаметр составляет 0,5–0,6 мкм. Клетки образуют линейные цепочки, состоящие из 2 и более (до 10) звеньев, что указывает на их активное деление. Часто попадаются клетки, от которых отходят тяжи различной длины к субстрату или к другим клеткам (рис. 1, б). Через 24 ч роста обнаруживаются округлые плотные скопления клеток (рис. 1, с). Размеры скоплений варьируются от нескольких мкм до нескольких десятков мкм, а длина клеточных цепочек сокращается до 1–3 звеньев. На этом этапе роста отчетливо проявляется внеклеточный матрикс, заполняющий межклеточные промежутки в скоплениях в виде диффузного вещества (рис. 1, д).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что структура биопленки на всем протяжении роста не является однородной и состоит из дискретных клеточных ассоциатов переменного размера. Внутри ассоциатов клетки объединены веществом внеклеточного матрикса. Промежутки между ассоциатами заполняются либо питательной средой, либо матриксом.

Накопление белков и экзополисахаридов в биопленке. Результаты определения биомассы, накопления белка и экзополисахаридов в биопленке в процессе периодического культивирования культуры *B. subtilis* продемонстрированы на рис. 2–4.

На рис. 2 представлена кривая роста культуры *B. subtilis* в биопленке, полученная по результатам измерения оптической плотности раствора генцианвиолета, экстрагированного этанолом из биопленки: чем больше красителя первоначально было связано в биопленке, тем большее значение оптической плотности раствора было зарегистрировано в результате экстракции.

Полученные результаты показали, что число клеток в биопленке в первые 6 ч принципиально не увеличивается, что связано с первичной иммобилизацией небольшого количества клеток на поверхности и началом образования биопленки. Затем были отмечены фазы ускорения и экспоненциального роста биопленки (6–18 ч), после чего наступала стационарная фаза роста, когда дальнейшее накопление клеток прекращается вследствие истощения питательной среды и накопления продуктов метаболизма [13].

При этом было отмечено, что концентрация белка в биопленке возрастает до 12 ч роста, что связано с активным формированием биопленки на поверхности, после которого наступает фаза

³Общая фармакопейная статья. Определение белка. ОФС. 1.2.3.0012.15 МЗ РФ. 2015. 16 с. [Электронный ресурс]. URL: <https://pharmacosopeia.ru/ofs-1-2-3-0012-15-opredelenie-belka> (24.02.2022).

⁴Воробьев В. Я., Елсуков А. И. Теория и эксперимент. Минск: Высшая школа, 1989. 109 с.

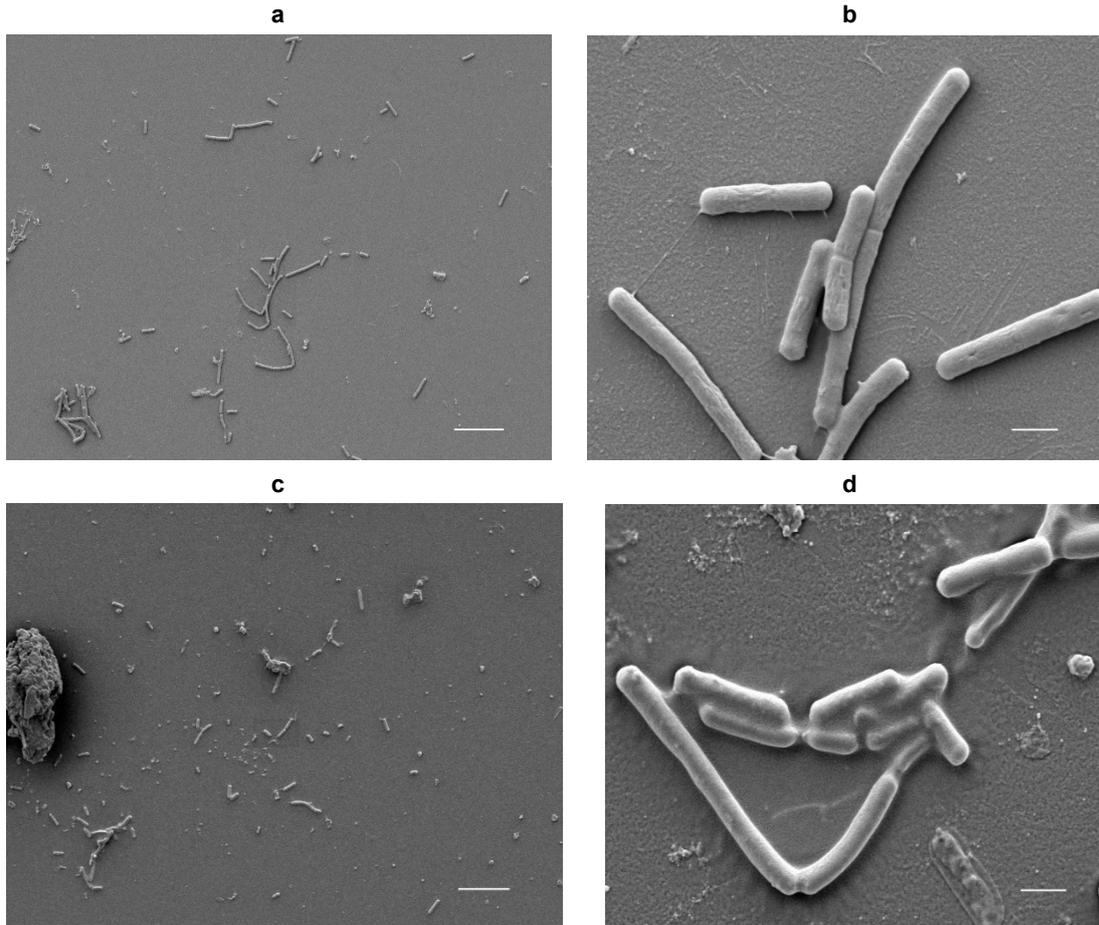


Рис. 1. Изображения сканирующей электронной микроскопии поверхности субстрата после 6 (а, b) и 24 ч (с, d) роста биопленки. Размер масштабного отрезка равен 10 (а, с) и 1 мкм (b, d)

Fig. 1. Scanning electron microscopy images of the substrate surface after 6 (a, b) and 24 h (c, d) biofilm growth. The size of the scale bar is 10 (a, c) and 1 µm (b, d)

плато до 18 ч включительно (см. рис. 3). Дальнейшее увеличение концентрации белка в биопленке, по-видимому, связано с лизисом клеток.

Синтез экзополисахаридов (ЭПС) в биопленке *B. subtilis* (см. рис. 4) определяли по количеству экстрагируемого этанолом красителя Конго красного, связывающегося с ЭПС в процессе инкубации [21]. Результаты показали замедленный синтез ЭПС до 12 ч роста с дальнейшим резким увеличением на 18 ч и последующим выходом на плато. Полученные данные коррелируют с кривой

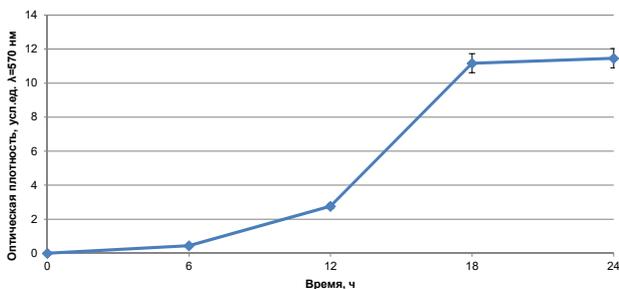


Рис. 2. Кинетика роста культуры *Bacillus subtilis* в биопленке в процессе периодического культивирования
Fig. 2. Growth kinetics of *Bacillus subtilis* culture in biofilm during batch cultivation

роста матрикса биопленки культуры (см. рис. 2). Эти сведения подтверждаются проведенными ранее исследованиями [22], которые показали, что синтез ЭПС и рост матрикса биопленки *B. subtilis* происходит симбатно (коэффициент корреляции $r=0,998$), что свидетельствует о том, что матрикс состоит из ЭПС.

ИК-спектроскопия образцов биопленки. ИК-спектры сухой суспензии и сухой биопленки (24 ч) *B. subtilis* выявляют различия в составе этих образцов. Прежде всего следует отметить разницу

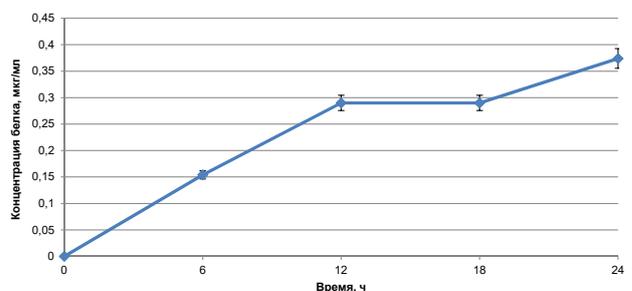


Рис. 3. Концентрация белка в биопленке *Bacillus subtilis* в процессе периодического культивирования
Fig. 3. Protein concentration in *Bacillus subtilis* biofilm during batch cultivation

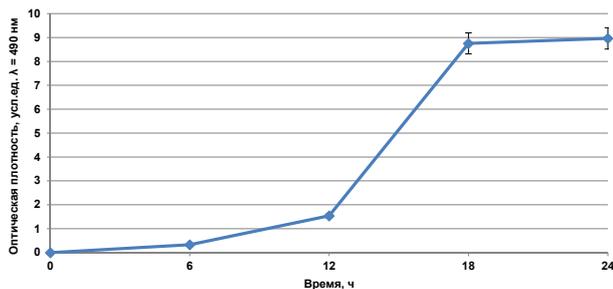


Рис. 4. Концентрация экзополисахаридов в биопленке *Bacillus subtilis* в процессе периодического культивирования

Fig. 4. Concentration of exopolysaccharides in *Bacillus subtilis* biofilm during batch cultivation

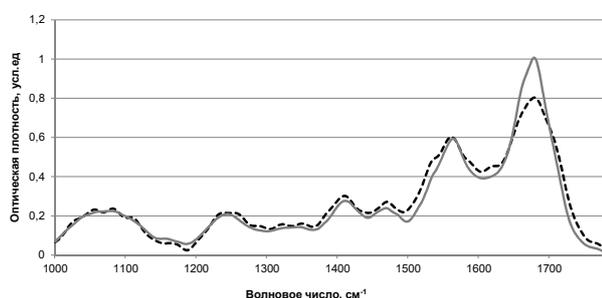


Рис. 5. ИК-спектры сухой суспензии клеток *Bacillus subtilis* (штрихи) и сухой биопленки после 24 ч инкубации (сплошная линия). Спектры нормированы к максимуму полосы поглощения амид II белка (1550 см⁻¹)

Fig. 5. IR spectra of *Bacillus subtilis* cells dry suspension (dashes) and dry biofilm after 24 h of incubation (solid line). The spectra are normalized to the maximum absorption band of the amide II protein (1550 cm⁻¹)

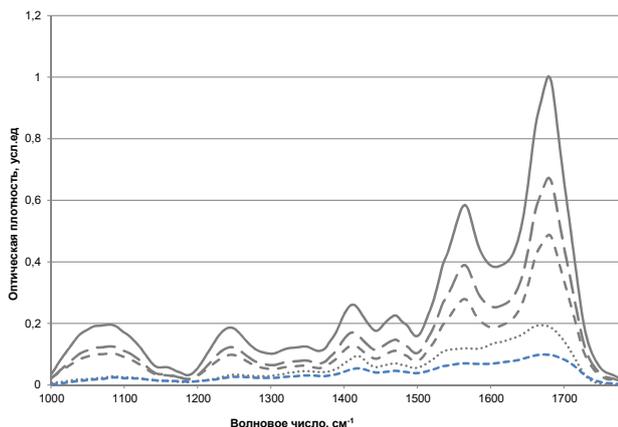


Рис. 6. ИК-спектры сухих биопленок *Bacillus subtilis* на разных стадиях роста: 6 (точки), 12 (пунктир), 18 (штрихи) и 24 (сплошная линия) ч. Нижняя пунктирная линия соответствует спектру питательной среды

Fig. 6. IR spectra of dry *Bacillus subtilis* biofilms at different growth stages: 6 (points), 12 (dotted line), 18 (dashed lines), and 24 (solid line) h. The blue dotted line indicate the nutrient medium spectrum

в форме амид-1 – наиболее интенсивной полосы в спектрах, обусловленной поглощением карбонильных групп в составе полипептидной цепи белков (рис. 5).

Более узкая и интенсивная полоса в спектре биопленки с максимумом на 1655 см⁻¹ и плечом на 1637 см⁻¹ указывает на присутствие высокоупорядоченных белков с большой долей альфа-спиралей и вытянутых бета-структур [17]. Известно, что в белково-полисахаридном матрице биопленки преобладает белок TasA [23], имеющий спиральную структуру, что соответствует наблюдаемому спектру. В спектре суспензии полоса амид-1 уширена и за счет этого менее интенсивна. Уширение свидетельствует о большой доле неупорядоченных структур. Интенсивности полос фосфатных групп ДНК (1240 и 1080 см⁻¹) и углеводов (1060 см⁻¹) в суспензии и пленке примерно равны, однако отличаются по форме, указывая на различия в составе.

На рис. 6 представлены спектры образцов биопленок на разных стадиях роста. Спектр образца после 6 ч роста в основном мало отличается от спектра питательной среды для образования биопленки. Изменения проявляются лишь в некоторых полосах – 1425, 1550, 1680 см⁻¹, что, по-видимому, соответствует вкладу белков. Спектр МПБ представляет собой широкие плохо разрешенные полосы, соответствующие суммарному поглощению различных аминокислот, коротких полипептидов и прочих компонент. Однако на более поздних сроках роста в спектре преобладают узкие полосы, соответствующие поглощению структурно упорядоченных белков. Резкое сокра-

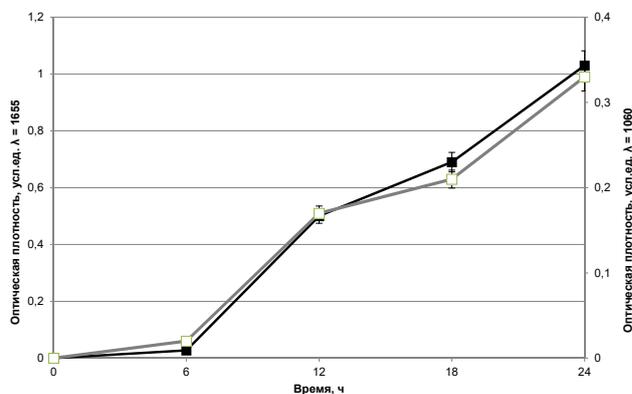


Рис. 7. Интенсивность в максимуме полосы амид I (1655 см⁻¹) белка (темные символы), интенсивность в максимуме 1060 см⁻¹ полосы поглощения полисахаридов (светлые символы) от времени роста биопленки. Точки, соответствующие 6 ч, получены вычитанием спектра мясопептонного бульона из спектра 6-часовой биопленки

Fig. 7. Intensity at the maximum of the amide I band (1655 cm⁻¹) of the protein (dark symbols), intensity at the maximum of 1060 cm⁻¹ of the absorption band of polysaccharides (light symbols) versus the biofilm growth time. The points corresponding to 6 h were obtained by subtracting the MPB spectrum from the 6 h biofilm spectrum

щение спектрального вклада питательной среды связано, по нашему мнению, с изменением гидрофобности поверхности. На ранних стадиях роста гидрофильная поверхность подложки с адсорбированными одиночными клетками хорошо удерживает воду с растворенными в ней элементами МПБ. После 12 ч бактериального роста образуется развитая бактериальная пленка с гидрофобной поверхностью [24], которая лучше освобождается от остатков культуральной жидкости в процессе подготовки образцов.

Зависимость интенсивности поглощения белка на 1655 см⁻¹ и суммарной полосы фосфатных групп и полисахаридов на 1060 см⁻¹ от времени роста представлена на рис. 7. На зависимости можно выделить характерные участки роста биопленки: лаг-период до 6 ч, постоянная скорость накопления – 6–24 ч. При сравнении зависимостей, полученных при определении концентрации белков и ЭПС (см. рис. 3, 4), а также из ИК-спектров (см. рис. 7), обнаруживается их близкое сходство ($r_{\text{белков}} = 0,913$; $r_{\text{эпс}} = 0,881$), что указывает на идентичность химической природы исследуемых веществ. Обращает на себя внимание тот факт, что суммарное поглощение белка и суммарное поглощение фосфатных групп ДНК и полисахаридов в спектре меняется симбатно ($r = 0,998$) (см. рис. 7).

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Abed S. E., Ibensouda S. K., Latrache H., Hamadi F. Scanning electron microscopy (SEM) and environmental SEM: suitable tools for study of adhesion stage and biofilm formation. IntechOpen, 2012. 830 p. <https://doi.org/10.5772/34990>.

2. Preisner O., Lopes J. A., Guiomar R., Machado J., Menezes J. C. Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy in bacteriology: towards a reference method for bacteria discrimination // Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2007. Vol. 387, no. 5. P. 1739–1748. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0851-1>.

3. Уткин Д. В., Куклев В. Е., Ерохин П. С., Осина Н. А. Применение методов спектроскопии для индикации и идентификации патогенных биологических агентов // Проблемы особо опасных инфекций. 2011. N 2. С. 68–71. [https://doi.org/10.21055/0370-1069-2011-2\(108\)-68-71](https://doi.org/10.21055/0370-1069-2011-2(108)-68-71).

4. Рой А. А., Курдиш И. К., Остапюк С. Н., Савельев Ю. В. Влияние условий культивирования *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 и его стрептомициноустойчивого мутанта на свойства поверхности этих бактерий // Мікробіологічний журнал. 2017. Т. 79. N 4. С. 12–20.

5. Сунцова А. Ю., Гулиев Р. Р., Попов Д. А., Восстрикова Т. Ю., Дубоделов Д. В., Щеголихин А. Н. [и др.]. Идентификация микроорганизмов с помощью инфракрасных Фурье-спектров // Вестник Российского государственного медицинского университета. 2018. N 4. С. 57–65. <https://doi.org/10.24075/vrgmu.2018.046>.

6. Rodriguez-Saona L. E., Khambaty F. M., Fry F. S., Dubois J., Calvey E. M. Detection and identification of bacteria in a juice matrix with Fourier

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Результаты исследования химического состава и морфологии биопленок *B. subtilis* на разных стадиях роста комплексом спектральных, микробиологических и микроскопических методов согласуются с литературными данными [25, 26].

2. Показано, что увеличение биомассы в биопленке *B. subtilis* коррелирует с накоплением белка ($r = 0,795$) и ЭПС ($r = 0,998$), что отражает зависимость между биосинтезом необходимых метаболитов, ростом клеток и продукцией полимерного матрикса.

3. Результаты ИК-спектроскопии коррелируют ($r_{\text{белков}} = 0,913$; $r_{\text{эпс}} = 0,881$) с данными биохимических исследований и позволяют проводить оперативную оценку накопления белков, полисахаридов и нуклеиновых кислот, а также дают информацию об их структурном состоянии в биопленке в процессе культивирования микробной культуры и образования биопленки.

4. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что СЭМ и Фурье ИК-спектроскопия в предложенном варианте применения дают возможность получать взаимодополняющую информацию о морфологии и химическом составе микробных биопленок в процессе культивирования.

transform-near infrared spectroscopy and multivariate analysis // Journal of Food Protection. 2004. Vol. 67, no. 11. P. 2555–2559. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-67.11.2555>.

7. Rebuffo C. A., Schmitt J., Wenning M., von Stetten F., Scherer S. Reliable and rapid identification of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* species by artificial neural network-based Fourier transform infrared spectroscopy // Applied and Environmental Microbiology. 2006. Vol. 72, no. 2. P. 994–1000. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.994-1000.2006>.

8. Wenning M., Buchl N. R., Scherer S. Species and strain identification of lactic acid bacteria using FTIR spectroscopy and artificial neural networks // Journal of Biophotonics. 2010. Vol. 3, no. 8-9. P. 493–505. <https://doi.org/10.1002/jbio.201000015>.

9. Ma W., Peng D., Walker S. L., Cao B., Gao C.-H., Huang Q., et al. *Bacillus subtilis* biofilm development in the presence of soil clay minerals and iron oxides // NPJ. Biofilms and Microbiomes. 2017. Vol. 3. Article number: 4. <https://doi.org/10.1038/s41522-017-0013-6>.

10. Humbert F., Quilès F. In-situ study of early stages of biofilm formation under different environmental stresses by ATR-FTIR spectroscopy. In: Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. Badajoz: Formatex Research Center, 2011. P. 889–895.

11. Tugarova A. V., Scheludko A. V., Dyatlova Yu. A., Filip'echeva Yu. A., Kamnev A. A. FTIR spectroscopic study of biofilms formed by the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 and its mutant *Azospirillum brasilense* Sp245.1610 // Journal

- of Molecular Structure. 2017. Vol. 1140. P. 142–147. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.12.063>.
12. Кобелев А. В., Клементьев С. В., Вдовина Т. В., Сироткин А. С. Оценка активности внеклеточных лектинов бактерий в формировании агрегированных микробных форм // Бутлеровские сообщения. 2021. Т. 65. N 1. С. 105–113. <https://doi.org/10.37952/ROI-jbc-01/21-65-1-105>.
13. Merritt J. H., Kadouri D. E., O'Toole G. A. Growing and analyzing static biofilms // Current Protocols in Microbiology. 2005. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc01b01>.
14. Хабибуллина А. Р., Вдовина Т. В., Кобелева И. В., Сироткин А. С. Исследование процесса биологической дефосфатации модельных сред с использованием фосфатаккумуляирующих бактерий // Вестник технологического университета. 2017. Т. 20. N 19. С. 131–133.
15. Годовалов А. П., Карпунина Т. И. Определение компонентного состава биопленок грамположительных бактерий // Клиническая лабораторная диагностика. 2019. Т. 64. N 10. С. 632–634. <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-10-632-634>.
16. Nayak N., Nag T. C., Satpathy G., Ray S. B. Ultrastructural analysis of slime positive & slime negative *Staphylococcus epidermidis* isolates in infectious keratitis // Indian Journal of Medical Research. 2007. Vol. 125, no. 6. P. 767–771.
17. Litvinov R. I., Faizullin D. A., Zuev Yu. F., Weisel J. W. The α -helix to β -sheet transition in stretched and compressed hydrated fibrin clots // Biophysical Journal. 2012. Vol. 103, no. 5. P. 1020–1027. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.07.046>.
18. Wang H., Ding S., Wang G., Xu X., Zhou G. In situ characterization and analysis of *Salmonella* biofilm formation under meat processing environments using a combined microscopic and spectroscopic approach // International Journal of Food Microbiology. 2013. Vol. 167, no. 3. P. 293–302. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.005>.
19. Gieroba B., Krysa M., Wojtowicz K., Wiater A., Pleszczyńska M., Tomczyk M., et al. The FT-IR and raman spectroscopies as tools for biofilm characterization created by cariogenic streptococci // International Journal of Molecular Sciences. 2020. Vol. 21, no. 1. P. 3811. <https://doi.org/10.3390/ijms21113811>.
20. McCutcheon J., Southam G. Advanced biofilm staining techniques for TEM and SEM in geomicrobiology: Implications for visualizing EPS architecture, mineral nucleation, and microfossil generation // Chemical Geology. 2018. Vol. 498. P. 115–127. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2018.09.016>.
21. Ярец Ю. И., Шевченко Н. И. Новый метод анализа бактериальной биопленки // Наука и инновации. 2016. N 10. С. 64–68.
22. Клементьев С. В., Кобелев А. В., Сироткина А. С. О формировании клеточных агрегатов под действием бактериальных лектинов // Пищевые технологии и биотехнологии: материалы XVII Всероссийской конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием, посвященная Году науки и технологий в Российской Федерации (г. Казань, 20–23 апреля 2021 г.). Казань: КНИТУ, 2021. С. 453–458.
23. Branda S. S., Chu F., Kearns D. B., Losick R., Kolter R. A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix // Molecular Microbiology. 2006. Vol. 59, no. 4. P. 1229–1238. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.05020.x>.
24. Epstein A. K., Pokroy B., Seminara A., Aizenberg J. Bacterial biofilm shows persistent resistance to liquid wetting and gas penetration // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2010. Vol. 108, no. 3. P. 995–1000. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011033108>.
25. Бисенова Г. Н., Торина А. К., Шеребаева А. А. Изучение динамики роста бактерий родов *Bacillus* и *Pseudomonas* при периодическом культивировании // Вестник науки Казахского агротехнического университета им. С. Сейфуллина. 2014. Т. 82. N 3. С. 3–9.
26. Шарипова М. Р., Марданова А. М., Рудакова Н. Л., Пудова Д. С. Бистабильность и формирование матрикса биопленки как механизмы адаптации *Bacillus subtilis* в стационарной фазе // Микробиология. 2021. Т. 90. N 1. С. 24–42. <https://doi.org/10.31857/S0026365620060178>.

REFERENCES

1. Abed S. E., Ibsouda S. K., Latrache H., Hamadi F. Scanning electron microscopy (SEM) and environmental SEM: suitable tools for study of adhesion stage and biofilm formation. IntechOpen; 2012. 830 p. <https://doi.org/10.5772/34990>.
2. Preisner O., Lopes J. A., Guiomar R., Machado J., Menezes J. C. Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy in bacteriology: towards a reference method for bacteria discrimination. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2007;387(5):1739–1748. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0851-1>.
3. Utkin D. V., Kouklev V. E., Erokhin P. S., Ossina N. A. Application of spectroscopy methods for indication and identification of pathogenic biological agents. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2011;(2):68–71. (In Russian). [https://doi.org/10.21055/0370-1069-2011-2\(108\)-68-71](https://doi.org/10.21055/0370-1069-2011-2(108)-68-71).
4. Roy A. A., Kurdish I. K., Ostapyuk S. N., Saveleyev Yu. V. Influence of the cultivation conditions of *Bacillus subtilis* IMV B-7023 and its streptomycin-resistant mutant on the surface properties of these bacteria. *Mikrobiologichnii zhurnal*. 2017;79(4):12–20. (In Russian). <https://doi.org/10.15407/microbiolj79.04.012>.
5. Suntsova A. Yu., Guliev R. R., Popov D. A., Vostrikova T. Yu., Dubodelov D. V., Shchegolikhin A. N., et al. Identification of microorganisms by fourier-transform infrared spectroscopy. *Vestnik Rossiiskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta = Bulletin of Russian State Medical University*. 2018;(4):57–65. <https://doi.org/10.24075/vrgmu.2018.046>.
6. Rodriguez-Saona L. E., Khambaty F. M., Fry F. S.,

- Dubois J., Calvey E. M. Detection and identification of bacteria in a juice matrix with Fourier transform-near infrared spectroscopy and multivariate analysis. *Journal of Food Protection*. 2004;67(11):2555-2559. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-67.11.2555>.
7. Rebuffo C. A., Schmitt J., Wenning M., von Stetten F., Scherer S. Reliable and rapid identification of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* species by artificial neural network-based Fourier transform infrared spectroscopy. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006;72(2):994-1000. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.994-1000.2006>.
8. Wenning M., Buchl N. R., Scherer S. Species and strain identification of lactic acid bacteria using FTIR spectroscopy and artificial neural networks. *Journal of Biophotonics*. 2010;3(8-9):493-505. <https://doi.org/10.1002/jbio.201000015>.
9. Ma W., Peng D., Walker S. L., Cao B., Gao C.-H., Huang Q., et al. *Bacillus subtilis* biofilm development in the presence of soil clay minerals and iron oxides. *NPJ. Biofilms and Microbiomes*. 2017;3. Article number: 4. <https://doi.org/10.1038/s41522-017-0013-6>.
10. Humbert F., Quilès F. In-situ study of early stages of biofilm formation under different environmental stresses by ATR-FTIR spectroscopy. In: *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. Bada-joz: Formatex Research Center; 2011, p. 889-895.
11. Tugarova A. V., Scheludko A. V., Dyatlova Yu. A., Filip'echeva Yu. A., Kamnev A. A. FTIR spectroscopic study of biofilms formed by the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 and its mutant *Azospirillum brasilense* Sp245.1610. *Journal of Molecular Structure*. 2017;1140:142-147. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.12.063>.
12. Kobelev A. V., Klementyev S. V., Vdovina T. V., Sirotkin A. S. Evaluation of the activity of bacterial extracellular lectins in the formation of aggregated microbial forms. *Butlerovskie soobshcheniya = Butlerov Communications*. 2021;65(1):105-113. <https://doi.org/10.37952/ROI-jbc-01/21-65-1-105>.
13. Merritt J. H., Kadouri D. E., O'Toole G. A. Growing and analyzing static biofilms. *Current Protocols in Microbiology*. 2005. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc01b01>.
14. Chabibullina A. P., Vdovina T. V., Kobeleva J. V., Sirotkin A. S. Study of the process of biological dephosphatization of model media using phosphate-accumulating bacteria. *Vestnik tekhnologicheskogo universiteta*. 2017;20(19):131-133. (In Russian).
15. Godovalov A. P., Karpunina T. I. The determination of biofilm composition of gram-positive bacteria. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2019;64(10):632-634. <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-10-632-634>.
16. Nayak N., Nag T. C., Satpathy G., Ray S. B. Ultrastructural analysis of slime positive & slime negative *Staphylococcus epidermidis* isolates in infectious keratitis. *Indian Journal of Medical Research*. 2007;125(6):767-771.
17. Litvinov R. I., Faizullin D. A., Zuev Yu. F., Weisel J. W. The α -helix to β -sheet transition in stretched and compressed hydrated fibrin clots. *Biophysical Journal*. 2012;103(5):1020-1027. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.07.046>.
18. Wang H., Ding S., Wang G., Xu X., Zhou G. In situ characterization and analysis of *Salmonella* biofilm formation under meat processing environments using a combined microscopic and spectroscopic approach. *International Journal of Food Microbiology*. 2013;167(3):293-302. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.005>.
19. Gieroba B., Krysa M., Wojtowicz K., Wiater A., Pleszczyńska M., Tomczyk M., et al. The FT-IR and raman spectroscopies as tools for biofilm characterization created by cariogenic streptococci. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(1):3811. <https://doi.org/10.3390/ijms21113811>.
20. McCutcheon J., Southam G. Advanced biofilm staining techniques for TEM and SEM in geomicrobiology: Implications for visualizing EPS architecture, mineral nucleation, and microfossil generation. *Chemical Geology*. 2018;498:115-127. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2018.09.016>.
21. Yarets Yu. I., Shauchenka N. I. A new method for the bacterial biofilms analysis in medicine. *Nauka i innovatsii*. 2016;(10):64-68. (In Russian).
22. Klementev S. V., Kobelev A. V., Sirotkin A. S. About formation of cell aggregates under the action of bacterial lectins. In: *Pishchevyte tekhnologii i biotekhnologii: materialy XVII Vserossiiskoi konferentsii molodykh uchenykh, aspirantov i studentov s mezhdunarodnym uchastiem, posvyashchennaya Godu nauki i tekhnologii v Rossiiskoi Federatsii = Food technologies and biotechnologies: materials of the XVII All-Russian Conference of Young Scientists, Postgraduates and Students with International Participation, dedicated to the Year of Science and Technology in the Russian Federation*. Kazan: Kazanskii natsional'nyi issledovatel'skii tekhnologicheskii universitet, 2021; p. 453-458. (In Russian).
23. Branda S. S., Chu F., Kearns D. B., Losick R., Kolter R. A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Molecular Microbiology*. 2006;59(4):1229-1238. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.05020.x>.
24. Epstein A. K., Pokroy B., Seminara A., Aizenberg J. Bacterial biofilm shows persistent resistance to liquid wetting and gas penetration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;108(3):995-1000. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011033108>.
25. Bisenova G. N., Torina A. K., Shegebaeva A. A. Study of the dynamics of growth of bacteria of the genera *Bacillus* and *Pseudomonas* during periodic cultivation. *Vestnik nauki Kazakhskogo agrotekhnicheskogo universiteta im. S. Seifullina = Herald of Science of S Seifullin Kazakh Agro Technical University*. 2014;82(3):3-9. (In Russian).
26. Sharipova M. R., Mardanova A. M., Rudakova N. L., Pudova D. S. Bistability and formation of the biofilm matrix as adaptive mechanisms during the stationary phase of *Bacillus Subtilis*. *Mikrobiologiya*. 2021;90(1):24-42. <https://doi.org/10.31857/S0026365620060178>.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Д. А. Файзуллин,
старший научный сотрудник,
Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ
КазНЦ РАН,
420111, г. Казань, ул. Лобачевского, 2,
Российская Федерация,
dfaizullin@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-2872-732>

Djigangir A. Faizullin,
Senior Researcher,
Kazan Institute of Biochemistry
and Biophysics, Federal Research Center
KazSC RAS,
2, Lobachevsky St., 420111, Kazan,
Russian Federation,
dfaizullin@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-2872-732X>

А. В. Кобелев,
ведущий инженер,
Казанский национальный исследовательский
технологический университет,
420015, г. Казань, ул. Карла Маркса, 68,
Российская Федерация,
alexei-ksu@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9070-739X>

Aleksei V. Kobelev,
Lead Engineer,
Kazan National Research Technological University,
68, Karl Marx St., 420015, Kazan,
Russian Federation,
alexei-ksu@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9070-739X>

С. В. Клементьев,
магистрант, техник 1 категории,
Казанский национальный исследовательский
технологический университет,
420015, г. Казань, ул. Карла Маркса, 68,
Российская Федерация,
slava_klementev3715@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5459-974X>

Svyatoslav V. Klement'ev,
Master's Student, Technician of the 1st category,
Kazan National Research Technological University,
68, Karl Marx St., 420015, Kazan,
Russian Federation,
slava_klementev3715@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5459-974X>

А. С. Сироткин,
д.т.н., профессор, заведующий кафедрой
промышленной биотехнологии,
Казанский национальный исследовательский
технологический университет,
420015, г. Казань, ул. Карла Маркса, 68,
Российская Федерация,
asirotkin66@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-4480-9907>

Alexander S. Sirotkin,
Dr. Sci. (Engineering), Professor,
Head of Industrial Biotechnology Department,
Kazan National Research Technological University,
68, Karl Marx St., 420015, Kazan,
Russian Federation,
asirotkin66@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-4480-9907>

А. М. Рогов,
инженер,
Казанский федеральный университет,
420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18,
Российская Федерация,
alexeyrogov111@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-7086-4280>

Aleksei M. Rogov,
Engineer,
Kazan Federal University,
18, Kremlevskaya St., 420008, Kazan,
Russian Federation,
alexeyrogov111@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-7086-4280>

В. В. Сальников,
заведующий лабораторией,
Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ
КазНЦ РАН,
420111, г. Казань, ул. Лобачевского, 2, Российская
Федерация,
vadim.salnikov.56@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-2367-672X>

Vadim V. Salnikov,
Head of Laboratory,
Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics,
Federal Research Center KazSC RAS,
2, Lobachevsky St., 420111, Kazan,
Russian Federation,
vadim.salnikov.56@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-2367-672X>

О. Н. Макшакова,
старший научный сотрудник,
Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ
КазНЦ РАН,
420111, г. Казань, ул. Лобачевского, 2, Российская
Федерация,

Olga N. Makshakova,
Senior Researcher,
Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics
Federal Research Center KazSC RAS,
2, Lobachevsky St., 420111, Kazan,
Russian Federation,

omega12@inbox.ru
<https://orcid.org/0000-0002-2367-672X>

Ю. Ф. Зуев,
руководитель лаборатории биофизической химии наносистем,
Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН,
420111, г. Казань, ул. Лобачевского, 2, Российская Федерация,
yufzuev@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6715-2530>

Вклад авторов

Д. А. Файзуллин – проведение экспериментов по ИК-спектроскопии.
А. В. Кобелев, С. В. Клементьев – подготовка образцов биопленок, биохимический анализ биопленок.
А. М. Рогов, В. В. Сальников – подготовка образцов для СЭМ.
Д. А. Файзуллин, О. Н. Макшакова, А. В. Кобелев, А. С. Сироткин, Ю. Ф. Зуев – проведение общего анализа результатов.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Информация о статье

Поступила в редакцию 11.07.2022.
Одобрена после рецензирования 05.09.2022.
Принята к публикации 15.09.2022.

omega12@inbox.ru
<https://orcid.org/0000-0002-2367-672X>

Yurii F. Zuev,
Head of the Laboratory of Biophysical Chemistry of Nanosystems,
Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Federal Research Center KazSC RAS,
2, Lobachevsky St., 420111, Kazan, Russian Federation,
yufzuev@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6715-2530>

Contribution of the authors

D. A. Faizullin – IR spectroscopy.
A. V. Kobelev, S. V. Klementiev – biofilm samples preparation, biochemical analysis of biofilms.
A. M. Rogov, V. V. Salnikov – samples preparation for SEM.
D. A. Faizullin, O. N. Makshakova, A. V. Kobelev, A. S. Sirotkin, Yu. F. Zuev – general analysis of the results.

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.

Information about the article

The article was submitted 11.07.2022.
Approved after reviewing 05.09.2022.
Accepted for publication 15.09.2022.

Научная статья

УДК 632.911.2

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-417-423>



Рост и взаимодействие штаммов *Trichoderma spp.* при различных температурах

Виолетта Алексеевна Писаревская, Александра Сергеевна Журавлева,
Мария Владимировна Минич, Нурлан Бешир-оглы Бехбудзада,
Антон Александрович Шагаев, Николай Семенович Марквичев

Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева,
г. Москва, Российская Федерация

Автор, ответственный за переписку: Писаревская Виолетта Алексеевна, pisarevskayaviola@mail.ru

Аннотация. Данная работа посвящена изучению роста и взаимодействия штаммов *Trichoderma spp.* при различных температурах. *Trichoderma spp.* – это род микроскопических аскомицетов, грибы рода *Trichoderma* являются членами различных экосистем и обнаруживаются в почве, ризосфере. Цель исследования – изучить и сравнить характеристики роста и взаимодействия различных представителей грибов рода *Trichoderma* между собой. Для экспериментов использовали следующие среды: среду Чапека и среду, моделирующую экссудаты корневой системы растения (огурца обыкновенного). Была определена скорость роста штаммов *Trichoderma spp.* при различных температурах. Скорость роста на среде, содержащей модели экссудатов растения, отличалась от скорости роста на богатой питательной среде, также обнаружилось различия в макроморфологии колоний. При температуре 9 °C на среде Чапека наблюдался рост штаммов *Trichoderma longibrachiatum* F2124, *Trichoderma viride* F2001; на среде, моделирующей экссудаты, – только штамма *Trichoderma longibrachiatum* F2124. При 40 °C отмечалось значительное торможение роста для всех штаммов, кроме представителей вида *Trichoderma longibrachiatum*. При температуре 50 °C роста колоний не наблюдалось. Все штаммы росли в температурном диапазоне от 12 до 28 °C. Было выдвинуто предположение о возможных различиях в характере взаимодействия представителей рода *Trichoderma* между собой при росте на различных средах. Исследовали взаимодействие между собой 3-х штаммов *Trichoderma spp.* при поверхностном культивировании в различных температурных условиях. По результатам исследования не обнаружилось значительных различий в характере взаимодействия представителей рода *Trichoderma* между собой.

Ключевые слова: *Trichoderma*, экссудаты, температура, скорость роста, взаимодействие

Для цитирования: Писаревская В. А., Журавлева А. С., Минич М. В., Бехбудзада Н. Б., Шагаев А. А., Марквичев Н. С. Рост и взаимодействие штаммов *Trichoderma spp.* при различных температурах // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2022. Т. 12. N 3. С. 417–423. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-417-423>.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Trichoderma spp. strains: growth and interaction at different temperatures

Violetta A. Pisarevskaya, Aleksandra S. Zhuravliova, Maria V. Minich,
Nurlan B. Behbudzada, Anton A. Shagaev, Nikolai S. Markvichev

Mendeleev University of Chemical Technology of Russia,
Moscow, Russian Federation

Corresponding author: Violetta A. Pisarevskaya, pisarevskayaviola@mail.ru

Abstract. The paper examines the growth of *Trichoderma spp.* strains and their interaction at different temperatures. *Trichoderma spp.* is a genus of microscopic ascomycetes; these fungi belong to different ecosystems and are found in soil (rhizosphere). The study aims to analyze and compare the characteristics pertaining to the growth of *Trichoderma* species and the interaction between them. The experiments

© Писаревская В. А., Журавлева А. С., Минич М. В., Бехбудзада Н. Б., Шагаев А. А., Марквичев Н. С., 2022

used the following media: a Czapek medium and a medium simulating plant root exudates (*Cucumis sativus*). The growth rate of *Trichoderma* spp. strains was determined at different temperatures. The use of a medium containing plant exudate models provided a different growth rate as compared to that obtained when using a rich growth medium; some variations in the macromorphology of colonies were also observed. The growth of *Trichoderma longibrachiatum* F2124 and *Trichoderma viride* F2001 strains was detected at 9 °C on the Czapek medium, while only the *Trichoderma longibrachiatum* F2124 strain was observed to grow on the medium simulating exudates. A significant growth inhibition was noted at 40 °C for all strains, except for *Trichoderma longibrachiatum* species. No colony growth was observed at 50 °C. All the strains grew within the temperature range of 12 to 28 °C. It was assumed that *Trichoderma* species growing in various media may interact differently with each other. Interaction between the three strains of *Trichoderma* spp. was examined via the surface culture method under different temperature conditions. The study found no significant differences in the interaction between the *Trichoderma* species.

Keywords: *Trichoderma*, exudates, temperature, growth rate, interaction

For citation: Pisarevskaya V. A., Zhuravliova A. S., Minich M. V., Behbudzada N. B., Shagaev A. A., Markvichev N. S. *Trichoderma* spp. strains: growth and interaction at different temperatures. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2022;12(3):417-423. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-417-423>.

ВВЕДЕНИЕ

Trichoderma spp. – род микроскопических аскомицетов. Грибы рода *Trichoderma* являются членами различных экосистем [1] и обнаруживаются в почве, ризосфере [2], обладают способностью образовывать колонии на корнях [3]. Некоторые представители рода *Trichoderma* являются эндофитными микроорганизмами для определенных растений [4], могут оказывать негативное влияние на рост некоторых грибов [5]. Помимо этого, обнаружено большое количество штаммов, развивающихся на представителях флоры и фауны водоемов [6].

Грибы рода *Trichoderma* обладают широким спектром свойств, которые могут успешно применяться в сельском хозяйстве как для борьбы с фитопатогенными культурами, так и для повышения урожайности [7, 8] некоторых растений, например, томата и салата [9]. К некоторым из таких свойств относят их низкую фитотоксичность, способность расти в направлении, наиболее благоприятном для их развития, метаболизировать экссудаты растения в качестве единственного источника питания, оказывать воздействие на состав экссудатов [10]. Исследования показывают [11, 12], что род *Trichoderma* способен в некоторых случаях снижать абиотический стресс, оказываемый на растения тяжелыми металлами в почве. Благодаря способности к микопаразитизму [13] и образованию некоторых летучих органических веществ, род *Trichoderma* может подавлять рост фитопатогенных грибов [14, 15], в том числе *Fusarium* spp. [16, 17]. Некоторые штаммы способны к синтезу антибиотиков [18, 19]. Помимо фунгицидной активности, *Trichoderma* spp. могут проявлять фитостимулирующее действие [20] за счет образования летучих органических соединений, оказывающих стимулирующее влияние на рост растения [21].

Чтобы успешно использовать все вышеперечисленные свойства *Trichoderma* spp. на практике, необходимо создать условия, в которых возможен

рост и развитие микроорганизмов. В теплицах, где фунгицидные и фитостимулирующие свойства *Trichoderma* spp. будут наиболее полезны, как правило, большая часть параметров зафиксирована. Одним из меняющихся параметров является температура. Температура напрямую влияет на скорость и возможность роста *Trichoderma* spp., на скорость образования ферментов [22]. В зоне температурного оптимума рост активный, при понижении температуры может наблюдаться снижение скорости роста, при повышении – полная гибель культуры. Поэтому важно знать диапазон температур, в котором *Trichoderma* spp. способны к росту, а при выборе штаммов для сельского хозяйства отдавать предпочтение тем, которые развиваются в более широком диапазоне температур и при этом сохраняют способность взаимодействовать с фитопатогенными микроорганизмами.

Для данного исследования были поставлены следующие задачи: сравнить скорость развития представителей рода *Trichoderma* на богатой питательной среде и на среде, моделирующей экссудаты растений; исследовать развитие различных представителей рода *Trichoderma* на среде, моделирующей экссудаты, при различных температурах; исследовать характер взаимодействия *Trichoderma* spp. между собой в диапазоне температур при росте на среде, моделирующей экссудаты.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. В качестве материалов использовались штаммы *Trichoderma viride* F2001, *Trichoderma harzianum* F2002, *Trichoderma harzianum* F2009, *Trichoderma harzianum* F2125, *Trichoderma longibrachiatum* F2123, *Trichoderma longibrachiatum* F2124, питательные агаризованные среды Чапека и моделирующие экссудаты *Cucumis sativus*. Все штаммы микроорганизмов были предоставлены коллекцией кафедры биотехнологии Российского химико-технологического университета им. Д. И. Менделеева.

В состав питательной среды Чапека входят: глюкоза – 30 г/л; дрожжевой экстракт – 5 г/л; пептон – 5 г/л; KNO_3 – 2,5 г/л; KH_2PO_4 – 1 г/л; MgSO_4 – 0,5 г/л; NaCl – 10 г/л; агар – 17,5 г/л. Питательная среда, содержащая модели экссудатов, состоит из следующих компонентов: агар – 17,5 г/л; яблочная кислота – 0,1 г/л; янтарная кислота – 0,1 г/л; лимонная кислота – 0,1 г/л; фруктоза – 0,01 г/л; дрожжевой экстракт – 0,1 г/л.

Методы. Культивирование и исследование скорости роста *Trichoderma* spp. на различных средах. Для исследования скорости роста *Trichoderma* spp. на средах, моделирующих экссудаты *Cucumis sativus*, споры вносили методом укола микробиологической иглой в центр чашки Петри с подготовленной стерильной средой фиксированного объема. Каждый вариант имел 3 повторности. В качестве сред использовали среды Чапека и среды, моделирующие экссудаты прикорневой зоны растений. Далее чашки Петри помещали в условия с различными температурами: 9, 13, 15, 20, 28, 40, 50 °С. Интервал регулирования температуры составлял ± 1 °С. На протяжении 4-х суток наблюдали рост культуры и измеряли диаметр растущей колонии. По формуле (1) устанавливали скорость роста при снятии отдельных точек:

$$r = \frac{dD}{dt} \quad (1)$$

Для исследования характера взаимодействия штаммов между собой были выбраны 3 штамма: *Trichoderma viride* F2001, *Trichoderma harzianum* F2009, *Trichoderma longibrachiatum* F2124. Споры вносили в 25 мм от края чашки таким образом, чтобы расстояние от места посева штамма до центра чашки Петри и расстояние между штаммами было одинаковое.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Культивирование и исследование скорости роста *Trichoderma* spp. на различных средах. Для исследования скорости роста штамма *Trichoderma harzianum* F2009 раз в сутки измеряли диаметр растущей колонии на агаризованной среде Чапека в чашке Петри. Измерения проводились в течение 4-х суток после посева. По результатам измерений строили график зависимости диаметра колонии от времени культивирования. Поскольку среда Чапека, используемая в лабораторных исследованиях, не может моделировать условия, существующие в прикорневой зоне растений, подобное исследование проводили в том числе на среде, моделирующей состав экссудатов прикорневой зоны (рис. 1).

По данным, представленным на рис. 1, можно отметить, что при росте на среде Чапека при температуре 28 °С *Trichoderma harzianum* F2009 имел период *lag*-фазы, фазы замедленного роста и экспоненциальной фазы. Замедление роста на 4-й день культивирования могло проявляться вследствие достижения колонией края чашки Петри и снижения концентрации компонентов пита-

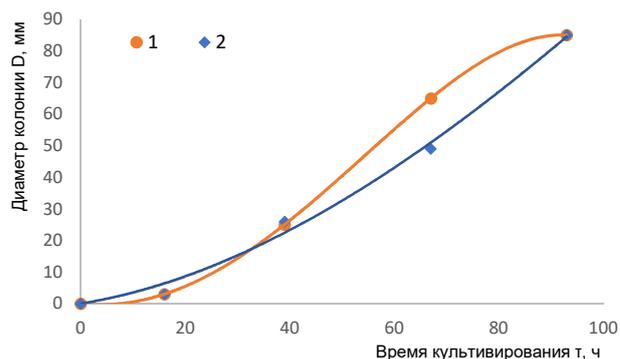


Рис. 1. Зависимость диаметра колонии *Trichoderma harzianum* F2009 от времени культивирования на агаризованной среде Чапека (1) и агаризованной среде, содержащей модели экссудатов (2), при температуре 28 °С

Fig. 1. Relationship between the diameter of the *Trichoderma harzianum* F2009 colony and the cultivation time on Czapek's agar medium (1) and on an agar medium containing model of exudates (2) at 28 °С

ния из-за диффузионных ограничений. Скорость роста измеряли по формуле (1). Для *Trichoderma harzianum* F2009, растущей на среде Чапека при температуре 28 °С, максимальное значение скорости роста достигало 0,97 мм/ч.

Полученные из рис. 1 данные свидетельствуют о том, что на среде, содержащей модели экссудатов, сохранялись те же закономерности, т. е. присутствовала *lag*-фаза, фаза ускоренного роста и экспоненциальная фаза.

Подобным образом были проанализированы данные, полученные при росте остальных представителей рода *Trichoderma* на среде Чапека и на среде, содержащей модели экссудатов, при температуре 28 °С. Закономерности роста (наличие *lag*-фазы, фазы ускоренного роста и экспоненциальной фазы) для исследуемых штаммов оставались неизменными, отличия заключались в продолжительности тех или иных фаз роста и значениях скорости роста.

Измерение скорости роста показало, что некоторые штаммы *Trichoderma* spp. при температуре 28 °С имели более высокие значения максимальной скорости роста на среде Чапека, а некоторые – на среде, моделирующей экссудаты растений. *Trichoderma viride* F2001, *Trichoderma harzianum* F2002, *Trichoderma longibrachiatum* F2123, *Trichoderma longibrachiatum* F2124 быстрее росли на среде Чапека, а *Trichoderma harzianum* F2009, *Trichoderma harzianum* F2125 – на среде, моделирующей экссудаты растений.

Аналогичные исследования были проведены для нескольких температур. В результате было выявлено, что все исследуемые штаммы растут в температурном диапазоне от 12 до 28 °С. При температуре 9 °С на среде Чапека наблюдался рост *Trichoderma viride* F2001 и *Trichoderma longibrachiatum* F2124, а на среде, моделирующей экссудаты, рос только штамм *Trichoderma longibrachiatum* F2124. При температуре 40 °С активный рост сохранялся у представителей вида

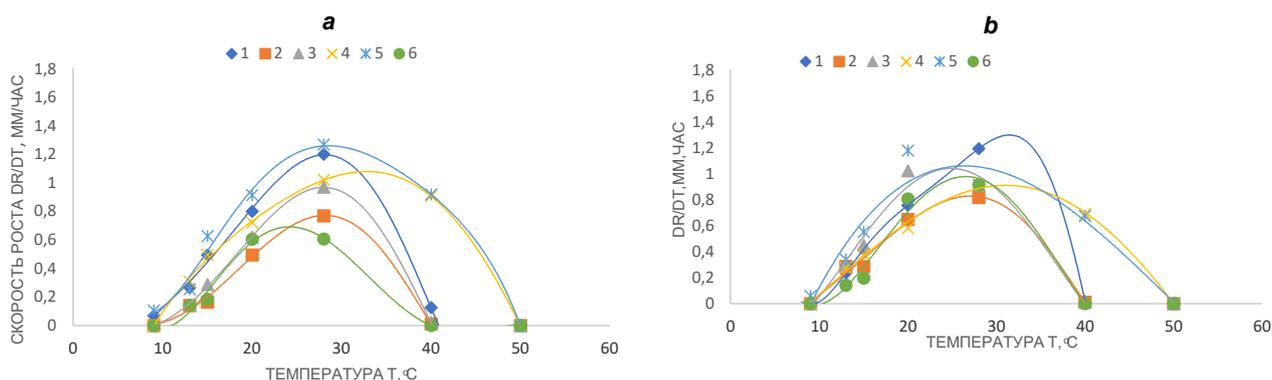


Рис. 2. Скорость роста *Trichoderma* spp. на среде Чапека (а) и на среде, моделирующей экссудаты растения (б), при различных температурах. 1 – *Trichoderma viride* F2001; 2 – *Trichoderma harzianum* F2002; 3 – *Trichoderma harzianum* F2009; 4 – *Trichoderma longibrachiatum* F2123; 5 – *Trichoderma longibrachiatum* F2124; 6 – *Trichoderma harzianum* F2125

Fig. 2. Growth rate of *Trichoderma* spp. on Czapek's medium (a) and on medium simulating plant exudates (b) at different temperatures. 1 – *Trichoderma viride* F2001; 2 – *Trichoderma harzianum* F2002; 3 – *Trichoderma harzianum* F2009; 4 – *Trichoderma longibrachiatum* F2123; 5 – *Trichoderma longibrachiatum* F2124; 6 – *Trichoderma harzianum* F2125

Trichoderma longibrachiatum, рост других видов был в значительной мере подавлен. Микроорганизмы образовывали большое количество хламидоспор, которые сохранялись в течение всего периода культивирования. При температуре 50 °С роста колоний не наблюдалось. После измерения по формуле (1) максимальной средней скорости роста всех исследуемых штаммов на среде Чапека и среде, моделирующей экссудаты, в различных температурах были построены графики зависимости средней скорости роста (в мм/ч) от температуры (рис. 2).

На рис. 2 (а, б) показано, что все исследуемые штаммы росли как на среде Чапека, так и на среде, моделирующей экссудаты корневой системы растения. Зависимость скорости роста от температуры имела колоколообразный вид, при этом диапазон температур, в котором колонии были способны к росту, отличался для различных штаммов.

По данным, представленным на рис. 2 (б), можно сделать вывод о том, что средняя скорость роста микроорганизмов на среде, моделирующей экссудаты, была в целом ниже, чем на среде Чапека. Виды *Trichoderma longibrachiatum* обладали наиболее широким температурным диапазоном, а *Trichoderma viride* F2001, *Trichoderma harzianum* F2009 и *Trichoderma longibrachiatum* F2124 имели высокую скорость роста на средах Чапека и на средах, моделирующих экссудаты. Стоит отметить, что температурный оптимум, т. е. температура, при которой наблюдалась наибольшая скорость роста, в некоторых случаях изменялся в зависимости от штамма и типа питательной среды.

Характерный тип взаимодействия *Trichoderma* spp. между собой представлен на рис. 3. На рис. 3 показано, что исследуемые штаммы при совместном культивировании не оказывали ярко выраженного угнетающего воздействия

друг на друга. В зоне контакта ухудшалось спорообразование и наблюдалось выделение метаболитов, окрашивающих среду.

По результатам экспериментов для других температур температура не оказывала влияния на тип взаимодействия между исследуемыми штаммами вплоть до 40 °С. При температуре 40 °С наблюдался активный рост лишь одного штамма – *Trichoderma longibrachiatum* F2124. Другие штаммы не развивались и образовывали большое количество хламидоспор. Микроморфология колонии в зоне контакта и в зоне чистой культуры не отличалась.



Рис. 3. Характер взаимодействия *Trichoderma* spp. между собой на среде Чапека при температуре 28 °С. 1 – *Trichoderma viride* F2001; 2 – *Trichoderma longibrachiatum* F2124; 3 – *Trichoderma harzianum* F2009

Fig. 3. Nature of the interaction of *Trichoderma* spp. among themselves on Czapek's medium at 28 °С. 1 – *Trichoderma viride* F2001; 2 – *Trichoderma longibrachiatum* F2124; 3 – *Trichoderma harzianum* F2009

ВЫВОДЫ

Все исследуемые штаммы оказались способны к поверхностному росту на среде, моделирующей экссудаты корневой системы растения.

Для всех штаммов в процессе культивирования на различных питательных средах сохранялись общие закономерности роста: было отмечено наличие *lag*-фазы, фазы ускоренного роста и экспоненциальной фазы роста.

Исследуемые штаммы имели различные диапазоны температур, при которых способны к поверхностному мицелиальному росту. Максимальная скорость роста у различных штаммов отмечалась при различных температурах.

При совместном поверхностном культивировании *Trichoderma* spp. между штаммами не наблюдалось ярко выраженного антагонизма и подавления их развития.

REFERENCES

1. Kredics L., Hatvani L., Naeimi S., Körmöczi P., Manczinger L., Vágvölgyi C., et al. Biodiversity of the genus *Hypocrea/Trichoderma* in different habitats. In: *Biotechnology and biology of Trichoderma*. Elsevier; 2014, p. 3-24. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59576-8.00001-1>.
2. Kullnig C., Szakacs G., Kubicek C. P. Molecular identification of *Trichoderma* species from Russia, Siberia and the Himalaya. *Mycological Research*. 2000;104(9):1117-1125. <https://doi.org/10.1017/S0953756200002604>.
3. Poveda J., Eugui D., Abril-Urias P. Could *Trichoderma* be a plant pathogen? Successful root colonization. In: *Trichoderma. Rhizosphere biology*. Sharma A., Sharma P. (eds.). Springer, Singapore; 2020, p. 35-59. http://dx.doi.org/10.1007/978-981-15-3321-1_3.
4. Rubini M. R., Silva-Ribeiro R. T., Pomella A. W. V., Maki C. S., Araújo W. L., dos Santos D. R., et al. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicios*, causal agent of Witches' Broom Disease. *International Journal of Biological Sciences*. 2005;1(1):24-33. <https://dx.doi.org/10.7150%2Fijbs.1.24>.
5. Kredics L., Jimenez G. L., Naeimi S., Czifra D., Urbán P., Manczinger L., et al. A challenge to mushroom growers: the green mould disease of cultivated champignons. In: *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*. Méndez-Vilas A. (ed.). FORMA-TEX; 2010, p. 295-305.
6. Höller U., Wright A. D., Matthee G. F., König G. M., Draeger S., Aust H.-J., et al. Fungi from marine sponges: diversity, biological activity and secondary metabolites. *Mycological Research*. 2000;104(11):1354-1365. <http://dx.doi.org/10.1017/S0953756200003117>.
7. Zin N. A., Badaluddin N. A. Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications. *Annals of Agricultural Sciences*. 2020;65(2):168-178. <https://doi.org/10.1016/j.aos.2020.09.003>.
8. Monte E. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *International Journal of Microbiology*. 2001;4(1):1-4. <https://doi.org/10.1007/s101230100001>.
9. Sani M. N. H., Hasan M., Uddain J., Subramaniam S. Impact of application of *Trichoderma* and biochar on growth, productivity and nutritional quality of tomato under reduced N-P-K fertilization. *Annals of Agricultural Sciences*. 2020;65(1):107-115. <https://doi.org/10.1016/j.aos.2020.06.003>.
10. Lucini L., Colla G., Moreno M. B. M., Bernardo L., Cardarelli M., Terzi V., et al. Inoculation of *Rhizoglyphus irregularis* or *Trichoderma atroviride* differentially modulates metabolite profiling of wheat root exudates. *Phytochemistry*. 2019;157:158-167. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.10.033>.
11. Caporale A. G., Sommella A., Lorito M., Lombardi N., Azam S. M. G. G., Pigna M., et al. *Trichoderma* spp. alleviate phytotoxicity in lettuce plants (*Lactuca sativa* L.) irrigated with arsenic-contaminated water. *Journal of Plant Physiology*. 2014;171(15):1378-1384. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.05.011>.
12. Vargas J. T., Rodríguez-Monroy M., Meyer M. L., Montes-Belmont R., Sepúlveda-Jiménez G. *Trichoderma asperellum* ameliorates phytotoxic effects of copper in onion (*Allium cepa* L.). *Environmental and Experimental Botany*. 2017;136:85-93. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.01.009>.
13. López-Mondéjar R., Ros M., Pascual J. A. Mycoparasitism-related genes expression of *Trichoderma harzianum* isolates to evaluate their efficacy as biological control agent. *Biological Control*. 2011;56(1):59-66. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.10.003>.
14. Rajani P., Rajasekaran C., Vasanthakumari M. M., Olsson S. B., Ravikanth G., Shaanker R. U. Inhibition of plant pathogenic fungi by endophytic *Trichoderma* spp. through mycoparasitism and volatile organic compounds. *Microbiological Research*. 2021;242:126595. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126595>.
15. Metz N., Hausladen H. *Trichoderma* spp. as potential biological control agent against *Alternaria solani* in potato. *Biological Control*. 2022;166:104820. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104820>.
16. Jambhulkar P. P., Raja M., Singh B., Katoch S., Kumar S., Sharma P. Potential native *Trichoderma* strains against *Fusarium verticillioides* causing post flowering stalk rot in winter maize. *Crop Protection*. 2021;152:105838. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105838>.
17. Carvalho D. D. C., Junior M. L., Martins I., Ingulis P. W., Mello S. C. M. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by *Trichoderma harzianum* and its use for common bean seed treatment. *Tropi-*

cal Plant Pathology. 2014;39(5):384-391. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762014000500005>.

18. Cherif M., Benhamou N. Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f. sp. radices-lycopersici. *Phytopathology*. 1990;80(12):1406-1414. <https://doi.org/10.1094/PHTO-80-1406>.

19. Shakeri J., Foster H. A. Proteolytic activity and antibiotic production by *Trichoderma harzianum* in relation to pathogenicity to insects. *Enzyme and Microbial Technology*. 2007;40(4):961-968. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.07.041>.

20. Juan Z., Ting L., Wei-Cheng L., Dian-Peng Z., Dan D., Hui-Ling W., et al. Transcriptomic insights into growth promotion effect of *Trichoderma afroharzia-*

num TM2-4 microbial agent on tomato plants. *Journal of Integrative Agriculture*. 2021;20(5):1266-1276. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(20\)63415-3](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(20)63415-3).

21. da Silva L. R., Valadares-Inglis M. C., Peixoto G. H. S., de Luccas B. E. G., Costa Muniz P. H. P., Magalhães D. M., et al. Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma azevedoi* promote the growth of lettuce plants and delay the symptoms of white mold. *Biological Control*. 2021;152:104447. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104447>.

22. Rosyida V. T., Indrianingsih A. W., Maryana R., Wahono S. K. Effect of temperature and fermentation time of crude cellulase production by *Trichoderma Reesei* on straw substrate. *Energy Procedia*. 2015;65:368-371. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2015.01.065>.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

В. А. Писаревская,

студентка,
Российский химико-технологический университет
им. Д. И. Менделеева,
125480, г. Москва, ул. Героев Панфиловцев, 20,
Российская Федерация,
pisarevskayaviola@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-2219-5801>

А. С. Журавлева,

магистрант,
Российский химико-технологический университет
им. Д. И. Менделеева,
125480, г. Москва, ул. Героев Панфиловцев, 20,
Российская Федерация,
Sashka.zhuravliova@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4969-0765>

М. В. Минич,

аспирант,
Российский химико-технологический университет
им. Д. И. Менделеева,
125480, г. Москва, ул. Героев Панфиловцев, 20,
Российская Федерация,
Mminich8@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-8791-0271>

Н. Б. Бехбудзада,

аспирант,
Российский химико-технологический университет
им. Д. И. Менделеева,
125480, г. Москва, ул. Героев Панфиловцев, 20,
Российская Федерация,
nnurlik@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-0082-331X>

А. А. Шагаев,

ассистент,
Российский химико-технологический университет
им. Д. И. Менделеева,
125480, г. Москва, ул. Героев Панфиловцев, 20,
Российская Федерация,
shagaev.a.a@muctr.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8478-1160>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Violetta A. Pisarevkaia,

Student,
Mendeleev University of Chemical Technology
of Russia,
20, Geroev Panfilovtsev St., 125480, Moscow,
Russian Federation,
pisarevskayaviola@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-2219-5801>

Aleksandra S. Zhuravliova,

Master Student,
Mendeleev University of Chemical Technology
of Russia,
20, Geroev Panfilovtsev St., 125480, Moscow,
Russian Federation,
Sashka.zhuravliova@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4969-0765>

Maria V. Minich,

Postgraduate Student,
Mendeleev University of Chemical Technology
of Russia,
20, Geroev Panfilovtsev St., 125480, Moscow,
Russian Federation,
Mminich8@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-8791-0271>

Nurlan B. Behbudzada,

Postgraduate Student,
Mendeleev University of Chemical Technology
of Russia,
20, Geroev Panfilovtsev St., 125480, Moscow,
Russian Federation,
nnurlik@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-0082-331X>

Anton A. Shagaev,

Assistant,
Mendeleev University of Chemical Technology
of Russia,
20, Geroev Panfilovtsev St., 125480, Moscow,
Russian Federation,
shagaev.a.a@muctr.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8478-1160>

Н. С. Марквичев,

к.т.н., доцент,
Российский химико-технологический университет
им. Д. И. Менделеева,
125480, г. Москва, ул. Героев Панфиловцев, 20,
Российская Федерация,
markvichev.n.s@muctr.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1595-2210>

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.

Информация о статье

Поступила в редакцию 13.03.2022.
Одобрена после рецензирования 14.09.2022.
Принята к публикации 15.09.2022.

Nikolai S. Markvichev,

Cand. Sci. (Engineering), Associate Professor,
Mendeleev University of Chemical Technology
of Russia,
20, Geroev Panfilovtsev St., 125480, Moscow,
Russian Federation,
markvichev.n.s@muctr.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1595-2210>

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.

Information about the article

*The article was submitted 13.03.2022.
Approved after reviewing 14.09.2022.
Accepted for publication 15.09.2022.*

Научная статья

УДК 579.22

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-424-437>



Эндогенные фталаты как вероятный регулятор межвидовых взаимоотношений в биоценозе

Людмила Алексеевна Максимова, Татьяна Николаевна Шафикова

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

Автор, ответственный за переписку: Максимова Людмила Алексеевна, VendyS@yandex.ru

Аннотация. Согласно преобладающему мнению, фталаты считаются исключительно ксенобиотиками-поллютантами, а широкое распространение их в окружающей среде – следствие облегченной диффузии этих соединений из пластмассовых изделий. В экспериментах по влиянию синтетических фталатов на живые организмы выявлено их крайне негативное действие на метаболизм животных и человека. Механизм действия этих соединений лиганд-рецепторный. Фталаты отнесены к категории эндокринных дизрапторов, наряду с диоксинами, полихлорированными бифенилами и пр. Однако к настоящему моменту накоплены факты, доказывающие естественное происхождение фталатов. В культуре водорослей был произведен биосинтез фталатов *de novo* из меченых предшественников. Фталаты были обнаружены в закрытых экспериментальных системах – культурах клеток высших растений. Фталаты были выделены из ряда видов бактерий, грибов, низших и высших растений, находящихся вдали от источников техногенного загрязнения. Концепция биогенеза фталатов предполагает наличие функции этих соединений в живых системах. Они обладают бактерицидным и фунгицидным действием и входят в состав аллелопатических экссудатов, подавляя рост конкурирующих видов растений. Фталаты демонстрируют инсектицидные и репеллентные свойства. Прослеживается аналогия в действии фталатов и эндокринных дизрапторов другой химической категории – фитоэстрогенов, направленных на регуляцию численности популяции травоядных млекопитающих. Выдвигается гипотеза о биологической роли эндогенных фталатов растений как соединений вторичного метаболизма преимущественно с защитной функцией, участвующих в сети межвидовых взаимодействий между растениями, животными, грибами и микроорганизмами. Следует отметить, что синтетические и эндогенные фталаты имеют существенные стереохимические различия, что может являться причиной разнонаправленности их воздействия на живые организмы.

Ключевые слова: эндогенные фталаты, фитоэстрогены, эндокринные дизрапторы, лиганд-рецепторное взаимодействие, межвидовые взаимоотношения

Финансирование. Работа выполнена в рамках проекта под номером государственной регистрации 121031300011-7.

Для цитирования: Максимова Л. А., Шафикова Т. Н. Эндогенные фталаты как вероятный регулятор межвидовых взаимоотношений в биоценозе // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2022. Т. 12. N 3. С. 424–437. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-424-437>.

PHISICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Endogenous phthalates as a prospective regulator of interspecific relations in a biocoenosis

Lyudmila A. Maksimova, Tatiana N. Shafikova

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk, Russian Federation
Corresponding author: Lyudmila A. Maksimova, VendyS@yandex.ru

Abstract. It is widely believed that phthalates are xenobiotic pollutants whose prevalence in the environment is associated with their facilitated diffusion from plastic materials. Studies into the effect of synthetic phthalates on living organisms revealed their extremely negative action on the metabolism of animals and humans. The acting mechanism

© Максимова Л. А., Шафикова Т. Н., 2022

of these compounds is realised through a ligand-receptor pathway. Along with dioxins, polychlorinated biphenyls and similar compounds, phthalates are classified as endocrine disrupters. However, at present, sufficient evidence has been accumulated confirming the natural origin of phthalates. Thus, phthalates were de novo biosynthesised from labelled precursors in an algae culture. These compounds were detected in closed experimental systems, including cell cultures of highest plants, as well as those isolated from a number of bacterial, fungi, lowest and highest plant forms located far from the sources of technogenic pollution. The concept of phthalate biogenesis assumes the action of these compounds on living systems. Phthalates exhibit bactericidal and fungicidal action and compose allelopathic exudates, suppressing the growth of competing plant forms. Phthalates possess insecticidal and repellent properties. An analogy can be traced between the action of phthalates and endocrine disrupters of another chemical category, namely phytoestrogens, which regulate herbivorous mammal populations. A hypothesis is proposed about the biological role of endogenous plant phthalates representing secondary metabolic compounds. Exhibiting predominantly a shielding function, these compounds participate in the network of interactions between plants, animals, fungi and microorganisms. It should be noted that synthetic and endogenous phthalates are characterised by essential stereochemical differences, which can explain their different action on living organisms.

Keywords: endogenous phthalates, phytoestrogens, endocrine disrupters, ligand-receptor interaction, interspecific relations

Funding. The work was performed within the framework of the project under the state registration number 121031300011-7.

For citation: Maksimova L. A., Shafikova T. N. Endogenous phthalates as a prospective regulator of interspecific relations in a biocoenosis. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2022;12(3):424-437. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-424-437>.

ВВЕДЕНИЕ

Фталаты (сложные эфиры о-фталевой кислоты) обнаруживаются в окружающей среде практически повсеместно: в сточных водах, почве, воздухе, продуктах питания [1–6]. На сегодняшний день имеются две концепции, рассматривающие появление фталатов в окружающей среде и их влияние на живые организмы. Согласно первой, фталаты наиболее известны как продукты химической промышленности, применяемые в качестве пластификаторов при производстве пластмасс. Фталаты не связаны химически с полимерной матрицей, поэтому легко высвобождаются в окружающую среду. Фталаты расцениваются исключительно как ксенобиотики, попадающие в окружающую среду вследствие интенсивного загрязнения отходами промышленных производств, а также десорбции из бытового пластика. Синтетические фталаты не проявляют острой токсичности [7], благодаря чему стало возможным допущение их использования при производстве пищевого и бытового пластика. Тем не менее они обладают биологической активностью, наряду с диоксинами, полихлорированными бифенилами, полибромидными дифениловыми эфирами, акриламидами, бисфенолом А, ДДТ и его метаболитами внесены в категорию эндокринных дизрапторов – химических соединений, способных нарушать механизмы регуляции живых организмов на уровне гормональных клеточных рецепторов [8]. Проведенные исследования свидетельствуют о крайне негативном воздействии синтетических фталатов на организм животных, в том числе человеческий [9, 10]. По роковому совпадению фталаты имеют востребованные технологические свойства, и их мировое производство достигает около 5 млн тонн ежегодно. Согласно второй концепции, фталаты в том числе являются продуктами био-

синтеза и широко распространены среди живых организмов. Цель данной работы – обсуждение функциональной роли эндогенных фталатов как вероятного регулятора межвидовых взаимодействий в биоценозе.

ЭНДОГЕННЫЕ ФТАЛАТЫ

К настоящему времени накоплено немало сведений об обнаружении эндогенных фталатов. Упоминания о них присутствуют в научной литературе начала прошлого века, т. е. до активного развития химической промышленности [11]. Эндогенные фталаты обнаружены у бактерий, в грибах, низших и высших растениях. В 1981 г. И. В. Егоров и соавторы сообщили об обнаружении фталатов среди метаболитов листьев пшеницы [12]. Эти соединения обнаружены в красных [13] и пресноводных водорослях, цианобактериях [14], в грибах *Penicillium bilaii* [15], *Aspergillus awamori* [16], *Aspergillus fumigatus* [17], а также в растениях различных семейств высших таксонов: Эльзаавели и др. сообщают, что субтропическое растение *Rumex janonicus* Houtt. продуцирует диэтилфталат [18]; в экстрактах лекарственного растения *Nepeta kurramensis* были идентифицированы бис(2-этилкозил)фталат и бис(Е)-2-(гидроксиметил)нонадек-3-енил)фталат [19]; в экстракте листьев *Sajanus sajan* – дибutilфталат (ДБФ) [20]. Примечательно, что в растениях содержание фталатов имеет качественные и количественные различия, в зависимости от их локализации в различных органах растения [21]. Фталаты были обнаружены у ряда видов растений, взятых из естественной среды обитания *in situ*. Растения были разных таксономических групп, разных экологических специализаций и произ-

растали в разных регионах России, удаленных от промышленных центров [22].

Фталаты были также выявлены у бактерии *Streptomyces narsi* [23]. У *Streptomyces* штамма KX852460 был выделен и идентифицирован эндогенный ДБФ, обладающий фунгицидной активностью в отношении возбудителя пятнистости листьев табака *Rhizoctonia solani* [24]. ДБФ и ди(2-этилгексил)фталат (ДЭГФ) входят в число биоактивных соединений, выделенных из морских *Pseudomonas* sp. [25]. Сообщается об обнаружении ДБФ и ДЭГФ у *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum*, *Rhizobium rhizogenes*, *Rhizobium radiobacter* и *Escherichia coli* [26]. *Helicobacter pylori* выделяет диэтилфталат в качестве фактора хемотаксиса [27]. Вместе с тем фталаты в бактериальной клетке могут быть результатом не только биосинтеза, но и накопления промежуточных продуктов широко известного фталатного пути деградации полициклических ароматических углеводородов [28].

Основное возражение против концепции естественного происхождения фталатов заключается в утверждении, что эндогенными могут быть ошибочно расценены фталаты, каким-либо образом попавшие в исследуемый образец извне [29]. Однако фталаты обнаруживаются в закрытых экспериментальных системах с контролируемыми условиями роста – в растениях и культурах клеток, выращиваемых *in vitro*. Авторы подчеркивают, что особое внимание в этих экспериментах отводилось проверке реактивов и оборудования на предмет артефактного содержания фталатов [30]. Самым очевидным способом разрешить все *pro et contra* явилось бы осуществление биосинтеза фталатов *de novo* из меченых предшественников, и такое исследование было проведено. Лабораторные культуры пресноводных водорослей и цианобактерий культивировали, используя в качестве единственного источника углерода стабильный изотоп ^{13}C в составе $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$, включение которого и было зарегистрировано во фталатах, выделенных из перечисленных организмов [14]. Таким образом, были получены прямые доказательства принципиальной возможности биосинтеза фталатов. Сравнительный анализ содержания фталатов в клетках растительной биоты показывает, что их количество значительно превышает суммарное производство фталатов мировой химической промышленностью [31], и это означает, что значительная часть обнаруживаемых соединений, скорее всего, имеет естественное происхождение.

БИОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ЭНДОГЕННЫХ ФТАЛАТОВ

Концепция биогенеза фталатов предполагает их функциональную значимость. Ряд авторов [15, 32] безоговорочно позиционирует фталаты как вторичный метаболит растений. Известно, что именно

вторичные метаболиты обеспечивают межвидовое взаимодействие в биоценозе (защита от организмов других видов или, напротив, их привлечение [33, 34]). Действительно, фталаты обладают антимикробными свойствами, отпугивают насекомых и воздействуют на метаболизм млекопитающих. В экстрактах бурых водорослей *Sargassum wightii* был идентифицирован диоктилфталат с антибактериальной активностью [35]. В ряде работ выявлена антимикробная активность фталатов по отношению к грамположительным и грамотрицательным патогенам человека [36]. Антибактериальные свойства фталаты проявляют в подавлении роста симбионтов растений *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* [37]. ДЭГФ и ДБФ подавляли рост и биопленкообразование фитопатогенов *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* и *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* [38]. ДЭГФ снижает уровень метаболизма почвенных бактерий, а также многообразие видов и их соотношение в почве [39, 40].

В свою очередь, микроорганизмы могут успешно разлагать фталаты до низкомолекулярных интермедиатов. К числу таких относятся бактерии родов *Sphingomonas* sp., *Comamonas* sp., *Pseudomonas* sp., *as Arthrobacter* sp. и *Rhodococcus* sp., а также *Gordonia* [41], *Thaueria* sp., *Xanthobacter* sp. и *Agrobacterium* sp. [42], *Azoarcus* sp. [43], *Ochrobactrum anthropic* [44], *Acinetobacter* sp. [45]. Из *Acinetobacter* sp. был выделен ген дибутылфталат гидролазы [40], из *Gordonia* – ген 3,4-phthalate dioxygenase [46]. Р. Дж. Райт и соавторы обнаружили у *Mycobacterium* sp. гены фталатдиоксигеназы и дигроксифталатдекарбоксилазы [47]. Сообщается о способности грибов рода *Fusarium* деградировать ДЭГФ [48].

Как оказалось, фталаты оказывают системное воздействие на организм растений как наземных, так и водных форм [49]. Влияние растений на конкурирующие виды, называемое аллелопатическим, направлено на подавление клеточного деления и ферментативной активности, нарушение синтеза эндогенных фитогормонов и пигментов, угнетение фотосинтеза и дыхания, ингибирование синтеза белков и нуклеиновых кислот, нарушение водного баланса и минерального питания и в итоге на подавление прорастания семян и роста растений [50]. Большинство из перечисленного присуще действию фталатов на растения. Т. Д. Сюань и др. расценивают фталаты и производные фталевой кислоты как фитотоксичные соединения [18]. Известно, что фталаты у растений ингибируют действие топоизомераз I и II [51], а также подавляют синтез индолилуксусной кислоты (ИУК) и гиббереллинов [52], что закономерно отражается на снижении митотического индекса [53, 54], а также в замедлении прорастания семян, роста корней, стеблей и накопления биомассы [55]. Фталаты значительно снижают содержание хлорофилла а и b [55]; индуцируют окислительный стресс в клетках растений, приводящий к накоплению АФК и повреждению мембран хлоропластов и митохондрий, накоплению малонового альдегида и интоксика-

ции клеток [56, 57]. ДБФ – антиметаболит пролина, важного компонента клеточной защиты растений при стрессе [58]. ДБФ ингибирует действие α-глюкозидазы и маннозидаз [59]. Ежовник обыкновенный (*Echinochloa crusgalli*) – широко распространенный сорняк, который приносит существенный урон посевам риса, в составе его корневого экссудата обнаружен диэтилфталат [18]. ДБФ входит в состав листовых экссудатов эвкалипта, известного своим аллелопатическим действием [60]. ДБФ присутствует среди аллелосоединений, выделенных из растений *Pogostemon cablin* и ризосферной почвы [61].

Синтез растениями соединений, токсичных для растительоядных животных, очевидно предназначен для предотвращения избыточного повреждения и снижения численности растительной популяции. Фталаты демонстрируют инсектицидные и репеллентные свойства. Синтетический диметилфталат – самый первый промышленный репеллент против кровососущих насекомых, был впервые применен в 1929 г. и использовался очень долго [62]. В вытяжке из *Angelica sinensis* (*Umbelliferae*), растения с выраженными репеллентными свойствами против москитов, были обнаружены диизооктилфталат и моно(2-этилгексил)фталат [63]. Культуры энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana* использовались для поражения капустной моли *Plutella xylostella*. В погибших личинках было обнаружено максимальное количество диизооктилфталата. В здоровых личинках фталаты отсутствовали [64]. Н. О. Шейкер и др. [65] зафиксировали присутствие ДЭГФ в этилацетатной фракции вторичных метаболитов другого энтомопатогенного гриба *Cladosporium cladosporioides*, успешно уничтожающего взрослых особи и личинки хлопковой тли *Aphis gossypii*. В лекарственном растении *Nepeta kurramensis*, известном также своими репеллентными свойствами против насекомых, обнаружен бис(2-этилкозил)фталат, а также новый фталат, названный курраминатом, по химической формуле представляющий собой бис(Е)-2-(гидроксиметил)нонадек-3-енил)фталат [19]. Экстракт листьев *Sajanus sajan* был высокоэффективен против личинок комара *Culex vishnui* – переносчика возбудителя японского энцефалита. В его этилацетатной фракции было идентифицировано 18 соединений, в том числе ДБФ. Авторы вместе с тем предполагают, что основной причиной гибели личинок являются соединения флавоноидной группы [66]. В то же время Т. Пол и соавторы показали, что присутствие ДБФ в среде проявляет аттрактивные свойства и существенно изменяет поведение личинок *Caenorhabditis elegans* на хемосенсорном уровне [67].

Механизм действия фталатов на животных основывается на их конформационном сходстве с гормонами, на этом основании их вносят в категорию эндокринных дизрапторов, т. е. соединений, изменяющих исходный гормональный баланс в организме [68]. Так, известно, что фталаты являются антагонистами глюкокортикоид-

ных рецепторов [69], прогестероновых [70], арил-гидрокарбонных [71], инсулиновых и лептиновых [72], эстрогеновых [73], андрогенного рецептора и конститутивного рецептора андростанов, ретиноидного X-рецептора [74], ядерного рецепторного белка, активируемого пролифератором пероксисом (PPARα, β, and γ) [75]. Действие этих соединений, ведущее к угнетению жизнедеятельности животного организма, оказалось столь обширно (сердечно-сосудистая [76], репродуктивная система [77], нервная [78] и иммунная системы [79]), что их рассматривают уже как метаболические дизрапторы [80]. Кроме того, путем метилирования ДНК фталаты модифицируют эпигеном [81, 82], и их действие может сохраняться на протяжении нескольких поколений.

Однако влияние фталатов на организм животных далеко не так однозначно. Фталаты (ДБФ и ДЭГФ) являются ингибиторами катепсина В, провоцирующего обострение ряда патологий, а именно развитие воспалительного процесса, вирусных инфекций, панкреатит, остеопороз, метастазирование раковых клеток [25]. Высказывается мнение о том, что результаты экспериментальных данных, полученные на лабораторных животных, следует экстраполировать на человеческий организм достаточно осторожно. Известны случаи, когда полученные на крысах сведения о крайне негативном влиянии фталатов не подтверждаются на мышках и приматах и не совпадают с эпидемиологическими данными [83]. Следует также учитывать, что синтетические и природные фталаты имеют существенные стереохимические различия, что может иметь функциональное значение [31]. Поскольку экспериментальные исследования проводились с использованием синтетических соединений, известные негативные последствия могут быть отнесены только к ним. На сегодняшний день крайне мало известно о метаболизме эндогенных фталатов, которые с учетом их широкого распространения среди живых организмов различных таксонов могут оказаться немаловажными участниками физиологических процессов. Вероятнее всего, эндогенные фталаты модулируют механизмы регуляции отдельных звеньев метаболизма.

Действие природных эндокринных дизрапторов в биоценозе можно рассмотреть на примере другого типа соединений с аналогичным механизмом действия – фитоэстрогенов. Фитоэстрогены – гормоноподобные вещества, обладающие сродством с эстрадиоловыми рецепторами. Фитоэстрогены включают в себя различные классы соединений (изофлавоны, изофлавананы, лигнаны, куместаны [68]) и участвуют в межвидовых взаимоотношениях. Фитоэстрогены синтезируются в грибах и растениях и также обладают защитным действием. Так, изофлавоны растений действуют как фитоалексины, подавляя рост микроорганизмов [84] и грибов [85]. Вместе с тем изофлавоны генистеин является ключевым сигнальным соединением при становлении симбиотических взаимоотношений между микроорганизмами *Bradyrhizobium japonicum*, *Delftia*



Гипотетическая схема участия эндогенных фталатов в регуляции межвидовых взаимоотношений в биоценозе
Hypothetical scheme of endogenous phthalates participation in the regulation of interspecies relationships in the biocenosis

и растением *Glycine max* [86], являясь также специфическим аттрактантом для бактерий рода *Rhizobium* и микоризообразующих грибов рода *Glomus* [87]. Широко известно действие фитоэстрогенов, связанное со способностью модулировать репродуктивный процесс у млекопитающих. Классическим примером стала «клеверная болезнь» овец, вызванная существенным преобладанием в рационе животных клевера *Trifolium subterraneanum* с высоким содержанием фитоэстрогенов куместролов и изофлавоноидов. Результатом стало резкое снижение плодовитости животных [88]. Аналогичные примеры прослеживаются и в других случаях межвидовых взаимодействий растений, синтезирующих фитоэстрогены, и травоядных животных. Ряд авторов закономерно расценивает фитоэстрогены как защитные соединения, позволяющие регулировать численность травоядных животных [89, 90]. С учетом выявленного широкого распространения фталатов среди растений вполне логично предположить у них, подобно фитоэстрогенам, наличие функции эффективной защиты растительной популяции от давления растительноядных животных путем угнетения их метаболизма и снижения плодовитости. Следует отметить, что фталаты – вещества практически без запаха и, скорее всего, без вкуса, поэтому растительноядные животные не могут выработать рефлекторного избегания фталатсодержащих растений в рационе.

Вышеприведенные факты обобщены и представлены в виде гипотетической схемы на рисунке. Эндогенные фталаты синтезируются, по-види-

мому, преимущественно растениями, но также их синтез может осуществляться бактериями и грибами. Действие растительных фталатов направлено на защиту от бактерий и животных организмов, тогда как грибы используют эти соединения как инструмент хищничества. Примечательно успешное аллопатическое применение фталатов растениями в конкурентной борьбе, предположительно, что подобным образом эти соединения могут использовать бактерии и грибы. Вопрос о том, применяют ли бактерии эти метаболиты как фактор патогенности против растений и животных, остается открытым, на сегодняшний день такие данные в литературе отсутствуют.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эндогенные фталаты – это биологически активные соединения, синтезируемые растениями, грибами и микроорганизмами. Эндогенные фталаты растений обладают аллопатическими свойствами, а также защищают растение от микроорганизмов, грибов и растительноядных животных. Прослеживается аналогия в действии эндокринных дизрапторов естественного происхождения разной химической природы (фталаты и фитоэстрогены) на растительноядных животных. Предположительно эндогенные фталаты являются высокоэффективными участниками регуляции в сложной сети межвидовых взаимоотношений в биоценозе между микроорганизмами, грибами, растениями и животными.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Gao D. W., Wen Z. D. Phthalate esters in the environment: a critical review of their occurrence, biodegradation, and removal during wastewater treatment processes // *Science of the Total Environment*. 2016. Vol. 541. P. 986–1001. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.148>.
2. Xu Q., Yin X., Wang M., Wang H., Zhang N., Shen Y., et al. Analysis of phthalate migration from plastic containers to packaged cooking oil and mineral water // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010. Vol. 58. P. 11311–11317. <https://doi.org/10.1021/jf102821h>.
3. Yuan H., Hao Q., Su R., Qi W., He Z. Migration of phthalates from polyvinyl chloride film to fatty food simulants: experimental studies and model application // *Journal of Consumer Protection and Food Safety*. 2020. Vol. 15. P. 135–143. <https://doi.org/10.1007/s00003-019-01249-x>.
4. Lv M., Gao W., Li J., Ye X., Xu T., Liu L., et al. Identification of zones contaminated with phthalates and polycyclic aromatic hydrocarbons by concentrations in gridded soil with 1/6° latitude by 1/4° longitude resolution: a case study of Zhejiang, China // *Journal of Soils and Sediments*. 2021. Vol. 22. P. 67–68. <https://doi.org/10.1007/s11368-021-03075-x>.
5. Rezaei H., Moazzen M., Shariatifar N., Khaniki G. J., Dehghani M. H., Arabameri M., et al. Measurement of phthalate acid esters in non-alcoholic malt beverages by MSPE-GC/MS method in Tehran city: chemometrics // *Environment Science and Pollution Research*. 2021. Vol. 28. P. 51897–51907. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14290-x>.
6. Ouédraogo D. Y., Delaunay M., Sordello R., Hédouin L., Castelin M., Perceval O., et al. Evidence on the impacts of chemicals arising from human activity on tropical reef-building corals; a systematic map // *Environmental Evidence*. 2021. Vol. 10, no. 22. Article number 22. <https://doi.org/10.1186/s13750-021-00237-9>.
7. Штейфель В. О. Вредные вещества в промышленности. М.: Химия, 1991. 592 с.
8. Яглова Н. В., Яглов В. В. Эндокринные дизрапторы – новое направление исследований в эндокринологии // *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2012. Т. 67. N 3. С. 56–61. <https://doi.org/10.15690/vramn.v67i3.186>.
9. Kay V. R., Bloom M. S., Foster W. G. Reproductive and developmental effects of phthalate diesters in males // *Critical Reviews in Toxicology*. 2014. Vol. 44, no. 6. P. 467–498. <https://doi.org/10.3109/10408444.2013.875983>.
10. Yuan X. S., Li C. Phthalates in house and dormitory dust: occurrence, human exposure and risk assessment // *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2021. Vol. 106. P. 393–398. <https://doi.org/10.1007/s00128-020-03058-7>.
11. Parry E. J. The chemistry of essential oils and artificial perfumes. London: Scott, Greenwood and Son, 1922. Vol. 2. 365 p.
12. Egorov I. V., Gramenitskaya V. N., Vul'fson N. S. Low-molecular-weight metabolites of wheat. I. Components of an ethereal extract of wheat leaves // *Chemistry of Natural Compounds*. 1981. Vol. 17. P. 574–579. <https://doi.org/10.1007/BF00574380>.
13. Chen Ch. Yu. Biosynthesis of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and di-*n*-butyl phthalate (DBP) from red alga – *Bangia atropurpurea* // *Water Research*. 2004. Vol. 38, no. 4. P. 1014–1018. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.11.029>.
14. Babu B., Wu J.-T. Production of phthalate esters by nuisance freshwater algae and cyanobacteria // *Science of the Total Environment*. 2010. Vol. 408, no. 21. P. 4969–4975. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.07.032>.
15. Savard M. E., Miller J. D., Blais L. A., Seifert R. F., Samson R. A. Secondary metabolites of *Penicillium bilaii* strain PB-50 // *Mycopathologia*. 1994. Vol. 127. P. 19–27. <https://doi.org/10.1007/BF01104007>.
16. Lotfy M. M., Hassan H. M., Hetta M. H., El-Genidy A. O., Mohammed R. Phthalate, a major bioactive metabolite with antimicrobial and cytotoxic activity isolated from River Nile derived fungus *Aspergillus awamori* // *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*. 2018. Vol. 7, no. 3. P. 263–269. <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2018.02.002>.
17. Ye K., Ai H. L., Liu J. K. Identification and bioactivities of secondary metabolites derived from endophytic fungi isolated from ethnomedicinal plants of Tujia in Hubei province: a review // *Natural Products and Bioprospecting*. 2021. Vol. 11. P. 185–205. <https://doi.org/10.1007/s13659-020-00295-5>.
18. Xuan T. D., Chung I. M., Khanh T. D., Tawata S. Identification of phytotoxic substances from early growth of barnyard grass (*Echinochloa crusgalli*) root exudates // *Journal of Chemical Ecology*. 2006. Vol. 32. P. 895–906. <https://doi.org/10.1007/s10886-006-9035-x>.
19. Rehman N. U., Ahmad N., Hussain J., Ali L., Hussein H., Bakht N., et al. One new phthalate derivative from *Nepeta kurramensis* // *Chemistry of Natural Compounds*. 2017. Vol. 53. P. 426–428. <https://doi.org/10.1007/s10600-017-2014-3>.
20. Rawani A. Larvicidal efficacy of the mature leaf extract of *Cajanus cajan* against the vector of Japanese encephalitis // *International Journal of Tropical Insect Science*. 2021. Vol. 41. P. 1155–1161. <https://doi.org/10.1007/s42690-020-00300-x>.
21. Shafaghat A., Salimi F., Amani-Hooshyar V. Phytochemical and antimicrobial activities of *Lavandula officinalis* leaves and stems against some pathogenic microorganisms // *Journal of Medicinal Plants Research*. 2012. Vol. 6, no. 3. P. 455–460. <https://doi.org/10.5897/JMPR11.1166>.
22. Еникеев А. Г., Семенов А. А., Пермяков А. В., Соколова Н. А., Гамбург К. З., Дударева Л. В. Биосинтез диалкиловых эфиров орто-фталевой кислоты в растениях и в культурах клеток // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2019. Т. 55. N. 3. С. 282–285. <https://doi.org/10.1134/S0555109919020065>.

23. El-Naggar M. Y. M. Dibutyl phthalate and the antitumor agent F5A1, two metabolites produced by *Streptomyces nasri* submutant H35 // *Biomedical Letters*. 1997. Vol. 55. P. 125–131.
24. Ahsan T., Chen J., Zhao X., Irfan M., Wu Y. Extraction and identification of bioactive compounds (eicosane and dibutyl phthalate) produced by *Streptomyces* strain KX852460 for the biological control of *Rhizoctonia solani* AG-3 strain KX852461 to control target spot disease in tobacco leaf // *AMB Express*. 2017. Vol. 7, no. 54. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0351-z>.
25. Isnansetyo A., Kamei Y. Bioactive substances produced by marine isolates of *Pseudomonas* // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2009. Vol. 36. P. 1239–1248. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0611-2>.
26. Shafikova T. N., Omelichkina Y. V., Boyarkina S. V., Enikeev A. G., Maksimova L. A., Semenov A. A. Detection of endogenous phthalates in bacterial pathogens of plants and animals // *Doklady Biological Sciences*. 2019. Vol. 484. P. 13–15. <https://doi.org/10.1134/S0012496619010022>.
27. Keire D. A., Anton P., Faull K. F., Ruth E., Walsh J., Chew P., et al. Diethyl phthalate, a chemotactic factor secreted by *Helicobacter pylori* // *Journal of Biological Chemistry*. 2001. Vol. 276, no. 52. P. 48847–48853. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109811200>.
28. Макарова Л. Е., Мориц А. С., Соколова Н. А., Петрова И. Г., Семенов А. А., Дударева Л. В. [и др.]. Изучение деградации N-фенил-2-нафтиламина бактериями *Rhizobium leguminosarum* bv. Vicia, *Pseudomonas syringae* pv. Pisi, *Clavibacter michiganensis* ssp. *Sepedonicus* // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2020. Т. 56. N 2. С. 165–173. <https://doi.org/10.31857/S0555109920010122>.
29. Зенкевич И. Г., Ротару К. И., Селиванов С. И., Костиков Р. Р. Дискуссионные моменты определения диалкилфталатов в различных объектах // *Вестник Санкт-Петербургского университета. Физика и химия*. 2015. Т. 2. N 4. С. 386–394.
30. Семенов А. А., Еникеев А. Г., Снеткова Л. В., Пермяков А. В., Соколова Н. А., Дударева Л. В. Сложные эфиры ортофталевой кислоты из культуры *Aconitum baicalense* Turcz ex Rapaics 1907 // *Доклады Академии наук*. 2016. Т. 471. N 3. С. 366–367. <https://doi.org/10.7868/S0869565216330288>.
31. Semenov A. A., Enikeev A. G., Babenko T. A., Shafikova T. N., Gorshkov A. G. Phthalates – a strange delusion of ecologists // *Theoretical and Applied Ecology*. 2021. Issue 1. P. 16–20. <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2021-1-016-021>.
32. Ruikar A. D., Gadkari T. V., Phalgune U. D., Puranik V. G., Deshpande N. R. Dibutyl phthalate, a secondary metabolite from *Mimusops elengi* // *Chemistry of Natural Compounds*. 2011. Vol. 46. P. 955–956. <https://doi.org/10.1007/s10600-011-9793-8>.
33. Adedeji A. A., Babalola O. O. Secondary metabolites as plant defensive strategy: a large role for small molecules in the near root region // *Plan-*
- ta*. 2020. Vol. 252, no. 61. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03468-1>.
34. Pagare S., Bhatia M., Tripathi N., Pagare S., Bansal Y. Secondary metabolites of plants and their role: overview // *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*. 2015. Vol. 9, no. 3. P. 293–304.
35. Sastry V. M. V. S., Rao G. R. K. Dioctyl phthalate, and antibacterial compound from the marine brown alga – *Sargassum wightii* // *Journal of Applied Phycology*. 1995. Vol. 7. P. 185–186. <https://doi.org/10.1007/BF00693066>.
36. Philip D., Kaleena P. K., Valivittan K. GC-MS analysis and antibacterial activity of chromatographically separated pure fractions of leaves of *Sansevieria roxburghiana* // *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2011. Vol. 4, no. 4. P. 130–133.
37. Макарова Л. Е., Смирнов В. И., Клыба Л. В., Петрова И. Г., Дударева Л. В. Роль аллелопатических соединений в регуляции и формировании бобово-ризобиального симбиоза // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2012. Т. 48. N 3. С. 394–402.
38. Shafikova T. N., Omelichkina Y. V., Enikeev A. G., Boyarkina S. V., Gvildis D. E., Semenov A. A. Ortho-phthalic acid esters suppress the phytopathogen capability for biofilm formation // *Doklady Biological Sciences*. 2018. Vol. 480. P. 107–109. <https://doi.org/10.1134/S0012496618030092>.
39. Chen H., Zhuang R., Yao J., Wang F., Qian Y. A Comparative study on the impact of phthalate esters on soil microbial activity // *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2013. Vol. 91. P. 217–223. <https://doi.org/10.1007/s00128-013-1033-4>.
40. Zhang C., Song P., Xia Q., Li X., Wang J., Zhu L., et al. Responses of microbial community to di-(2-ethylhexyl) phthalate contamination in brown soil // *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2020. Vol. 104. P. 820–827. <https://doi.org/10.1007/s00128-020-02878-x>.
41. Wu J., Liao X., Yu F., Wei Z., Yang L. Cloning of a dibutyl phthalate hydrolase gene from *Acinetobacter* sp. strain M673 and functional analysis of its expression product in *Escherichia coli* // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013. Vol. 97. P. 2483–2491. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4232-8>.
42. Nair P. R. A., Sujatha C. H. Organic pollutants as endocrine disruptors: organometallics, PAHs, organochlorine, organophosphate and carbamate insecticides, phthalates, dioxins, phytoestrogens, alkyl phenols and bisphenol A. In: *Environmental chemistry for a sustainable world*. Environmental chemistry for a sustainable world. Lichtfouse E., Schwarzbauer J., Robert D. (eds.). Dordrecht, Springer, 2012. P. 259–309. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2442-6_8.
43. Junghare M., Patil Y., Schink B. Draft genome sequence of a nitrate-reducing, o-phthalate degrading bacterium, *Azoarcus* sp. strain PA01^T // *Standarts in Genomic Sciences*. 2015. Vol. 10, no. 90. <https://doi.org/10.1186/s40793-015-0079-9>.

44. Nshimiyimana J. B., Khadka S., Zou P., Adhikari S., Proshad R., Thapa A., et al. Study on biodegradation kinetics of di-2-ethylhexyl phthalate by newly isolated halotolerant *Ochrobactrum anthropi* strain L1-W // BMC Research Notes. 2020. Vol. 13. <https://doi.org/10.1186/s13104-020-05096-0>.
45. Liang R., Wu X., Wang X., Wang X., Dai Q., Wang Y. Aerobic biodegradation of diethyl phthalate by *Acinetobacter* sp. JDC-16 isolated from river sludge // Journal of Central South University of Technology. 2010. Vol. 17. P. 959–966. <https://doi.org/10.1007/s11771-010-0584-3>.
46. Wu X., Wang Y., Dai Q., Liang R., Jin D. Isolation and characterization of four di-*n*-butyl phthalate (DBP)-degrading *Gordonia* sp. strains and cloning the 3,4-phthalate dioxygenase gene // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2011. Vol. 27. P. 2611–2617. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0734-2>.
47. Wright R. J., Bosch R., Gibson M. I., Christie-Oleza J. A. Plasticizer degradation by marine bacterial isolates: a proteogenomic and metabolomic characterization // Environmental Science and Technology. 2020. Vol. 54. P. 2244–2256. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b05228>.
48. Kim Y. H., Lee J., Moon S. H. Degradation of an endocrine disrupting chemical, DEHP [di-(2-ethylhexyl)-phthalate], by *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* cutinase // Applied Microbiology and Biotechnology. 2003. Vol. 63. P. 75–80. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1332-5>.
49. Sharma R., Kaur R. Physiological and metabolic alterations induced by phthalates in plants: possible mechanisms of their uptake and degradation // Environmental Sustainability. 2020. Vol. 3. P. 391–404. <https://doi.org/10.1007/s42398-020-00141-x>.
50. Scavo A., Restuccia A., Mauromicale G. Allelopathy: principles and basic aspects for agroecosystem control. In: Sustainable agriculture reviews. Gaba S., Smith B., Lichtfouse E. (eds.). Cham, Springer, 2018. Vol. 28. P. 47–101. https://doi.org/10.1007/978-3-319-90309-5_2.
51. Lee D. S., Hong S. D. Inhibition mode of DNA topoisomerase by dibutyl phthalate // Journal of Microbiology and Biotechnology. 1996. Vol. 6, no. 5. P. 366–367.
52. Zhang C., Fu S. Allelopathic effects of eucalyptus and the establishment of mixed stands of eucalyptus and native species // Forest Ecology and Management. 2009. Vol. 258, no. 7. P. 1391–1396. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2009.06.045>.
53. Eljezi T., Pinta P., Richard D., Pinguet J., Chezal J. M., Chagnon M. C., et al. In vitro cytotoxic effects of DEHP-alternative plasticizers and their primary metabolites on a L929 cell line // Chemosphere. 2017. Vol. 173. P. 452–459. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.026>.
54. Kumari A., Arora S., Kaur R. Comparative cytotoxic and genotoxic potential of benzyl-butyl phthalate and di-*n*-butyl phthalate using *Allium cepa* assay // Energy, Ecology and Environment. 2021. Vol. 6. P. 244–257. <https://doi.org/10.1007/s40974-020-00186-y>.
55. Ma T., Teng Y., Christie P., Luo Y. Phytotoxicity in seven higher plant species exposed to di-*n*-butyl phthalate or bis (2-ethylhexyl) phthalate // Frontiers of Environmental Science and Engineering. 2015. Vol. 9. P. 259–268. <https://doi.org/10.1007/s11783-014-0652-2>.
56. Zhang Y., Du N., Wang L., Zhang H., Zhao J., Sun G., et al. Physical and chemical indices of cucumber seedling leaves under dibutyl phthalate stress // Environmental Science and Pollution Research International. 2015. Vol. 22, no. 5. P. 3477–3488. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3524-1>.
57. Kumari A., Kaur R. A review on morpho-physiological traits of plants under phthalates stress and insights into their uptake and translocation // Plant Growth Regulation. 2020. Vol. 91. P. 327–347. <https://doi.org/10.1007/s10725-020-00625-0>.
58. Roy R. N., Laskar S., Sen S. K. Dibutyl phthalate, the bioactive compound produced by *Streptomyces albidoflavus* 321.2 // Microbiological Research. 2006. Vol. 161, no. 2. P. 121–126. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2005.06.007>.
59. Dong-Sun L. Dibutyl phthalate, an α -glucosidase inhibitor from *Streptomyces melanosporofaciens* // Journal of Bioscience and Bioengineering. 2000. Vol. 89, no. 3. P. 271–273. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)88832-5](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)88832-5).
60. Song Q., Qin F., He H., Wang H., Yu S. Allelopathic potential of rain leachates from *Eucalyptus urophylla* on four tree species // Agroforestry Systems. 2019. Vol. 93. P. 1307–1318. <https://doi.org/10.1007/s10457-018-0240-8>.
61. Xu Y., Wu Y. G., Chen Y., Zhang J. F., Song X. Q., Zhu G. P., et al. Autotoxicity in *Pogostemon cablin* and their allelochemicals // Revista Brasileira de Farmacognosia. 2015. Vol. 25. P. 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.02.003>.
62. Singhamahapatra A., Sahoo L., Sahoo S. Mosquito repellent: a novel approach for human protection. In: Molecular identification of mosquito vectors and their management. Barik T. K. (eds.). Singapore, Springer, 2020. P. 149–178. https://doi.org/10.1007/978-981-15-9456-4_8.
63. Champakaew D., Junkum A., Chaithong U., Jitpakdi A., Riyong D., Intirach J., et al. *Angelica sinensis* (Umbelliferae) with proven repellent properties against *Aedes aegypti*, the primary dengue fever vector in Thailand // Parasitology Research. 2015. Vol. 114. P. 2187–2198. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4409-z>.
64. Nithya P. R., Manimegalai S., Nakkeeran S., Mohankumar S. Comparative study of the ditrophic interaction between *Beauveria bassiana* and *Plutella xylostella* // 3 Biotech. 2021. Vol. 11. P. 223. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02760-5>.
65. Shaker N. O., Ahmed G. M. M., Ibrahim H. Y. E., El-Sawy M. M., Mostafa M. E., Ismail H. N. A. E. Secondary metabolites of the entomopathogenic fungus, *Cladosporium cladosporioides* and its relation to toxicity of cotton aphid, *Aphis gossypii* (Glov) // Interna-

tional Journal of Entomology and Nematology. 2019. Vol. 5, no. 1. P. 115–120.

66. Rawani A. Larvicidal efficacy of the mature leaf extract of *Cajanus cajan* against the vector of Japanese encephalitis // International Journal of Tropical Insect Science. 2021. Vol. 41. P. 1155–1161. <https://doi.org/10.1007/s42690-020-00300-x>.

67. Paul T., Biswas K., Mishra S., Sinha S., Bandyopadhyay J. Thermo-chemical micro-sensing system of a biological model organism *C. elegans* towards a chemical stimulus // Microsystem Technologies. 2020. Vol. 26. P. 2235–2241. <https://doi.org/10.1007/s00542-019-04568-z>.

68. Bennetau-Pelissero C. Natural estrogenic substances, origins, and effects. In: Bioactive molecules in food. Mérillon J. M., Ramawat K. (eds.). Cham, Springer, 2019. P. 1157–1224. https://doi.org/10.1007/978-3-319-78030-6_10.

69. Leng Y., Sun Y., Huang W., Lv C., Cui J., Li T., et al. Identification of dicyclohexyl phthalate as a glucocorticoid receptor antagonist by molecular docking and multiple in vitro methods // Molecular Biology Reports. 2021. Vol. 48. P. 3145–3154. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06303-2>.

70. Sheikh I. A. Stereoselectivity and the potential endocrine disrupting activity of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) against human progesterone receptor: a computational perspective // Journal of Applied Toxicology. 2016. Vol. 36, no. 5. P. 741–747. <https://doi.org/10.1002/jat.3302>.

71. Wójtowicz A. K., Sitarz-Głownia A. M., Szczęśna M., Szychowski K. A. The action of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in mouse cerebral cells involves an impairment in aryl hydrocarbon receptor (AhR) signaling // Neurotoxicity Research. 2019. Vol. 35. P. 183–195. <https://doi.org/10.1007/s12640-018-9946-7>.

72. Xu J., Zhou L., Wang S., Zhu J., Liu T., Jia Y., et al. Di-(2-ethylhexyl)-phthalate induces glucose metabolic disorder in adolescent rats // Environmental Science and Pollution Research. 2018. Vol. 25. P. 3596–3607. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0738-z>.

73. Liu C., Qian P., Yang L., Zang L., Chen C., He M., et al. Pubertal exposure to di-(2-ethylhexyl)-phthalate inhibits G9a-mediated histone methylation during spermatogenesis in mice // Archives of Toxicology. 2016. Vol. 90. P. 955–969. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1529-2>.

74. Chou C. K., Yang Y. T., Yang H. C., Liang S. S., Wang T. N., Kuo P. L., et al. The Impact of di(2-ethylhexyl)phthalate on cancer progression // Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis. 2018. Vol. 66. P. 183–197. <https://doi.org/10.1007/s00005-017-0494-2>.

75. Zarean M., Keikha M., Poursafa P., Khalighinejad P., Amin M., Kelishadi R. A systematic review on the adverse health effects of di-2-ethylhexyl phthalate // Environmental Science and Pollution Research. 2016. Vol. 23. P. 24642–24693. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7648-3>.

76. Lu X., Xu X., Lin Y., Zhang Y., Huo X. Phthalate exposure as a risk factor for hypertension // Environmental Science and Pollution Research. 2018. Vol. 25. P. 20550–20561. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2367-6>.

77. Cargnelutti F., Di Nisio A., Pallotti F., Sabovic I., Spaziani M., Tarsitano M. G., et al. Effects of endocrine disruptors on fetal testis development, male puberty, and transition age // Endocrine. 2021. Vol. 72. P. 358–374. <https://doi.org/10.1007/s12020-020-02436-9>.

78. Hliseníková H., Petrovičová I., Kolena B., Šidlovská M., Sirotkin A. Effects and mechanisms of phthalates' action on neurological processes and neural health: a literature review // Pharmacological Reports. 2021. Vol. 73. P. 386–404. <https://doi.org/10.1007/s43440-021-00215-5>.

79. Quinete N., Hauser-Davis R. A. Drinking water pollutants may affect the immune system: concerns regarding COVID-19 health effects // Environmental Science and Pollution Research. 2021. Vol. 28. P. 1235–1246. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11487-4>.

80. Sargis R. M., Simmons R. A. Environment neglect endocrine disruptors as underappreciated but potentially modifiable diabetes risk factors // Diabetologia. 2019. Vol. 62. P. 1811–1822. <https://doi.org/10.1007/s00125-019-4940-z>.

81. Pogribny I. P., Tryndyak V. P., Boureiko A., Melnyk S., Bagnyukova T. V., Montgomery B., et al. Mechanisms of peroxisome proliferator-induced DNA hypomethylation in rat liver // Mutation Research. 2008. Vol. 644, no. 1-2. P. 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2008.06.009>.

82. Jones A. C., Irvin M. R., Claas S. A., Arnett D. K. Lipid phenotypes and DNA methylation: a review of the literature // Current Atherosclerosis Reports. 2021. Vol. 23. <https://doi.org/10.1007/s11883-021-00965-w>.

83. Habert R., Livera G., Rouiller-Fabre V. Man is not a big rat: concerns with traditional human risk assessment of phthalates based on their anti-androgenic effects observed in the rat foetus // Basic and Clinical Andrology. 2014. Vol. 24. <https://doi.org/10.1186/2051-4190-24-14>.

84. Boué S. M., Burow M. E., Wiese T. E., Shih B. Y., Elliott S., Carter-Wientjes C. H., et al. Estrogenic and antiestrogenic activities of phytoalexins from red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2011. Vol. 59, no. 1. P. 112–120. <https://doi.org/10.1021/jf102255u>.

85. Tahara S., Ingham J. L., Nakahara S., Mizutani J., Harborne J. B. Fungitoxic dihydrofuranisoflavones and related compounds in white lupin, *Lupinus albus* // Phytochemistry. 1984. Vol. 23. P. 1889–1900. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)84936-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)84936-5).

86. Riviezzi B., García-Laviña C. X., Morel M. A., Castro-Sowinski S. Facing the communication between soybean plants and microorganisms (*Bradyrhizobium* and *Defltia*) by quantitative shotgun proteomics // Symbiosis. 2021. Vol. 83. P. 293–304. <https://doi.org/10.1007/s13199-021-00758-4>.

87. Zhang F., Smith D. L. Preincubation of *Bradyrhizobium japonicum* with genistein accelerates nodule development of soybean at suboptimal root zone temperatures // *Plant Physiology*. 1995. Vol. 108, no. 3. P. 961–968. <https://doi.org/10.1104/pp.108.3.961>.

88. Bennetts H. W., Underwood E. J., Shier F. L. A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia // *Australian Veterinary Journal*. 1946. Vol. 22. P. 2–12. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1946.tb15473.x>.

89. Jansen D. H. When is it coevolution? // *Evolution*. 1980. Vol. 34. P. 611–612. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1980.tb04849.x>.

90. Huges C. L. Phytochemical mimicry of reproductive hormones and modulation of herbivore fertility by phytoestrogens // *Environmental Health Perspectives*. 1988. Vol. 78. P. 171–174. <https://doi.org/10.1289/ehp.8878171>.

1. Gao D. W., Wen Z. D. Phthalate esters in the environment: a critical review of their occurrence, biodegradation, and removal during wastewater treatment processes. *Science of the Total Environment*. 2016;541:986-1001. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.148>.

REFERENCES

2. Xu Q., Yin X., Wang M., Wang H., Zhang N., Shen Y., et al. Analysis of phthalate migration from plastic containers to packaged cooking oil and mineral water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010;58:11311-11317. <https://doi.org/10.1021/jf102821h>.

3. Yuan H., Hao Q., Su R., Qi W., He Z. Migration of phthalates from polyvinyl chloride film to fatty food simulants: experimental studies and model application. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*. 2020;15:135-143. <https://doi.org/10.1007/s00003-019-01249-x>.

4. Lv M., Gao W., Li J., Ye X., Xu T., Liu L., et al. Identification of zones contaminated with phthalates and polycyclic aromatic hydrocarbons by concentrations in gridded soil with 1/6° latitude by 1/4° longitude resolution: a case study of Zhejiang, China. *Journal of Soils and Sediments*. 2021;22:67-68. <https://doi.org/10.1007/s11368-021-03075-x>.

5. Rezaei H., Moazzen M., Shariatifar N., Khaniki G. J., Dehghani M. H., Arabameri M., et al. Measurement of phthalate acid esters in non-alcoholic malt beverages by MSPE-GC/MS method in Tehran city: chemometrics. *Environment Science and Pollution Research*. 2021;28:51897-51907. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14290-x>.

6. Ouédraogo D. Y., Delaunay M., Sordello R., Hédouin L., Castelin M., Perceval O., et al. Evidence on the impacts of chemicals arising from human activity on tropical reef-building corals; a systematic map. *Environmental Evidence*. 2021;10(22). Article number 22. <https://doi.org/10.1186/s13750-021-00237-9>.

7. Shteifel' V. O. *Harmful substances in industry*. Moscow: Khimiya; 1991. 592 p. (In Russian).

8. Yaglova N. V., Yaglov V. V. Endocrine disruptors are a novel direction of endocrinologic scientific investigation. *Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2012;67(3):56-61. <https://doi.org/10.15690/vramn.v67i3.186>. (In Russian).

9. Kay V. R., Bloom M. S., Foster W. G. Repro-

ductive and developmental effects of phthalate diesters in males. *Critical Reviews in Toxicology*. 2014;44(6):467-498. <https://doi.org/10.3109/10408444.2013.875983>.

10. Yuan X. S., Li C. Phthalates in house and dormitory dust: occurrence, human exposure and risk assessment. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2021;106:393-398. <https://doi.org/10.1007/s00128-020-03058-7>.

11. Parry E. J. *The chemistry of essential oils and artificial perfumes*. London: Scott, Greenwood and Son; 1922, vol. 2. 365 p.

12. Egorov I. V., Gramenitskaya V. N., Vul'fson N. S. Low-molecular-weight metabolites of wheat. I. Components of an ethereal extract of wheat leaves. *Chemistry of Natural Compounds*. 1981;17:574-579. <https://doi.org/10.1007/BF00574380>.

13. Chen Ch. Yu. Biosynthesis of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and di-*n*-butyl phthalate (DBP) from red alga – *Bangia atropurpurea*. *Water Research*. 2004;38(4):1014-1018. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.11.029>.

14. Babu B., Wu J.-T. Production of phthalate esters by nuisance freshwater algae and cyanobacteria. *Science of the Total Environment*. 2010;408(21):4969-4975. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.07.032>.

15. Savard M. E., Miller J. D., Blais L. A., Seifert R. F., Samson R. A. Secondary metabolites of *Penicillium bilaii* strain PB-50. *Mycopathologia*. 1994;127:19-27. <https://doi.org/10.1007/BF01104007>.

16. Lotfy M. M., Hassan H. M., Hetta M. H., El-Gendy A. O., Mohammed R. Phthalate, a major bioactive metabolite with antimicrobial and cytotoxic activity isolated from River Nile derived fungus *Aspergillus awamori*. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*. 2018;7(3):263-269. <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2018.02.002>.

17. Ye K., Ai H. L., Liu J. K. Identification and bioactivities of secondary metabolites derived from endophytic fungi isolated from ethnomedicinal plants of Tujia in Hubei province: a review. *Natural Products and Bioprospecting*. 2021;11:185-205. <https://doi.org/10.1007/s13659-020-00295-5>.

18. Xuan T. D., Chung I. M., Khanh T. D., Tawata S. Identification of phytotoxic substances from early growth of barnyard grass (*Echinochloa crusgalli*) root exudates. *Journal of Chemical Ecology*. 2006;32:895-906. <https://doi.org/10.1007/s10886-006-9035-x>.

19. Rehman N. U., Ahmad N., Hussain J., Ali L.,

- Hussein H., Bakht N., et al. One new phthalate derivative from *Nepeta kurramensis*. *Chemistry of Natural Compounds*. 2017;53:426-428. <https://doi.org/10.1007/s10600-017-2014-3>.
20. Rawani A. Larvicidal efficacy of the mature leaf extract of *Cajanus cajan* against the vector of Japanese encephalitis. *International Journal of Tropical Insect Science*. 2021;41:1155-1161. <https://doi.org/10.1007/s42690-020-00300-x>.
21. Shafaghat A., Salimi F., Amani-Hooshyar V. Phytochemical and antimicrobial activities of *Lavandula officinalis* leaves and stems against some pathogenic microorganisms. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2012;6(3):455-460. <https://doi.org/10.5897/JMPR11.1166>.
22. Enikeev A. G., Semenov A. A., Permyakov A. V., Sokolova N. A., Gamburg K. Z., Dudareva L. V. Biosynthesis of ortho-phthalic acid esters in plant and cell cultures. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya = Applied Biochemistry and Microbiology*. 2019;55(3):282-285. (In Russian). <https://doi.org/10.1134/S0555109919020065>.
23. El-Naggar M. Y. M. Dibutyl phthalate and the antitumor agent F5A1, two metabolites produced by *Streptomyces nasri* submutant H35. *Biomedical Letters*. 1997;55:125-131.
24. Ahsan T., Chen J., Zhao X., Irfan M., Wu Y. Extraction and identification of bioactive compounds (eicosane and dibutyl phthalate) produced by *Streptomyces* strain KX852460 for the biological control of *Rhizoctonia solani* AG-3 strain KX852461 to control target spot disease in tobacco leaf. *AMB Express*. 2017;7(54). <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0351-z>.
25. Isnansetyo A., Kamei Y. Bioactive substances produced by marine isolates of *Pseudomonas* // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2009. Vol. 36. P. 1239–1248. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0611-2>.
26. Shafikova T. N., Omelichkina Y. V., Boyarkina S. V., Enikeev A. G., Maksimova L. A., Semenov A. A. Detection of endogenous phthalates in bacterial pathogens of plants and animals. *Doklady Biological Sciences*. 2019;484:13-15. <https://doi.org/10.1134/S0012496619010022>.
27. Keire D. A., Anton P., Faull K. F., Ruth E., Walsh J., Chew P., et al. Diethyl phthalate, a chemotactic factor secreted by *Helicobacter pylori*. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(52):48847-48853. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109811200>.
28. Makarova L. E., Morits A. S., Sokolova N. A., Petrova I. G., Semenov A. A., Dudareva L. V., et al. Degradation of N-phenyl-2-naphthylamine by *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae*, *Pseudomonas syringae* pv. *pisii*, and *Clavibacter michiganensis* sp. *Sepedonicus* bacteria. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya = Applied Biochemistry and Microbiology*. 2020;56(2):165-173. (In Russian). <https://doi.org/10.31857/S0555109920010122>.
29. Zenkevich I. G., Rotaru K. I., Selivanov S. I., Kostikov R. R. Determination of dialkyl phthalates in different objects (problems for discussion). *Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta. Fizika i khimiya = Vestnik of Saint Petersburg University. Physics and Chemistry*. 2015;2(4):386-394. (In Russian).
30. Semenov A. A., Enikeev A. G., Permyakov A. V., Sokolova N. A., Dudareva L. V., Snetkova L. V. Ortho-phthalic acid esters in lipophilic extract from the cell culture of *Aconitum baicalense* Turcz ex Rapacis 1907. *Doklady Akademii Nauk*. 2016;471(3):366-367. (In Russian). <https://doi.org/10.7868/S0869565216330288>.
31. Semenov A. A., Enikeev A. G., Babenko T. A., Shafikova T. N., Gorshkov A. G. Phthalates – a strange delusion of ecologists. *Theoretical and Applied Ecology*. 2021;(1):16-20. <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2021-1-016-021>.
32. Ruikar A. D., Gadkari T. V., Phalgune U. D., Puranik V. G., Deshpande N. R. Dibutyl phthalate, a secondary metabolite from *Mimusops elengi*. *Chemistry of Natural Compounds*. 2011;46:955-956. <https://doi.org/10.1007/s10600-011-9793-8>.
33. Adedeji A. A., Babalola O. O. Secondary metabolites as plant defensive strategy: a large role for small molecules in the near root region. *Planta*. 2020;252(61). <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03468-1>.
34. Pagare S., Bhatia M., Tripathi N., Pagare S., Bansal Y. Secondary metabolites of plants and their role: overview. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*. 2015;9(3):293-304.
35. Sastry V. M. V. S., Rao G. R. K. Dioctyl phthalate, and antibacterial compound from the marine brown alga – *Sargassum wightii*. *Journal of Applied Phycology*. 1995;7:185-186. <https://doi.org/10.1007/BF00693066>.
36. Philip D., Kaleena P. K., Valivittan K. GC-MS analysis and antibacterial activity of chromatographically separated pure fractions of leaves of *Sansevieria roxburghiana*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2011;4(4):130-133.
37. Makarova L. E., Petrova I. G., Dudareva L. V., Smirnov V. I., Klyba L. V. Role of allelopathic compounds in the regulation and development of legume-rhizobial symbiosis. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya = Applied Biochemistry and Microbiology*. 2012;48(3):394-402. (In Russian).
38. Shafikova T. N., Omelichkina Y. V., Enikeev A. G., Boyarkina S. V., Gvildis D. E., Semenov A. A. Ortho-phthalic acid esters suppress the phytopathogen capability for biofilm formation. *Doklady Biological Sciences*. 2018;480:107-109. <https://doi.org/10.1134/S0012496618030092>.
39. Chen H., Zhuang R., Yao J., Wang F., Qian Y. A Comparative study on the impact of phthalate esters on soil microbial activity. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2013;91:217-223. <https://doi.org/10.1007/s00128-013-1033-4>.
40. Zhang C., Song P., Xia Q., Li X., Wang J., Zhu L., et al. Responses of microbial community to di-(2-ethylhexyl) phthalate contamination in brown soil. *Bulletin of Environmental Contamina-*

- tion and Toxicology*. 2020;104:820-827. <https://doi.org/10.1007/s00128-020-02878-x>.
41. Wu J., Liao X., Yu F., Wei Z., Yang L. Cloning of a dibutyl phthalate hydrolase gene from *Acinetobacter* sp. strain M673 and functional analysis of its expression product in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013;97:2483-2491. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4232-8>.
42. Nair P. R. A., Sujatha C. H. Organic pollutants as endocrine disruptors: organometallics, PAHs, organochlorine, organophosphate and carbamate insecticides, phthalates, dioxins, phytoestrogens, alkyl phenols and bisphenol A. In: *Environmental chemistry for a sustainable world*. Lichtfouse E., Schwarzbauer J., Robert D. (eds.). Dordrecht, Springer; 2012, p. 259-309. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2442-6_8.
43. Junghare M., Patil Y., Schink B. Draft genome sequence of a nitrate-reducing, *o*-phthalate degrading bacterium, *Azoarcus* sp. strain PA01^T. *Standarts in Genomic Sciences*. 2015;10(90). <https://doi.org/10.1186/s40793-015-0079-9>.
44. Nshimiyimana J. B., Khadka S., Zou P., Adhikari S., Proshad R., Thapa A., et al. Study on biodegradation kinetics of di-2-ethylhexyl phthalate by newly isolated halotolerant *Ochrobactrum anthropi* strain L1-W. *BMC Research Notes*. 2020;13. <https://doi.org/10.1186/s13104-020-05096-0>.
45. Liang R., Wu X., Wang X., Wang X., Dai Q., Wang Y. Aerobic biodegradation of diethyl phthalate by *Acinetobacter* sp. JDC-16 isolated from river sludge. *Journal of Central South University of Technology*. 2010;17:959-966. <https://doi.org/10.1007/s11771-010-0584-3>.
46. Wu X., Wang Y., Dai Q., Liang R., Jin D. Isolation and characterization of four di-*n*-butyl phthalate (DBP)-degrading *Gordonia* sp. strains and cloning the 3,4-phthalate dioxygenase gene. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2011;27:2611-2617. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0734-2>.
47. Wright R. J., Bosch R., Gibson M. I., Christie-Oleza J. A. Plasticizer degradation by marine bacterial isolates: a proteogenomic and metabolomic characterization. *Environmental Science and Technology*. 2020;54:2244-2256. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b05228>.
48. Kim Y. H., Lee J., Moon S. H. Degradation of an endocrine disrupting chemical, DEHP [di-(2-ethylhexyl)-phthalate], by *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* cutinase. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2003;63:75-80. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1332-5>.
49. Sharma R., Kaur R. Physiological and metabolic alterations induced by phthalates in plants: possible mechanisms of their uptake and degradation. *Environmental Sustainability*. 2020;3:391-404. <https://doi.org/10.1007/s42398-020-00141-x>.
50. Scavo A., Restuccia A., Mauromicale G. Allelopathy: principles and basic aspects for agroecosystem control. In: *Sustainable agriculture re-*
- views*. Gaba S., Smith B., Lichtfouse E. (eds.). Cham, Springer; 2018, vol. 28, p. 47-101. https://doi.org/10.1007/978-3-319-90309-5_2.
51. Lee D. S., Hong S. D. Inhibition mode of DNA topoisomerase by dibutyl phthalate. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1996;6(5):366-367.
52. Zhang C., Fu S. Allelopathic effects of eucalyptus and the establishment of mixed stands of eucalyptus and native species. *Forest Ecology and Management*. 2009;258(7):1391-1396. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2009.06.045>.
53. Eljezi T., Pinta P., Richard D., Pinguet J., Chezal J. M., Chagnon M. C., et al. In vitro cytotoxic effects of DEHP-alternative plasticizers and their primary metabolites on a L929 cell line. *Chemosphere*. 2017;173:452-459. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.026>.
54. Kumari A., Arora S., Kaur R. Comparative cytotoxic and genotoxic potential of benzyl-butyl phthalate and di-*n*-butyl phthalate using *Allium cepa* assay. *Energy, Ecology and Environment*. 2021;6:244-257. <https://doi.org/10.1007/s40974-020-00186-y>.
55. Ma T., Teng Y., Christie P., Luo Y. Phytotoxicity in seven higher plant species exposed to di-*n*-butyl phthalate or bis (2-ethylhexyl) phthalate. *Frontiers of Environmental Science and Engineering*. 2015;9:259-268. <https://doi.org/10.1007/s11783-014-0652-2>.
56. Zhang Y., Du N., Wang L., Zhang H., Zhao J., Sun G., et al. Physical and chemical indices of cucumber seedling leaves under dibutyl phthalate stress. *Environmental Science and Pollution Research International*. 2015;22(5):3477-3488. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3524-1>.
57. Kumari A., Kaur R. A review on morpho-physiological traits of plants under phthalates stress and insights into their uptake and translocation. *Plant Growth Regulation*. 2020;91:327-347. <https://doi.org/10.1007/s10725-020-00625-0>.
58. Roy R. N., Laskar S., Sen S. K. Dibutyl phthalate, the bioactive compound produced by *Streptomyces albidoflavus* 321.2. *Microbiological Research*. 2006;161(2):121-126. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2005.06.007>.
59. Dong-Sun L. Dibutyl phthalate, an α -glucosidase inhibitor from *Streptomyces melanosporofaciens*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2000;89(3):271-273. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)88832-5](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)88832-5).
60. Song Q., Qin F., He H., Wang H., Yu S. Allelopathic potential of rain leachates from *Eucalyptus urophylla* on four tree species. *Agroforestry Systems*. 2019;93:1307-1318. <https://doi.org/10.1007/s10457-018-0240-8>.
61. Xu Y., Wu Y. G., Chen Y., Zhang J. F., Song X. Q., Zhu G. P., et al. Autotoxicity in *Pogostemon cablin* and their allelochemicals. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2015;25:117-123. <https://doi.org/10.1016/j.bjrp.2015.02.003>.
62. Singhamahapatra A., Sahoo L., Sahoo S. Mosquito repellent: a novel approach for human protection. In: *Molecular identification of mosquito vectors and their management*. Barik T. K. (eds.).

- Singapore, Springer; 2020, p. 149-178. https://doi.org/10.1007/978-981-15-9456-4_8.
63. Champakaew D., Junkum A., Chaithong U., Jitpakdi A., Riyong D., Intirach J., et al. *Angelica sinensis* (Umbelliferae) with proven repellent properties against *Aedes aegypti*, the primary dengue fever vector in Thailand. *Parasitology Research*. 2015;114:2187-2198. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4409-z>.
64. Nithya P. R., Manimegalai S., Nakkeeran S., Mohankumar S. Comparative study of the ditrophic interaction between *Beauveria bassiana* and *Plutella xylostella*. *3 Biotech*. 2021;11:223. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02760-5>.
65. Shaker N. O., Ahmed G. M. M., Ibrahim H. Y. E., El-Sawy M. M., Mostafa M. E., Ismail H. N. A. E. Secondary metabolites of the entomopathogenic fungus, *Cladosporium cladosporioides* and its relation to toxicity of cotton aphid, *Aphis gossypii* (Glov). *International Journal of Entomology and Nematology*. 2019;5(1):115-120.
66. Rawani A. Larvicidal efficacy of the mature leaf extract of *Cajanus cajan* against the vector of Japanese encephalitis. *International Journal of Tropical Insect Science*. 2021;41:1155-1161. <https://doi.org/10.1007/s42690-020-00300-x>.
67. Paul T., Biswas K., Mishra S., Sinha S., Bandyopadhyay J. Thermo-chemical micro-sensing system of a biological model organism *C. elegans* towards a chemical stimulus. *Microsystem Technologies*. 2020;26:2235-2241. <https://doi.org/10.1007/s00542-019-04568-z>.
68. Bennetau-Pelissero C. Natural estrogenic substances, origins, and effects. In: *Bioactive molecules in food*. Mérillon J. M., Ramawat K. (eds.). Cham, Springer; 2019, p. 1157-1224. https://doi.org/10.1007/978-3-319-78030-6_10.
69. Leng Y., Sun Y., Huang W., Lv C., Cui J., Li T., et al. Identification of dicyclohexyl phthalate as a glucocorticoid receptor antagonist by molecular docking and multiple in vitro methods. *Molecular Biology Reports*. 2021;48:3145-3154. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06303-2>.
70. Sheikh I. A. Stereoselectivity and the potential endocrine disrupting activity of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) against human progesterone receptor: a computational perspective. *Journal of Applied Toxicology*. 2016;36(5):741-747. <https://doi.org/10.1002/jat.3302>.
71. Wójtowicz A. K., Sitarz-Głównia A. M., Szczęśna M., Szychowski K. A. The action of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in mouse cerebral cells involves an impairment in aryl hydrocarbon receptor (AhR) signaling. *Neurotoxicity Research*. 2019;35:183-195. <https://doi.org/10.1007/s12640-018-9946-7>.
72. Xu J., Zhou L., Wang S., Zhu J., Liu T., Jia Y., et al. Di-(2-ethylhexyl)-phthalate induces glucose metabolic disorder in adolescent rats. *Environmental Science and Pollution Research*. 2018;25:3596-3607. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0738-z>.
73. Liu C., Qian P., Yang L., Zang L., Chen C., He M., et al. Pubertal exposure to di-(2-ethylhexyl)-phthalate inhibits G9a-mediated histone methylation during spermatogenesis in mice. *Archives of Toxicology*. 2016;90:955-969. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1529-2>.
74. Chou C. K., Yang Y. T., Yang H. C., Liang S. S., Wang T. N., Kuo P. L., et al. The Impact of di(2-ethylhexyl)phthalate on cancer progression. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 2018;66:183-197. <https://doi.org/10.1007/s00005-017-0494-2>.
75. Zarean M., Keikha M., Poursafa P., Khalighinejad P., Amin M., Kelishadi R. A systematic review on the adverse health effects of di-2-ethylhexyl phthalate. *Environmental Science and Pollution Research*. 2016;23:24642-24693. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7648-3>.
76. Lu X., Xu X., Lin Y., Zhang Y., Huo X. Phthalate exposure as a risk factor for hypertension. *Environmental Science and Pollution Research*. 2018;25:20550-20561. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2367-6>.
77. Cargnelutti F., Di Nisio A., Pallotti F., Sabovic I., Spaziani M., Tarsitano M. G., et al. Effects of endocrine disruptors on fetal testis development, male puberty, and transition age. *Endocrine*. 2021;72:358-374. <https://doi.org/10.1007/s12020-020-02436-9>.
78. Hlšíňková H., Petrovičová I., Kolena B., Šidlovská M., Sirotkin A. Effects and mechanisms of phthalates' action on neurological processes and neural health: a literature review. *Pharmacological Reports*. 2021;73:386-404. <https://doi.org/10.1007/s43440-021-00215-5>.
79. Quinete N., Hauser-Davis R. A. Drinking water pollutants may affect the immune system: concerns regarding COVID-19 health effects. *Environmental Science and Pollution Research*. 2021;28:1235-1246. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11487-4>.
80. Sargis R. M., Simmons R. A. Environment neglect endocrine disruptors as underappreciated but potentially modifiable diabetes risk factors. *Diabetologia*. 2019;62:1811-1822. <https://doi.org/10.1007/s00125-019-4940-z>.
81. Pogribny I. P., Tryndyak V. P., Boureiko A., Melnyk S., Bagnyukova T. V., Montgomery B., et al. Mechanisms of peroxisome proliferator-induced DNA hypomethylation in rat liver. *Mutation Research*. 2008;644(1-2):17-23. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2008.06.009>.
82. Jones A. C., Irvin M. R., Claas S. A., Arnett D. K. Lipid phenotypes and DNA methylation: a review of the literature. *Current Atherosclerosis Reports*. 2021;23. <https://doi.org/10.1007/s11883-021-00965-w>.
83. Habert R., Livera G., Rouiller-Fabre V. Man is not a big rat: concerns with traditional human risk assessment of phthalates based on their anti-androgenic effects observed in the rat fetus. *Basic and Clinical Andrology*. 2014;24. <https://doi.org/10.1186/2051-4190-24-14>.
84. Boué S. M., Burow M. E., Wiese T. E., Shih B. Y.,

Elliott S., Carter-Wientjes C. H., et al. Estrogenic and antiestrogenic activities of phytoalexins from red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011;59(1):112-120. <https://doi.org/10.1021/jf102255u>.

85. Tahara S., Ingham J. L., Nakahara S., Mizutani J., Harborne J. B. Fungitoxic dihydrofuranisoflavones and related compounds in white lupin, *Lupinus albus*. *Phytochemistry*. 1984;23:1889-1900. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)84936-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)84936-5).

86. Riviezzi B., García-Laviña C. X., Morel M. A., Castro-Sowinski S. Facing the communication between soybean plants and microorganisms (*Bradyrhizobium* and *Delftia*) by quantitative shotgun proteomics. *Symbiosis*. 2021;83:293-304. <https://doi.org/10.1007/s13199-021-00758-4>.

87. Zhang F., Smith D. L. Preincubation of *Bradyrhizobium japonicum* with genistein accelerates nodule development of soybean at suboptimal root zone temperatures. *Plant Physiology*. 1995;108(3):961-968. <https://doi.org/10.1104/pp.108.3.961>.

88. Bennetts H. W., Underwood E. J., Shier F. L. A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. *Australian Veterinary Journal*. 1946;22:2-12. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1946.tb15473.x>.

89. Jansen D. H. When is it coevolution? *Evolution*. 1980;34:611-612. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1980.tb04849.x>.

90. Huges C. L. Phytochemical mimicry of reproductive hormones and modulation of herbivore fertility by phytoestrogens. *Environmental Health Perspectives*. 1988;78:171-174. <https://doi.org/10.1289/ehp.8878171>.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Л. А. Максимова,

к.б.н., старший научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии и биохимии
растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
VendyS@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6133-0981>

Т. Н. Шафикина,

к.б.н., старший научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
t-shafikova@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1099-4235>

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.*

Информация о статье

Поступила в редакцию 01.12.2021.
Одобрена после рецензирования 27.03.2022.
Принята к публикации 15.09.2022.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Lyudmila A. Maksimova,

Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
VendyS@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6133-0981>

Tatiana N. Shafikova,

Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology and
Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033, Russian
Federation,
t-shafikova@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1099-4235>

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.*

Information about the article

The article was submitted 01.12.2021.
Approved after reviewing 27.03.2022.
Accepted for publication 15.09.2022.

Научная статья

УДК 539-022.532:539.2:575.224.4

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-438-446>



Оценка биобезопасности наноструктурных минералов, разработанных для применения в качестве удобрений

Ирина Александровна Дегтярева, Эдуард Викторович Бабынин,
Елена Александровна Прищепенко

Татарский научно-исследовательский институт агрохимии и почвоведения – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук», г. Казань, Российская Федерация

Автор, ответственный за переписку: Дегтярева Ирина Александровна, rease-1963@mail.ru

Аннотация. Природные цеолиты эффективно используются в качестве удобрений, субстратов и носителей для пестицидов, а также сорбентов при восстановлении загрязненных почв. Поскольку наноструктурные минералы обладают уникальными физико-химическими свойствами, прежде чем использовать их на практике, они должны быть проверены на наличие токсичности и генотоксичности. Впервые нами проведена проверка мутагенных и антимутагенных свойств наноструктурной водно-цеолитной суспензии с использованием 2-х бактериальных тест-систем: теста Эймса и SOS-lux теста. Согласно полученным данным, наноструктурная водно-цеолитная суспензия не обладает мутагенной активностью в исследованном диапазоне концентраций (0,75–400 мкг/мл). Для оценки антимутагенной активности наноструктурной водно-цеолитной суспензии выбраны различные типы мутагенов: митомицин С, этилметансульфонат, 2,4-динитрофенилгидразин, а также ДНК-повреждающие агенты – офлоксацин и перекись водорода. Показан значительный антимутагенный эффект наноструктурной водно-цеолитной суспензии в концентрации 200 мкг/мл в отношении митомицина С в SOS-lux тесте (ингибирование мутагенной активности составило 50,0%) и 2,4-динитрофенилгидразина в тесте Эймса (ингибирование – 62,0%). Для остальных мутагенов отмечен слабый антимутагенный эффект (17,0% для этилметансульфоната), а в отношении офлоксацина и перекиси водорода антимутагенный эффект отсутствует. Различия в антимутагенном эффекте можно объяснить тем, что цеолиты отрицательно заряжены, поэтому могут захватывать только положительные (или нейтральные) молекулы. Следовательно, антимутагенный эффект наноструктурной водно-цеолитной суспензии будет зависеть от заряда молекулы мутагена. На основании полученных результатов можно считать наноструктурную водно-цеолитную суспензию безопасной для окружающей среды, что позволяет использовать ее по агропромышленному назначению в качестве удобрения при выращивании сельскохозяйственных культур.

Ключевые слова: биобезопасность, минералы, наноструктурная водно-цеолитная суспензия, мутагенные и антимутагенные свойства

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания №FMEG-2021-0003, регистрационный номер 121021600147-1.

Для цитирования: Дегтярева И. А., Бабынин Э. В., Прищепенко Е. А. Оценка биобезопасности наноструктурных минералов, разработанных для применения в качестве удобрений // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2022. Т. 12. N 3. С. 438–446. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-438-446>.

Original article

Nanostructured minerals developed to be used as fertilizers: biosafety evaluation

Irina A. Degtyareva, Eduard V. Babynin, Elena A. Prishchepenko

Scientific Institution Tatar Scientific Research Institute of Agricultural Chemistry and Soil Science – Subdivision of the Federal State Budgetary Institution of Science «Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences», Kazan, Russian Federation

Corresponding author: Irina A. Degtyareva, peace-1963@mail.ru

Abstract. Natural zeolites are effectively used as fertilizers, substrates, and pesticide carriers, as well as sorbents in the remediation of contaminated soils. Since nanostructured minerals exhibit unique physicochemical properties, they must be tested for toxicity and genotoxicity prior to their use in practice. The mutagenic and antimutagenic properties of a nanostructured water-zeolite suspension were first tested using two bacterial test systems: Ames test and SOS-lux test. According to the obtained data, the nanostructured water-zeolite suspension exhibits no mutagenic activity within the analyzed concentration range (0.75–400 µg/mL). In order to assess the antimutagenic activity of the nanostructured water-zeolite suspension, different types of mutagens were selected: mitomycin C, ethyl methanesulfonate, 2,4-dinitrophenylhydrazine, as well as DNA-damaging agents (ofloxacin and hydrogen peroxide). A significant antimutagenic effect of the nanostructured water-zeolite suspension at 200 µg/mL was shown against mitomycin C in the SOS-lux test (50.0% inhibition of mutagenic activity) and 2,4-dinitrophenylhydrazine in the Ames test (62.0% inhibition). For the other mutagens, a weak antimutagenic effect was observed (17.0% for ethyl methanesulfonate), while no antimutagenic effect was reported for ofloxacin and hydrogen peroxide. These differences can be attributed to the negative charge in zeolites, meaning that they can capture only positive (or neutral) molecules. Therefore, the antimutagenic effect of the nanostructured water-zeolite suspension depends on the charge of the mutagen molecule. According to the obtained results, the nanostructured water-zeolite suspension can be considered environmentally friendly, which allows it to be used for agro-industrial purposes as a fertilizer in the production of crops.

Keywords: nanostructured water-zeolite suspension, biosafety, minerals, nanostructured water-zeolite suspension, mutagenic properties, antimutagenic properties

Funding. The work was carried out within the framework of the state task no. FMEG-2021-0003, registration number 121021600147-1.

For citation: Degtyareva I. A., Babynin E. V., Prishchepenko E. A. Nanostructured minerals developed to be used as fertilizers: biosafety evaluation. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2022;12(3):438-446. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-438-446>.

ВВЕДЕНИЕ

Наноматериалы обладают уникальными физико-химическими свойствами и представляют собой универсальные каркасы для функционализации биомолекул. По этим причинам в течение последних лет область нанотехнологий вызывает повышенный интерес к науке о растениях, особенно в отношении применения наноматериалов в качестве носителей агрохимикатов или биомолекул, а также огромного потенциала для повышения урожайности сельскохозяйственных культур [1]. Нанотехнологии достаточно широко применяются в сельском хозяйстве. Сообщается как о положительном влиянии наночастиц на рост растений [2], так и об отрицательном эффекте [3]. Потеря плодородия почв из-за интенсивных методов ведения сельского хозяйства компенсируется использованием большого количества удобрений для повышения урожайности выращиваемых

культур. Однако эффективность использования обычных удобрений едва ли превышает 30–40% [4]. Нанодобрения, предотвращая нежелательные потери питательных веществ за счет прямой интернализации растениями, избегают взаимодействия питательных веществ с почвой, водой, воздухом.

Так, применение пористых наноматериалов, таких как цеолиты, глина или хитозан, значительно снижает потери азота за счет регулирования высвобождения в зависимости от потребности и усиления процесса поглощения растениями [5]. Способность цеолитов, обладающих сильной адсорбционной и ионообменной емкостью, в значительной степени используется в сельскохозяйственных, промышленных, экологических и биологических технологиях [6]. Цеолиты характеризуются способностью обратимо терять и получать воду и осуществлять обмен составляющих

катионов без существенных изменений структуры [7]. Природные цеолиты применяют для улучшения структуры почвы, производства кормовых добавок в животноводстве, очистки воды, радиозащиты, изготовления пищевых добавок и т.д. Установлено, что цеолиты повышают эффективность использования удобрений [8].

Однако активное применение нанотехнологий вызывает озабоченность по поводу токсикологических последствий воздействия для нецелевых мишеней. Отмечается, что одни и те же свойства, которые делают наноматериалы настолько уникальными, не гарантируют отсутствие потенциальной токсичности [9]. Широкое использование наночастиц в различных областях приводит к их случайному выбросу в земную, водную и атмосферную среду. Растения являются важным компонентом этих экосистем, и взаимодействие наночастиц приводит к поглощению и накоплению их в биомассе растений и определяет перенос наночастиц в окружающей среде [10]. В организм растений наночастицы могут попадать разными путями, а скорость поглощения зависит от их размера, формы, концентрации и поверхностного заряда [11, 12]. Наночастицы адсорбируются на различных поверхностях растений, и их последующее поглощение происходит через отверстия растений в микрометровом и нанометровом диапазоне. В нескольких работах представлены данные об отсутствии ДНК-повреждающих свойств у нанобентонита и нанофосфорита [13, 14]. Показано наличие у некоторых цеолитосодержащих пород негативных биомедицинских эффектов (цитотоксических, мутагенных, канцерогенных) по отношению к организму человека [15]. Доказано, что мутагенные эффекты обусловлены стимуляцией перекисного окисления липидов [16]. Описан профилактический эффект цеолитов на интоксикацию фосфорорганическими отравлениями [17]. Так, увеличение числа случаев опухолей легких и мезотелиомы наблюдается в длительных ингаляционных исследованиях крыс и хомяков, обработанных микропорными огнеупорными керамическими волокнами, содержащими каолин в качестве основного компонента [18]. По мере того, как новые наноматериалы синтезируют с тщательным контролем размеров и свойств поверхности, остается важной оценка их токсичности до применения на практике. Поэтому несомненно важна изучение биобезопасности наноматериалов.

Цель исследования – оценка мутагенных и антимутагенных свойств наноструктурной водно-цеолитной суспензии в бактериальных тестах.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Мутагенная активность наноструктурной водно-цеолитной суспензии исследована в тесте Эймса [19]. Использовали индикаторные штаммы *Salmonella typhimurium* TA1535 (генотип *hisG46, rfa, uvrB*), TA1538 (генотип *hisD3052, rfa, uvrB*). Штамм *S. typhimurium* TA1535 содержит мутации

в гене *hisG*, что приводит к аминокислотной замене лейцина на пролин (мутация замены пары оснований). Штамм *S. typhimurium* TA1538 имеет делецию 1 пары оснований в гене *hisD*, что вызывает мутацию типа сдвига рамки считывания. Это приводит к изменению 2-х аминокислот и появлению стоп-кодона внутри гена. Реверсии к His⁺ фенотипу у этих штаммов таким образом требуют различных молекулярных изменений в гене. Для оценки влияния наноструктурной водно-цеолитной суспензии на SOS-ответ использовали индикаторный штамм *S. typhimurium* TAR5, способный к биолюминесценции, в ответ на ДНК-повреждающие агенты. Штамм был получен авторами в результате трансформации штамма *S. typhimurium* TA1535 плазмидой pDEW238. Данная плазида, содержащая *luxCDABE* – оперон под контролем *recA* промотора, предоставлена Rachel Rozen (The Hebrew Uniliversity of Jerusalem, Израиль).

Ночную культуру *S. typhimurium* (10⁹ клеток/мл) в 0,015 М фосфатном буфере (pH 7,4) инкубировали с тестируемым соединением в различных концентрациях при температуре 37 °С в течение 90 мин без встряхивания. После инкубации 2,5 мл расплавленного верхнего агара (0,6% агара; 0,6% NaCl; 0,05 мМ L-гистидина; 0,05 мМ биотина; pH 7,4 при 45 °С) добавляли в пробирки, и смесь наносили на минимальную агаризованную среду (1,5% агар, среда Фогеля-Боннера, содержащая 2,0% глюкозы) и инкубировали при температуре 37 °С в течение 66 ч. Затем подсчитывали число колоний His⁺ ревертантов, выросших на поверхности агара. В качестве позитивного контроля использовали 2,4-динитрофенилгидразин для штамма TA1538 и этилметансульфонат для TA1535. Все эксперименты проводили в 3-х повторностях.

Для оценки антимутагенного эффекта мутаген и тестируемое соединение вносили в верхний слой агара одновременно. Позитивный и негативный контроли включали в каждом анализе. Расчет антимутагенного эффекта сделан в соответствии с формулой:

$$\text{Антимутагенный эффект} = [M-T/M] \times 100\%,$$

где T – число ревертантов на чашках в присутствии мутагена и тестируемого соединения; M – число ревертантов на чашках только с мутагеном.

Антимутагенный эффект может быть слабым (менее 25%), умеренным (25–40%) и сильным (более 40%) [20]. Определение мутагенной активности тестируемого вещества с помощью SOS-lux теста выполнено по работе Д. Л. Купера и С. Т. Ловетт [21], антимутагенность рассчитывали по исследованию Г. Кальдини и соавторов [22]. В качестве мутагенов изучали митомицин С, офлоксацин и перекись водорода.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные данные по оценке мутагенных и антимутагенных свойств наноструктурной водно-цеолитной суспензии в тесте Эймса указывают

на то, что тестируемое соединение не повышает ни частоту мутаций замены пар оснований у штамма *S. typhimurium* TA1535, ни типа сдвига рамки считывания у *S. typhimurium* штамма

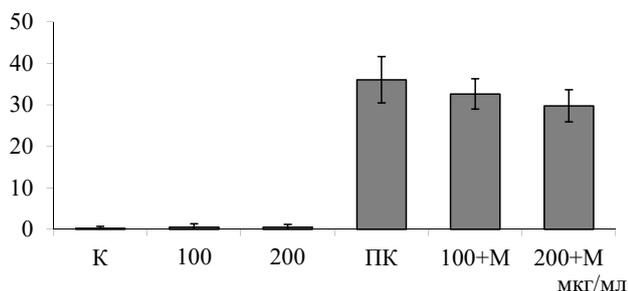


Рис. 1. Влияние наноструктурной водно-цеолитной суспензии на число генных мутаций у штамма *S. typhimurium* TA1535. По оси ординат: среднее число His+ – ревертантов на чашку Петри, по оси абсцисс: ПК – позитивный контроль (этилметансульфонат); +М – наноструктурная водно-цеолитная суспензия + этилметансульфонат

Fig. 1. Effect of nanostructured water-zeolite suspension on the number of gene mutations in a strain *S. typhimurium* TA1535. Y-axis: average number of His+ revertants per Petri dish; X-axis: PC, positive control (ethyl methanesulfonate); +M – nanostructured water-zeolite suspension + ethyl methanesulfonate

TA1538 (рис.1, 2).

Следовательно, наноструктурная водно-цеолитная суспензия безопасна в использовании, т.к. не проявляет мутагенной активности.

В экспериментах по определению антимутагенной активности тестируемого соединения в тесте Эймса использованы соответствующие для каждого штамма мутагены. В полученных данных выявления антимутагенных свойств наноструктурной водно-цеолитной суспензии (см. рис. 2) со штаммом *S. typhimurium* TA1538 наблюдается

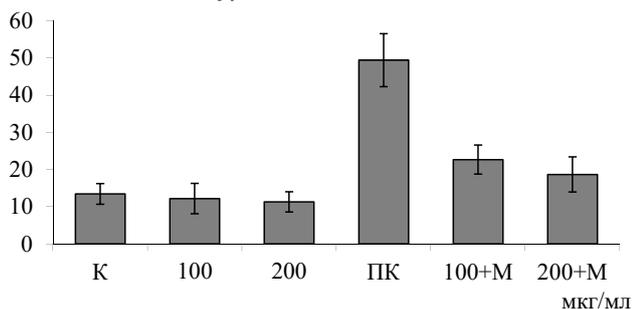


Рис. 2. Влияние наноструктурной водно-цеолитной суспензии на число генных мутаций у штамма *S. typhimurium* TA1538. По оси ординат: среднее число His+ – ревертантов на чашку, по оси абсцисс: ПК – позитивный контроль (2,4-динитрофенилгидразин); +М – наноструктурная водно-цеолитная суспензия + 2,4-динитрофенилгидразин

Fig. 2. Effect of nanostructured water-zeolite suspension on the number of gene mutations in a strain *S. typhimurium* TA1538. Y-axis: average number of His+ revertants per cup; X-axis: PC, positive control (2,4-dinitrophenylhydrazine); +M – nanostructured water-zeolite suspension + 2,4-dinitrophenylhydrazine

значительный антимутагенный эффект (62,0%), в то время как со штаммом *S. typhimurium* TA1535 – слабый (17,0%), кроме того, различия недостоверные.

Из результатов экспериментов следует, что наноструктурная водно-цеолитная суспензия в тесте Эймса проявляет антимутагенный эффект в отношении 2,4-динитрофенилгидразина, но в отношении этилметансульфоната достоверных отличий не обнаружено.

Следующим этапом являлось исследование биолюминесценции штамма *S. typhimurium* TAR5 в ответ на действие наноструктурной водно-цеолитной суспензии (рис. 3). Если в присутствии исследуемого соединения уровень биолюминесценции возрастает в 2 раза по сравнению с фоновым, вещество можно считать SOS-индуктором, т.е. оно обладает ДНК-повреждающими свойствами. Из результатов экспериментов следует, что наноструктурная водно-цеолитная суспензия при различных концентрациях в диапазоне от 0,75–400,0 мкг/мл не обладает ДНК-повреждающими свойствами.

Тем же методом проверены антимутагенные свойства наноструктурной водно-цеолитной суспензии в отношении различных индукторов SOS-ответа, таких как митомицин С, офлоксацин и перекись водорода (H_2O_2). Этилметансульфонат производит случайные мутации в генетическом материале путем замены нуклеотидов, обычно путем алкилирования гуанинов с образованием O_6 -этилгуанина. Во время репликации ДНК-полимеразы, которые катализируют этот процесс, часто размещают тимин вместо цитозина напротив O_6 -этилгуанина [23]. Митомицин С – антибиотик, выделенный из *Streptomyces caespitosus*, также классифицируется как алкилирующий агент, но, кроме того, он способен индуцировать меж- и внутринитевые сшивки ДНК [24]. Перекись водорода генерирует гидроксильные радикалы, которые вызывают перекисное окисление липидов, что ведет к индукции разрывов ДНК, а также к окислительным повреждениям ДНК [25]. 2,4-динитрофенилгидразин – производное гидразина, в котором один атом водорода замещен на фенильную группу. Гидразины являются канцерогенами и реагируют с пиримидиновыми основаниями, вызывая потерю пиримидинов или образуя различные аддукты в молекуле ДНК [26]. Фторхинолоны связываются с активным центром бактериальных топоизомераз типа II, что приводит к накоплению в хромосомной ДНК одностранных и двустранных разрывов, которые являются индукторами SOS-ответа [27].

Для выявления возможной антимутагенной активности биосенсорный штамм выращен в присутствии одновременно индуктора SOS-ответа и тестируемого вещества (рис. 4). Наноструктурная водно-цеолитная суспензия проявляет антимутагенный эффект по отношению к митомицину С – степень подавления мутагенной активности составляет 50,0%. Действие наноминерала, вероятно, связано с его способностью адсорбировать мутаген. В экспериментах, где

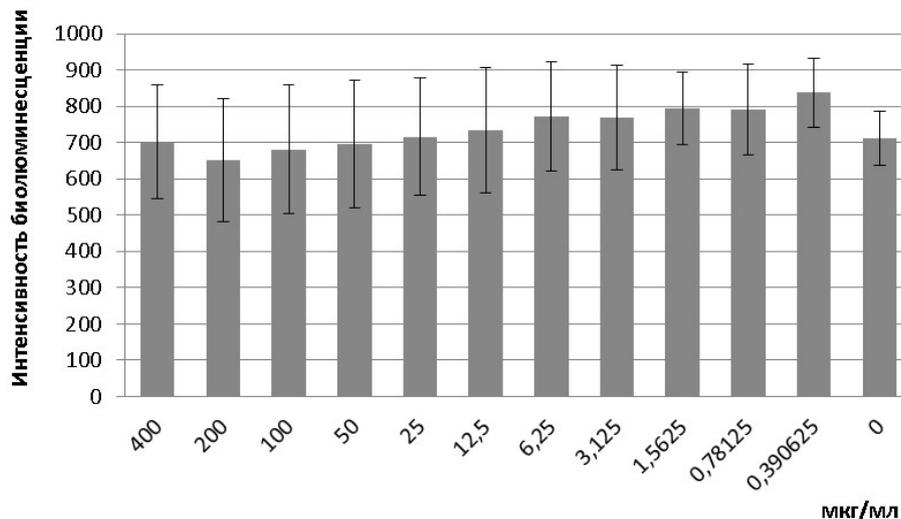
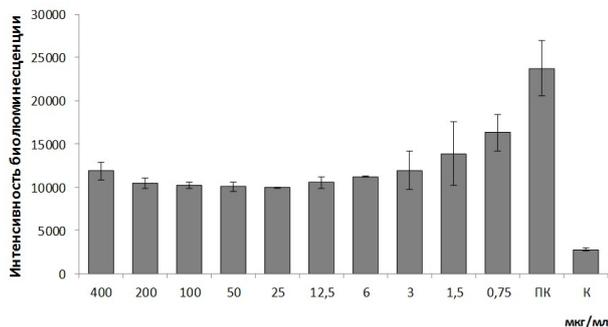
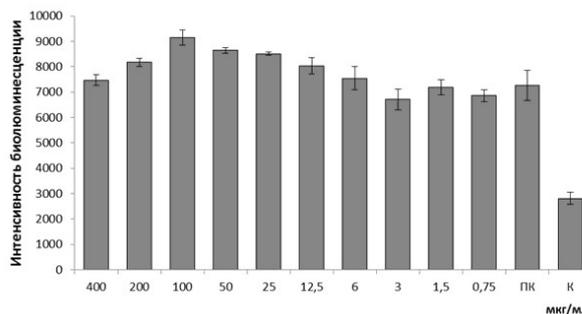


Рис. 3. Интенсивность биолюминесценции штамма TAR5 *S. typhimurium* при различных концентрациях наноструктурной водно-цеолитной суспензии

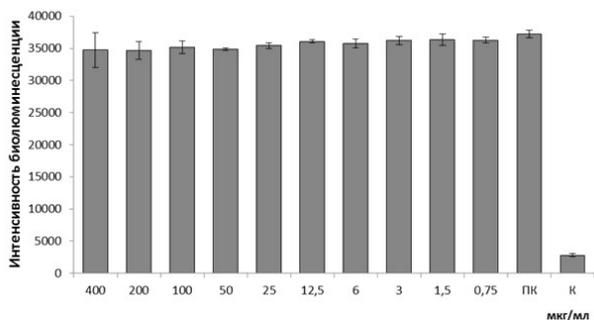
Fig. 3. Bioluminescence intensity of the TAR5 strain *S. typhimurium* at different concentrations of nanostructured water-zeolite suspension



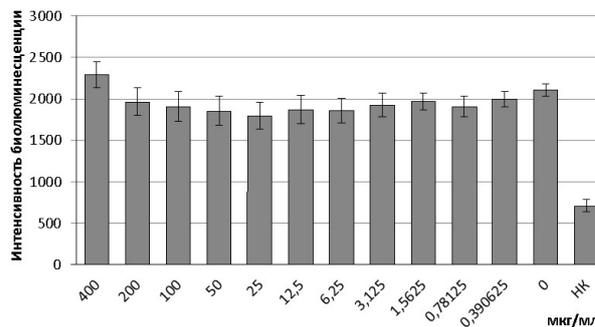
a



b



c



d

Рис. 4. Влияние наноструктурной водно-цеолитной суспензии на интенсивность биолюминесценции штамма TAR5 *S. typhimurium*, индуцированной: а – митомцином С; б – перекисью водорода; с – офлоксацином; д – 2,4-динитрофенилгидразином

Fig. 4. Effect of nanostructured water-zeolite suspension on the bioluminescence intensity of the TAR5 strain of *S. typhimurium* induced by: а – mitomycin C; б – hydrogen peroxide; с – ofloxacin; д – 2,4-dinitrophenylhydrazine

индукторами SOS-ответа являются H_2O_2 , офлоксацин и 2,4-динитрофенилгидразин, ингибирование не отмечено. Следовательно, тестируемое соединение не проявляет антимуtagenного эффекта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии мутагенной активности наноструктурной водно-цеолитной суспензии. Кроме того, при совместном инкубировании она проявляет в отношении некоторых мутагенов антимуtagenный

эффект, который может зависеть от специфических взаимодействий между наноструктурной водно-цеолитной суспензией и мутагеном.

Таким образом, изучена биобезопасность наноструктурной водно-цеолитной суспензии, которая не проявляет мутагенной активности в исследованиях на бактериальных тест-системах. Поэтому ее можно считать безопасной для окружающей среды и использовать по агропромышленному назначению в качестве компонента для удобрения при выращивании сельскохозяйственных культур.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Khan M. N., Mobin M., Abbas Z. K., AlMutairi K. A., Siddiqui Z. H. Role of nanomaterials in plants under challenging environments // *Plant Physiology and Biochemistry*. 2017. Vol. 110. P. 194–209. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.05.038>.
2. Usman M., Farooq M., Wakeel A., Nawaz A., Cheema S. A., Rehman H. U., et al. Nanotechnology in agriculture: current status, challenges and future opportunities // *Science of the Total Environment*. 2020. Vol. 721. P. 137778. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137778>.
3. Sanzari I., Leone A., Ambrosone A. Nanotechnology in plant science: to make a long story short // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2019. Vol. 7. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00120>.
4. van Dijk M., Meijerink G. W. A review of food security scenario studies: gaps and ways forward. In: *The food puzzle: pathways to securing food for all*. Wageningen UR, 2014. P. 30–32.
5. Manjaiah K. M., Mukhopadhyay R., Paul R., Datta S. C., Kumararaja P., Sarkar B. Clay minerals and zeolites for environmentally sustainable agriculture. In: *Modified clay and zeolite nanocomposite materials*. The Netherlands, 2019. P. 309–329. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814617-0.00008-6>.
6. Mumpton F. A. La roca magica: uses of natural zeolites in agriculture and industry // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999. Vol. 96, no. 7. P. 3463–3470. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.3463>.
7. Oliveira C. R., Rubio J. Adsorption of ions onto treated natural zeolite // *Materials Research*. 2007. Vol. 10, no. 4. <https://doi.org/10.1590/S1516-14392007000400014>.
8. Chinnamuthu C. R., Boopathi P. M. Nanotechnology and agroecosystem // *Madras Agricultural Journal*. 2009. Vol. 96, no. 1-6. P. 17–31.
9. Arora S., Rajwade J. M., Paknikar K. M. Nanotoxicology and in vitro studies: the need of the hour // *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2012. Vol. 258, no. 2. P. 151–165. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.11.010>.
10. Lin D., Xing B. Root uptake and phytotoxicity of ZnO nanoparticles // *Environmental Science and Technology*. 2008. Vol. 42, no. 15. P. 5580–5585. <https://doi.org/10.1021/es800422x>.
11. Petushkov A., Ndiege N., Salem A. K., Larsen S. C. Toxicity of silica nanomaterials: zeolites, mesoporous silica, and amorphous silica nanoparticles // *Advances in Molecular Toxicology*. 2010. Vol. 4. P. 223–266. [https://doi.org/10.1016/S1872-0854\(10\)04007-5](https://doi.org/10.1016/S1872-0854(10)04007-5).
12. Tarafdar J. C., Xiang Y., Wang W.-N., Dong Q., Biswas P. Standardization of size, shape and concentration of nanoparticle for plant application // *Applied Biological Research*. 2012. Vol. 14, no. 2. P. 138–144.
13. Дегтярева И. А., Бабынин Э. В., Мотина Т. Ю., Давлетшина А. Я., Яппаров И. А. Оценка мутагенных и антимуtagenных свойств наноструктурного фосфорита – компонента комплексного удобрения // *Агрохимический вестник*. 2019. N 1. С. 41–45. <https://doi.org/10.24411/0235-2516-2019-10010>.
14. Degtyareva I. A., Ezhkova A. M., Yapparov A. Kh., Yapparov I. A., Ezhkov V. O., Babynin E. V., et al. Production of nano-bentonite and the study of its effect on mutagenesis in bacteria *Salmonella typhimurium* // *Nanotechnologies in Russia*. 2016. Vol. 11, no. 9-10. P. 663–670. <https://doi.org/10.1134/S1995078016050050>.
15. Дурнев А. Д., Сулова Т. Б., Черемисина З. П., Дубовская О. Ю., Нигарова Э. А., Коркина Л. Г. [и др.]. Исследование мутагенного действия пыли природных цеолитов и хризотил-асбеста // *Экспериментальная онкология*. 1990. Т. 12. N 2. С. 21–24.
16. Ilgren E. B., Brena M. O., Larragoitia J. C., Navarrete G. L., Berna A. F., Krauss E., et al. A reconnaissance study of a potential emerging Mexican mesothelioma epidemic due to fibrous zeolite exposure // *Indoor and Built Environment*. 2008. Vol. 17, no. 6. P. 496–515. <https://doi.org/10.1177/1420326X08096610>.
17. Pavelic K., Hadzija M. Medical applications of zeolites. In: *Handbook of zeolite science and technology*. New York, 2003. P. 1143–1174.
18. Bunn W. B., Bender J. R., Hesterberg T. W., Chase G. R., Konzen J. L. Recent studies of man-made vitreous fibers. Chronic animal inhalation studies // *Journal of Occupational Medicine*. 1993. Vol. 35, no. 2. P. 101–113. <https://doi.org/10.1097/00043764-199302000-00009>.
19. Maron D. M., Ames B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test // *Mutation Re-*

search. 1983. Vol. 113, no. 3-4. P. 173–215. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(83\)90010-9](https://doi.org/10.1016/0165-1161(83)90010-9).

20. Evandri M. G., Battinelli L., Daniele C., Mas-trangelo S., Bolle P., Mazzanti G. The antimuta-genic activity of *Lavandula angustifolia* (lavender) essential oil in the bacterial reverse mutation as-say // *Food and Chemical Toxicology*. 2005. Vol. 43, no. 9. P. 1381–1387. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.03.013>.

21. Cooper D. L., Lovett S. T. Toxicity and toler-ance mechanisms for azidothymidine, a replication gap-promoting agent, in *Escherichia coli* // *DNA Re-pair (Amst)*. 2011. Vol. 10, no. 3. P. 260–270.

22. Caldini G., Trotta F., Villarini M., Moretti M., Pasquini R., Scassellati-Sforzolini G., et al. Screen-ing of potential lactobacilli antigenotoxicity by mi-crobial and mammalian cell-based tests // *Interna-tional Journal of Food Microbiology*. 2005. Vol. 102, no. 1. P. 37–47. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmi-cro.2004.11.015>.

23. Tagu D., Le Trionnaire G., Tanguy S., Gauth-ier J.-P., Huynh J.-R. EMS mutagenesis in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* // *G3 Genes, Genomes,*

Genetics. 2014. Vol. 4, no. 4. P. 657–667. <https://doi.org/10.1534/g3.113.009639>.

24. Abraham L. M., Selva D., Casson R., Leibo-vitch I. Mitomycin: clinical applications in ophthal-mic practice // *Drugs*. 2006. Vol. 66, no. 3. P. 321–340. <https://doi.org/10.2165/00003495-200666030-00005>.

25. Valverde M., Lozano-Salgado J., Fortini P., Ro-driguez-Sastre M. A., Rojas E., Dogliotti E. Hydrogen peroxide-induced DNA damage and repair through the differentiation of human adipose-derived mesen-chymal stem cells // *Stem Cells International*. 2018. P. 1615497. <https://doi.org/10.1155/2018/1615497>.

26. Parodi S., De Flora S., Cavanna M., Pino A., Robbiano L., Bennicelli C., et al. DNA-damaging ac-tivity in vivo and bacterial mutagenicity of sixteen hy-drazine derivatives as related quantitatively to their carcinogenicity // *Cancer Research*. 1981. Vol. 41, no. 4. P. 1469–1482.

27. Amarrh V., Arthur P. K. DNA double-strand break formation and repair as targets for novel an-tibiotic combination chemotherapy // *Future Sci-ence OA*. 2019. Vol. 5, no. 8. P. FSO411. <https://doi.org/10.2144/fsoa-2019-0034>.

REFERENCES

1. Khan M. N., Mobin M., Abbas Z. K., AlMutairi K. A., Siddiqui Z. H. Role of nanomaterials in plants un-der challenging environments. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2017;110:194-209. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.05.038>.

2. Usman M., Farooq M., Wakeel A., Nawaz A., Cheema S. A., Rehman H. U., et al. Nanotechnology in agriculture: current status, challenges and future opportunities. *Science of the Total Environment*. 2020;721:137778. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137778>.

3. Sanzari I., Leone A., Ambrosone A. Nanotechnology in plant science: to make a long story short. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2019;7. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00120>.

4. van Dijk M., Meijerink G. W. A review of food security scenario studies: gaps and ways forward. In: *The food puzzle: pathways to securing food for all*. Wageningen UR; 2014, p. 30-32.

5. Manjaiah K. M., Mukhopadhyay R., Paul R., Datta S. C., Kumararaja P., Sarkar B. Clay minerals and zeolites for environmentally sustainable agricul-ture. In: *Modified clay and zeolite nanocomposite ma-terials*. The Netherlands; 2019, p. 309-329. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814617-0.00008-6>.

6. Mumpton F. A. La roca magica: uses of natural zeolites in agriculture and industry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(7):3463-3470. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.3463>.

7. Oliveira C. R., Rubio J. Adsorption of ions onto treated natural zeolite. *Materials Research*. 2007;10(4). <https://doi.org/10.1590/S1516-14392007000400014>.

8. Chinnamuthu C. R., Boopathi P. M. Nanotechnology and agroecosystem. *Madras Agricultural Journal*. 2009;96(1-6):17-31.

9. Arora S., Rajwade J. M., Paknikar K. M.

Nanotoxicology and in vitro studies: the need of the hour. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2012;258(2):151-165. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.11.010>.

10. Lin D., Xing B. Root uptake and phytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Environmental Science and Technology*. 2008;42(15):5580-5585. <https://doi.org/10.1021/es800422x>.

11. Petushkov A., Ndiege N., Salem A. K., Larsen S. C. Toxicity of silica nanomaterials: zeolites, mesoporous silica, and amorphous silica nanoparticles. *Advances in Molecular Toxicology*. 2010;4:223-266. [https://doi.org/10.1016/S1872-0854\(10\)04007-5](https://doi.org/10.1016/S1872-0854(10)04007-5).

12. Tarafdar J. C., Xiang Y., Wang W.-N., Dong Q., Biswas P. Standardization of size, shape and concentration of nanoparticle for plant application. *Applied Biological Research*. 2012;14(2):138-144.

13. Degtyareva I. A., Babynin E. V., Motina T. Yu., Davletshina A. Ya., Yapparov I. A. Estimation of mutagenic and antimutagenic properties of nano-structured phosphorus – component of complex fertilizer. *Agrokhimicheskii vestnik = Agrochemical Herald*. 2019;(1):41-45. (In Russian). <https://doi.org/10.24411/0235-2516-2019-10010>.

14. Degtyareva I. A., Ezhkova A. M., Yapparov A. Kh., Yapparov I. A., Ezhkov V. O., Babynin E. V., et al. Production of nano-bentonite and the study of its effect on mutagenesis in bacteria *Salmonella typhimurium*. *Nanotechnologies in Russia*. 2016;11(9-10):663-670. <https://doi.org/10.1134/S1995078016050050>.

15. Durnev A. D., Suslova T. B., Cheremisina Z. P., Dubovskaya O. Yu., Nigarova E. A., Korkina L. G., et al. Study of the mutagenic effect of natural zeolite dust and chrysotile asbestos. *Ekspieriment'naya onkologiya*. 1990;12(2):21-24. (In Russian).

16. Ilgren E. B., Brena M. O., Larragoitia J. C.,

Navarrete G. L., Berna A. F., Krauss E., et al. A reconnaissance study of a potential emerging Mexican mesothelioma epidemic due to fibrous zeolite exposure. *Indoor and Built Environment*. 2008;17(6):496-515. <https://doi.org/10.1177/1420326X08096610>.

17. Pavelic K., Hadzija M. Medical applications of zeolites. In: *Handbook of zeolite science and technology*. New York; 2003, p. 1143-1174.

18. Bunn W. B., Bender J. R., Hesterberg T. W., Chase G. R., Konzen J. L. Recent studies of man-made vitreous fibers. Chronic animal inhalation studies. *Journal of Occupational Medicine*. 1993;35(2):101-113. <https://doi.org/10.1097/00043764-199302000-00009>.

19. Maron D. M., Ames B. N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*. 1983;113(3-4):173-215. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(83\)90010-9](https://doi.org/10.1016/0165-1161(83)90010-9).

20. Evandri M. G., Battinelli L., Daniele C., Mastrangelo S., Bolle P., Mazzanti G. The antimutagenic activity of Lavandula angustifolia (lavender) essential oil in the bacterial reverse mutation assay. *Food and Chemical Toxicology*. 2005;43(9):1381-1387. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.03.013>.

21. Cooper D. L., Lovett S. T. Toxicity and tolerance mechanisms for azidothymidine, a replication gap-promoting agent, in *Escherichia coli*. *DNA Repair (Amst)*. 2011;10(3):260-270.

22. Caldini G., Trotta F., Villarini M., Moretti M., Pasquini R., Scassellati-Sforzolini G., et al. Screening

of potential lactobacilli antigenotoxicity by microbial and mammalian cell-based tests. *International Journal of Food Microbiology*. 2005;102(1):37-47. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.015>.

23. Tagu D., Le Trionnaire G., Tanguy S., Gauthier J.-P., Huynh J.-R. EMS mutagenesis in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *G3 Genes, Genomes, Genetics*. 2014;4(4):657-667. <https://doi.org/10.1534/g3.113.009639>.

24. Abraham L. M., Selva D., Casson R., Leibovitch I. Mitomycin: clinical applications in ophthalmic practice. *Drugs*. 2006;66(3):321-340. <https://doi.org/10.2165/00003495-200666030-00005>.

25. Valverde M., Lozano-Salgado J., Fortini P., Rodriguez-Sastre M. A., Rojas E., Dogliotti E. Hydrogen peroxide-induced DNA damage and repair through the differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells International*. 2018;16:15497. <https://doi.org/10.1155/2018/1615497>.

26. Parodi S., De Flora S., Cavanna M., Pino A., Robbiano L., Bennicelli C., et al. DNA-damaging activity in vivo and bacterial mutagenicity of sixteen hydrazine derivatives as related quantitatively to their carcinogenicity. *Cancer Research*. 1981;41(4):1469-1482.

27. Amarn V., Arthur P. K. DNA double-strand break formation and repair as targets for novel antibiotic combination chemotherapy. *Future Science OA*. 2019;5(8):FSO411. <https://doi.org/10.2144/fsoa-2019-0034>.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

И. А. Дегтярева,

д.б.н., главный научный сотрудник,
Татарский научно-исследовательский институт
агрохимии и почвоведения – обособленное
структурное подразделение Федерального
государственного бюджетного учреждения
науки «Федеральный исследовательский центр
«Казанский научный центр Российской академии
наук»,
420059, г. Казань, ул. Оренбургский тракт, 20А,
Российская Федерация,
peace-1963@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1575-8493>

Э. В. Бабынин,

к.б.н., старший научный сотрудник,
Татарский научно-исследовательский институт
агрохимии и почвоведения – обособленное
структурное подразделение Федерального
государственного бюджетного учреждения
науки «Федеральный исследовательский центр
«Казанский научный центр Российской академии
наук»,
420059, г. Казань, ул. Оренбургский тракт, 20А,
Российская Федерация,
edward.b67@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2285-8879>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Irina A. Degtyareva,

Dr. Sci. (Biology), Chief Researcher,
Scientific Institution Tatar Scientific
Research Institute of Agricultural Chemistry
and Soil Science – Subdivision of the
Federal State Budgetary Institution
of Science «Kazan Scientific Center
of the Russian Academy of Sciences»,
20A, Orenburg tract St., 420059,
Kazan, Russian Federation,
peace-1963@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1575-8493>

Eduard V. Babynin,

Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Scientific Institution Tatar Scientific
Research Institute of Agricultural Chemistry
and Soil Science – Subdivision of the
Federal State Budgetary Institution
of Science «Kazan Scientific Center
of the Russian Academy of Sciences»,
20A, Orenburg tract St., 420059,
Kazan, Russian Federation,
edward.b67@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2285-8879>

Е. А. Прищепенко,
к.с.-х.н., руководитель,
Татарский научно-исследовательский институт
агрохимии и почвоведения – обособленное
структурное подразделение Федерального
государственного бюджетного учреждения
науки «Федеральный исследовательский центр
«Казанский научный центр Российской академии
наук»,
420059, г. Казань, ул. Оренбургский тракт, 20А,
Российская Федерация,
pea77@list.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9068-3014>

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.

Информация о статье

*Поступила в редакцию 15.08.2022.
Одобрена после рецензирования 14.09.2022.
Принята к публикации 15.09.2022.*

Elena A. Prishchepenko,
Cand. Sci. (Agriculture), Director,
Scientific Institution Tatar Scientific
Research Institute of Agricultural Chemistry
and Soil Science – Subdivision of the
Federal State Budgetary Institution
of Science «Kazan Scientific Center
of the Russian Academy of Sciences»,
20A, Orenburg tract St., 420059,
Kazan, Russian Federation,
pea77@list.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9068-3014>

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.

Information about the article

*The article was submitted 15.08.2022.
Approved after reviewing 14.09.2022.
Accepted for publication 15.09.2022.*

Научная статья
УДК 22.018.245
DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-447-454>



Влияние золы рисовой и гречневой шелухи на биоразлагаемость эпоксидных материалов

Елена Михайловна Готлиб, Елена Вячеславовна Перушкина,
Рют Шельтон Нцуму, Екатерина Сергеевна Ямалеева

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

Автор, ответственный за переписку: Ямалеева Екатерина Сергеевна, curls888@yandex.ru

Аннотация. Ввиду микробиологической стойкости эпоксидных полимеров, проблема утилизации их после завершения срока эксплуатации является особенно актуальной. В этом аспекте особый интерес представляют производные рисовой и гречневой шелухи как потенциально биодegradуемые компоненты, которые при применении их в качестве наполнителей обеспечивают улучшение эксплуатационных характеристик эпоксидных материалов. Полученные результаты свидетельствуют об использовании рисовой и гречневой шелухи и их золы в качестве субстрата микроорганизмами почвы. Вместе с тем рисовая шелуха в значительно большей степени, чем гречневая шелуха, увеличивает биологическую активность микробиоты почвы. При этом с ростом температуры получения золы рисовой шелухи использование ее в качестве субстрата микроорганизмами почвы закономерно снижается по сравнению с рисовой шелухой. Это обусловлено уменьшением содержания в ее составе рентгеноаморфной фазы и ростом количества кристаллических минералов. В то же время зола гречневой шелухи, не зависимо от температуры ее получения, существенно активизирует процессы почвенного дыхания по сравнению с гречневой шелухой, что указывает на возможность микробиологической утилизации образцов золы гречневой шелухи в процессе инкубирования в почве. Эпоксидные материалы, как ненаполненные, так и наполненные золой рисовой и гречневой шелухи, не используются в качестве субстрата микроорганизмами почвы. В то же время наполнение эпоксидных композиций рисовой шелухой обуславливает улучшение их биодegradуемости. Степень биодеструкции шелухи риса и гречихи и их золы определяет влияние этих наполнителей на дыхательную активность почвы в присутствии эпоксидных материалов.

Ключевые слова: эпоксидный полимер, рисовая и гречневая шелуха, зола, микробиоценоз почвы, биодegradация, пористость

Благодарности. В работе использовано оборудование комплексной лаборатории «Наноаналитика» Казанского национального исследовательского технологического университета (г. Казань).

Для цитирования: Готлиб Е. М., Перушкина Е. В., Нцуму Р. Ш., Ямалеева Е. С. Влияние золы рисовой и гречневой шелухи на биоразлагаемость эпоксидных материалов // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2022. Т. 12. N 3. С. 447–454. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-447-454>.

Original article

Effects of rice and buckwheat husk ash on the biodegradability of epoxy materials

Elena M. Gotlib, Elena V. Perushkina, Rutthe Sch. Ntsoumou, Ekaterina S. Yamaleeva

Kazan National Research Technological University, Kazan, Russian Federation,
Corresponding author: Ekaterina S. Yamaleeva, curls888@yandex.ru

Abstract. Due to the microbiological resistance of epoxy resins, their disposal after the completion of their lifecycle is a pressing issue. In this respect, the use of biodegradable rice and buckwheat husk derivatives as fillers may improve the service properties of epoxy materials. The results indicate that rice and buckwheat husks, as well as their ashes, can be used by soil microorganisms as a substrate. Compared to buckwheat husks, rice husks increase the biological activity of soil microbiota to a much greater extent. However, compared to rice husks, an increase in the temperature of obtaining rice husk ash leads to a decrease in its use by soil microorganisms as a substrate. This is associated with a decreased content of the X-ray amorphous phase and an increased amount of crystalline minerals in the composition of rice husk ash. At the same time, regardless of the temperature of its production, buckwheat husk ash outperforms buckwheat husks in terms of activated soil respiration, which indicates the possibility of microbiological disposal of buckwheat husk ash during its incubation in a soil. Epoxy materials, both unfilled and filled with rice and buckwheat husk ash, are not used by soil microorganisms as a substrate. At the same time, the filling of epoxy materials with rice husks leads to an improvement in their biodegradability. The biodegradation degree of rice and buckwheat husks, as well as their ashes, determines the effect of these fillers on soil respiration in the presence of epoxy materials.

Keywords: epoxy resin, rice and buckwheat husks, ash, soil microbiocenosis, biodegradation, porosity

Acknowledgements. The equipment of the complex laboratory "Nanoanalytics" of the Kazan National Research Technological University (Kazan) was used in the work.

For citation: Gotlib E. M., Perushkina E. V., Ntsoumou R. Sch., Yamaleeva E. S. Effects of rice and buckwheat husk ash on the biodegradability of epoxy materials. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2022;12(3):447-454. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-447-454>.

ВВЕДЕНИЕ

Непрерывный и ускоряющийся с каждым годом рост образования полимерных отходов – серьезная экологическая проблема. Одним из эффективных путей ее решения является разработка полимерных материалов, которые сохраняют эксплуатационные характеристики в течение периода потребления, а затем под действием факторов окружающей среды подвергаются ускоренной биодegradации [1–3].

В этом аспекте перспективно применение в полимерных композициях в качестве модифицирующих добавок растительных отходов, в частности наполнителей на основе рисовой и гречневой шелухи [4–7].

Это позволяет комплексно отвечать на возникающие вызовы путем одновременной утилизации крупнотоннажных отходов переработки зерна и уменьшения количества «полимерного мусора».

Для изделий на основе эпоксидных смол ввиду микробиологической стойкости этого типа полимеров [8, 9] проблема утилизации после завершения срока эксплуатации является особенно актуальной.

В то же время производные рисовой и гречневой шелухи представляют собой потенциал

но биодegradуемые компоненты [10, 11], которые при применении их в качестве наполнителей обеспечивают улучшение эксплуатационных характеристик эпоксидных материалов [12].

Это делает актуальным исследование их влияния на биоразложение эпоксидных композиций.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для получения наполненных композиций использовалась эпоксидная диановая смола ЭД-20 (ГОСТ 10587-84).

Отвердитель аминоалкилфенол (АФ-2) (ТУ 2494-052-0205423-2004) применялся в качестве сшивающего агента для холодного отверждения в количестве, определенном по эквивалентному соотношению [эпокси-группы]:[амин]. Отверждение ЭД-20 АФ-2 проводилось при комнатной температуре в течение 7 суток.

В качестве наполнителей использовались рисовая (РШ) и гречневая (ГШ) шелуха и их зола (ЗРШ и ЗГШ), полученная при температурах 350 (ЗРШ₁ и ЗГШ₁), 500 (ЗРШ₂ и ЗГШ₂) и 800 °С (ЗРШ₃ и ЗГШ₃) в количестве 10 мас. ч. на 100 мас. ч. эпоксидной смолы.

Способность к биоразложению рисовой и гречневой шелухи, их золы и наполненных ими оксидных материалов оценивали по изменению дыхательной активности почвы в их присутствии. Для этого использовали метод Штурма (DIN EN 29439, OECD 301 B, ISO 14852), который базируется на изучении кинетики выделения CO_2 из системы, содержащей погруженный в суспензию микроорганизмов-деструкторов образец испытываемого материала.

Определение дыхательной активности почвы предусматривает инкубирование при температуре 25 °С увлажненной почвы (влажностью 60%) в присутствии исследуемого образца и регистрацию кинетических кривых выделения CO_2 почвенными микроорганизмами. В контрольном опыте исследуют почвенную суспензию, не содержащую добавок. В экспериментальных исследованиях использовали один из наиболее распространенных в республике Татарстан (РТ) типов почв – серая лесная почва, отобранная в Зеленодольском муниципальном районе РТ. Содержание фосфора в почве в перерасчете на P_2O_5 составляло в среднем 255 мг/кг почвы, содержание калия в перерасчете на K_2O – 140 мг/кг почвы.

Рентгенографический количественный анализ проводился на многофункциональном дифрактометре Rigaku SmartLab (Rigaku Corporation, Япония) при следующих параметрах съемки: угловой интервал 2θ от 3 до 65° с шагом сканирования 0,02, с экспозицией 1 с в точке. Пределы допускаемой относительной погрешности измерений – $\pm 3\%$.

Определение массовой доли углерода в образцах ЗРШ проводилось с помощью элементного анализа CHNS по ГОСТ 32979-2014 (ISO 29541:2010) на анализаторе PE 2400-II (PerkinElmer Corporation, США). В основе метода лежит сжигание образца для превращения определяемых элементов в простые газы. Температура сжигания – 925 °С, температура восстановления – 640 °С, в термостате детектора – 82,2 °С. Пределы допускаемой относительной погрешности измерений составляют $\pm 0,2\%$.

Определение удельной площади поверхности пор наполнителей проводилось по адсорбции газа с применением метода Брунауэра, Эммета и Теллера (BET – метод ISO 9277:2010) на приборе Quantachrome Nova 1200e (Quantachrome Instruments, США). Дегазация образцов наполнителей осуществлялась 3 ч при температуре 150 °С, при давлении в вакууме 2 Па. Пределы допускаемой относительной погрешности измерений $\pm 5\%$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты оценки изменения дыхательной активности микробиоценоза почвы в присутствии рисовой и гречневой шелухи и их золы представлены в табл. 1.

Согласно полученным данным (см. табл. 1),

Таблица 1. Дыхательная активность почвы в присутствии рисовой и гречневой шелухи и их золы

Table 1. Soil respiration activity in the presence of rice and buckwheat husks and their ashes

Наименование образца	Количество выделившегося CO_2 , мг C-CO_2 , г/ч
Почва (контрольный образец)	3,77 \pm 0,11
Зола рисовой шелухи ₁	7,59 \pm 0,04
Зола рисовой шелухи ₂	5,41 \pm 0,04
Зола рисовой шелухи ₃	4,19 \pm 0,07
Рисовая шелуха	14,83 \pm 0,09
Зола гречневой шелухи ₁	27,23 \pm 0,10
Зола гречневой шелухи ₂	21,08 \pm 0,09
Зола гречневой шелухи ₃	8,46 \pm 0,02
Гречневая шелуха	5,99 \pm 0,04

внесение в почву РШ обуславливает увеличение дыхательной активности почвенного микробиоценоза почти в 4 раза по сравнению с этим показателем для контрольного образца почвы.

Полученные результаты свидетельствуют об использовании РШ в качестве субстрата микроорганизмами почвы. Это связано с тем, что РШ содержит большое количество целлюлозы и лигнина [13, 14].

Внесение в почву ЗРШ, полученной при 350 °С (ЗРШ₁), также обуславливает (см. табл. 1) существенное увеличение ее дыхательной активности (практически в 2 раза).

Вероятно, это связано с составом ЗРШ₁, характеризующимся наличием большого количества рентгеноаморфной фазы и значительным содержанием углерода (табл. 2), легко подвергающимся утилизации почвенной микрофлорой.

Выявлено, что применение ЗРШ, полученной при 500 и 800 °С (ЗРШ₂ и ЗРШ₃), увеличивает дыхательную активность почвы примерно на 45 и 10% соответственно (см. табл. 1).

Таким образом, с ростом температуры получения ЗРШ использование ее в качестве субстрата микроорганизмами почвы закономерно снижается. Это обусловлено уменьшением содержания в ее составе органической фазы и ростом количества кристаллических минералов, например, кристобалита (см. табл. 2).

Определенный вклад в биодegradацию РШ и ее золы вносит пористость этих наполнителей, которая закономерно уменьшается с ростом температуры сжигания РШ (табл. 3).

ЗГШ независимо от температуры ее получения существенно активизирует процессы почвен-

Таблица 2. Фазовый состав рисовой шелухи, ее золы и содержание углерода в них

Table 2. Phase composition of rice husk, its ash and carbon content in them

Тип наполнителя	Фазовый состав	Содержание, % масс.	Содержание углерода, % масс.
Рисовая шелуха	Рентгеноаморфная фаза	85±0,10	40,81±0,08
	Кристобалит	6±0,08	
	Тридимит	6±0,08	
	Карфолит	3±0,05	
Зола рисовой шелухи ₁	Рентгеноаморфная фаза	97±0,11	15,03±0,03
	Кальцит	2±0,08	
	Прочее	1±0,03	
Зола рисовой шелухи ₂	Рентгеноаморфная фаза	97±0,10	3,93±0,01
	Кристобалит	2±0,08	
	Кварц	1±0,03	
Зола рисовой шелухи ₃	Рентгеноаморфная фаза	75±0,10	0,52±0,01
	Кристобалит	23±0,08	
	Кварц	1±0,03	
	Тридимит	1±0,03	

ного дыхания (см. табл. 1), что указывает на возможность микробиологической утилизации образцов ЗГШ в процессе инкубирования в почве.

При этом аналогично ЗРШ с ростом температуры получения ЗГШ использование ее в качестве субстрата микроорганизмами почвы закономерно снижается (см. табл. 1). Это происходит, несмотря на увеличение пористости структуры ЗГШ (см. табл. 3), и связано, очевидно, с уменьшением содержания в ее составе органической фазы.

Особого внимания заслуживает тот факт, что РШ в значительно большей степени по сравнению с ГШ увеличивает биологическую активность микробиоты почвы. Действительно, применение ГШ только в 1,5 раза повышает интенсивность выделения CO₂. Возможно, это связано с меньшим по сравнению с РШ содержанием целлюлозы в ее составе [15, 16], являющейся более легкоусвояемым микроорганизмом, чем лигнин [17], который достаточно устойчив к химическому и микробиологическому разложению [18].

В то же время ЗГШ, полученная при всех исследуемых температурах, напротив, характеризуется большей доступностью для вызывающего ее биодеструкцию микробного сообщества

по сравнению с ЗРШ. Так, в случае золы, полученной сжиганием шелухи при 350 °С, выделение углекислого газа при внесении ее в почву более чем в 3 раза выше для ЗГШ по сравнению с ЗРШ.

Это может быть связано с относительно высоким содержанием в составе РШ и ее производных диоксида кремния [19] и с присутствием в составе ГШ и ЗГШ соединений калия [15], которые лучше усваиваются микроорганизмами почвы, что обуславливает их биохимическую деградацию [20].

Таким образом, хотя удельная поверхность пор ЗГШ во много раз меньше, чем у ЗРШ (см. табл. 3), это несущественно влияет на интенсивность выделения углекислого газа при внесении этой золы в почву (см. табл. 1).

Установлено, что отвержденный эпоксидный полимер приводит к снижению дыхательной активности почвенного микробиоценоза примерно в 2 раза (табл. 4). Наполненные ГШ и ее золой эпоксидные материалы имеют примерно одинаковую биодоступность для почвенных микроорганизмов (см. табл. 4), при этом она меньше, чем для ненаполненного полимера.

Следовательно, исследуемые эпоксидные материалы не используются в качестве суб-

Таблица 3. Характеристика пористости структуры рисовой шелухи, золы рисовой и гречневой шелухи

Table 3. Porosity of rice husk, rice and buckwheat husk ash

Наименование образца	Удельная поверхность пор по Брунауэру–Эммету–Теллеру (БЭТ), м ² /г
Зола рисовой шелухи ₁	0,719±0,036
Зола гречневой шелухи ₂	1,045±0,052
Зола гречневой шелухи ₃	3,564±0,080
Зола рисовой шелухи ₁	48,900±0,080
Зола рисовой шелухи ₂	27,900±0,080
Зола рисовой шелухи ₃	10,300±0,052
Рисовая шелуха	0,600±0,030

Таблица 4. Дыхательная активность почвы в присутствии наполненных гречневой шелухой, золой гречневой шелухи, рисовой шелухой и золой рисовой шелухи эпоксидных материалов

Table 4. Soil respiration activity in the presence of epoxy materials filled with buckwheat husk, buckwheat husk ash, rice husk and rice husk ash

Наименование образца	Количество выделившегося CO ₂ , мг C-CO ₂ , г/ч
Почва (контрольный образец)	3,77±0,02
ЭД-20	1,87±0,01
ЭД20+гречневая шелуха	1,27±0,01
ЭД20+зола гречневой шелухи ₁	1,32±0,02
ЭД20+ зола гречневой шелухи ₂	1,51±0,01
ЭД20+зола гречневой шелухи ₃	1,69±0,01
ЭД-20+рисовая шелуха	2,45±0,01
ЭД-20+зола рисовой шелухи ₁	1,85±0,03
ЭД-20+зола рисовой шелухи ₂	1,63±0,02
ЭД-20+зола рисовой шелухи ₃	1,48±0,03

страта микроорганизмами почвы.

Утилизация почвенной микрофлорой эпоксидных композиций растет примерно на 28% с увеличением температуры получения ЗГШ, используемой в качестве наполнителя (см. табл. 4). Это связано, возможно, с ростом при этом пористости золы (см. табл. 3), что может влиять на взаимодействие полимерной матрицы с наполнителем.

В то же время пористость ЗГШ недостаточна для того, чтобы обеспечить стимулирующее влияние на интенсивность роста микроорганизмов, которое наблюдается, например, при наполнении эпоксидных материалов волластонитом, имеющим значительно большой объем пор.

Дыхательная активность почвенного микробиоценоза, как следует из данных, представленных в табл. 4, растет только при наполнении эпоксидных композиций РШ.

Однако при использовании в качестве наполнителя ЗРШ₃ этот показатель ниже на 21%, чем у ненаполненного полимера.

Таким образом, наполнение ЗРШ, так же как и ЗГШ, не увеличивает биодegradацию эпоксидных материалов в почве.

С ростом температуры получения золы РШ качество наполненных ей эпоксидных композиций как питательной среды для микроорганизмов ухудшается, возможно, за счет снижения пористости ЗРШ (см. табл. 3).

Установлено, что рост степени биодеструкции шелухи описываемых зерновых культур и их золы увеличивает дыхательную активность микробиоценоза почвы в присутствии наполненных ими эпоксидных материалов (см. табл. 4).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты оценки изменения дыхательной активности микробиоценоза почвы в присутствии РШ, ГШ и их золы свидетельствуют о том, что с ростом температуры получения золы обеих зерновых культур использование их в качестве субстрата микроорганизмами почвы закономерно снижается.

РШ в значительно большей степени по сравнению с ГШ увеличивает биологическую активность микробиоты почвы из-за большего содержания в ее составе целлюлозы по сравнению с трудно усваиваемыми микроорганизмами – гемицеллюлозой и лигнином.

В то же время ЗГШ, полученная при всех исследуемых температурах, напротив, характеризуется большей доступностью для вызывающего ее биодеструкцию микробного сообщества по сравнению с ЗРШ.

Эпоксидные материалы, как ненаполненные, так и наполненные ЗРШ и ЗГШ, не используются в качестве субстрата микроорганизмами почвы.

В то же время наполнение эпоксидных композиций РШ обуславливает улучшение их биодegradируемости.

Степень биодеструкции шелухи описываемых зерновых культур и их золы определяет влияние их на дыхательную активность почвы в присутствии эпоксидных материалов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Фомин В. А., Гузев В. В. Биоразлагаемые полимеры, состояние и перспективы использования // Пластические массы. 2001. N 2. С. 42–46.
2. Роговина С. З. Биоразлагаемые полимерные композиции на основе синтетических и природных полимеров различных классов // Высокомолекулярные соединения. Серия С. 2016. Т. 58. N 1. С. 68–80. <https://doi.org/10.7868/S2308114716010106>.
3. Готлиб Е. М., Вдовина Т. В., Ямалеева Е. С.

Повышение биоразлагаемости эпоксидных материалов за счет модификации растительными маслами и их кислородсодержащими производными // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2020. Т. 10. N 4. С. 700–707. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-700-707>.

4. Kenechi N.-O., Linus C., Kayode A. Utilization of rice husk as reinforcement in plastic composites fabrication – a review // American Journal of Materials

Synthesis and Processing. 2016. Vol. 1, no. 3. P. 32–36. <https://doi.org/10.11648/j.ajmsp.20160103.12>.

5. Andrzejewski J., Barczewski M., Szostak M. Injection molding of highly filled polypropylene-based biocomposites. Buckwheat husk and wood flour filler: a comparison of agricultural and wood industry waste utilization // *Polymers*. 2019. Vol. 11, no. 11. P. 1–18. <https://doi.org/10.3390/polym11111881>.

6. Goodman B. A. Utilization of waste straw and husks from rice production: a review // *Journal of Bioresources and Bioproducts*. 2020. Vol. 5, no. 3. P. 145–169. <https://doi.org/10.1016/j.jobab.2020.07.001>.

7. Akhter F., Siddique M., Soomro S. A., Jamali A. R., Chandio Z. A., Ahmed M. Rice husk ash as green and sustainable biomass waste for construction and renewable energy applications: a review // *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2021. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01527-5>.

8. Ерофеев В. Т., Смирнов В. Ф., Лазарев А. В., Богатов А. Д., Казначеев С. В., Родин А. И. [и др.]. Биологическая и климатическая стойкость полимерных композитов // *Academia. Архитектура и строительство*. 2017. N 1. С. 112–119.

9. Ахметзянов Р. Р., Вагизов Т. Н., Галимов Э. Р. Разработка составов и технологии изготовления дисперсно-наполненных композиционных материалов для узлов трения // *Вестник Казанского государственного технического университета им. А. Н. Туполева*. 2019. Т. 75. N 2. С. 61–65.

10. Nourbakhsh A., Ashori A., Tabrizi A. K. Characterization and biodegradability of polypropylene composites using agricultural residues and waste fish // *Composites Part B: Engineering*. 2014. Vol. 56. P. 279–283. <https://doi.org/10.1016/J.COMPOSITESB.2013.08.028>.

11. Сергиенко В. И., Земнухова Л. А., Егоров А. Г., Шкорина Е. Д., Василюк Н. С. Возобновляемые источники химического сырья: комплексная переработка отходов производства риса и гречихи // *Российский химический журнал*. 2004. N 3. С. 117–124.

12. Готлиб Е. М., Ямалеева Е. С., Нцуму Р. Ш., Валеева А. Р. Изучение влияния температуры получения золы гречневой шелухи на антифрикци-

онные свойства и износостойкость эпоксидных покрытий // *Бутлеровские сообщения*. 2021. Т. 68. N 12. С. 70–76. <https://doi.org/10.37952/ROI-jbc-01/21-68-12-70>.

13. Rohani A. B., Rosiyah Y., Seng N. G. Production of high purity amorphous silica from rice husk // *Procedia Chemistry*. 2016. Vol. 19. P. 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2016.03.092>.

14. Вураско А. В., Дриккер Б. Н., Мозырева Е. А., Земнухова Л. А., Галимова А. Р., Гулемина Н. Н. Энергосберегающая технология получения целлюлозных материалов при переработке отходов сельскохозяйственных культур // *Химия растительного сырья*. 2006. N 4. С. 5–10.

15. Клинецвич В. Н., Флюрик Е. А. Способы использования лузги гречихи посевной (обзор) // *Труды БГТУ. Серия 2: Химические технологии, биотехнология, геоэкология*. 2020. Т. 2. N 1. С. 68–81.

16. Готлиб Е. М., Валеева А. Р., Ямалеева Е. С., Твердов И. Д., Долгова А. В. Сравнение модифицирующего действия золы рисовой и гречневой шелухи в эпоксидных антифрикционных покрытиях // *Вестник Югорского государственного университета*. 2021. Т. 63. N 4. С. 9–15. <https://doi.org/10.17816/byusu20210409-15>.

17. Perez J., Munoz-Dorado J., Rubia T., Martirnez J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview // *International Microbiology*. 2002. Vol. 5, no. 2. P. 53–63. <https://doi.org/10.1007/s10123-002-0062-3>.

18. Sanchez C. Ligno-cellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi // *Biotechnology Advances*. 2009. Vol. 27, no. 2. P. 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.001>.

19. Rahman W. A., Isa N. M., Rahmat A. R., Adenan N., Ali R. R. Rice husk/high density polyethylene bio-composite: effect of rice husk filler size and composition on injection molding processability with respect to impact property // *Advanced Materials Research*. 2009. Vol. 83-86. P. 367–374. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.83-86.367>.

20. Клебанович Н. В., Киндеев А. Л. Геоэкологическая оценка вариабельности свойств почв // *Вестник Удмуртского университета. Серия: Биология. Науки о Земле*. 2018. Т. 28. N 1. С. 91–102.

REFERENCES

1. Fomin V. A., Guzeev V. V. Biodegradable polymers, state and prospects of use. *Plasticheskie massy*. 2001;(5):42-46. (In Russian).

2. Rogovina S. Z. Biodegradable polymer compositions based on synthetic and natural polymers of various classes. *Vysokomolekulyarnye soedineniya. Seriya C*. 2016;58(1):68-80. (In Russian). <https://doi.org/10.7868/S2308114716010106>.

3. Gotlib E. M., Vdovina T. V., Yamaleeva E. S. Increasing the biodegradability of epoxy materials by means of vegetable oils and their oxygenated derivatives. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(4):700-707. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-700-707>.

4. Kenechi N.-O., Linus C., Kayode A. Utilization of rice husk as reinforcement in plastic composites fabrication – a review. *American Journal of Materials Synthesis and Processing*. 2016;1(3):32-36. <https://doi.org/10.11648/j.ajmsp.20160103.12>.

5. Andrzejewski J., Barczewski M., Szostak M. Injection molding of highly filled polypropylene-based biocomposites. Buckwheat husk and wood flour filler: a comparison of agricultural and wood industry waste utilization. *Polymers*. 2019;11(11):1-18. <https://doi.org/10.3390/polym11111881>.

6. Goodman B. A. Utilization of waste straw and husks from rice production: a review. *Journal of*

Bioresources and Bioproducts. 2020;5(3):145-169. <https://doi.org/10.1016/j.jobab.2020.07.001>.

7. Akhter F., Siddique M., Soomro S. A., Jamali A. R., Chandio Z. A., Ahmed M. Rice husk ash as green and sustainable biomass waste for construction and renewable energy applications: a review. *Bio-mass Conversion and Biorefinery*. 2021. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01527-5>.

8. Erofeev V. T., Smirnov V. F., Lazarev A. V., Bogatov A. D., Kaznacheev S. V., Rodin A. I., et al. Biological and climatic resistance of polymer composites. *Academia. Arkhitektura i stroitel'stvo = Academia. Architecture and Construction*. 2017;(1):112-119. (In Russian).

9. Akhmetzyanov R. R., Vagizov T. N., Galimov E. R. Development of compositions and manufacturing technology of dispersed-filled composite materials for units. *Vestnik Kazanskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta im. A. N. Tupoleva*. 2019;75(2):61-65. (In Russian).

10. Nourbakhsh A., Ashori A., Tabrizi A. K. Characterization and biodegradability of polypropylene composites using agricultural residues and waste fish. *Composites Part B: Engineering*. 2014;56:279-283. <https://doi.org/10.1016/J.COMPOSITESB.2013.08.028>.

11. Sergienko V. I., Zemnukhova L. A., Egorov A. G., Shkorina E. D., Vasilyuk N. S. Renewable sources of chemical raw materials: complex processing of rice and buckwheat production wastes. *Rossiyskiy khimicheskii zhurnal*. 2004;(3):117-124. (In Russian).

12. Gotlib E. M., Yamaleeva E. S., Ntsumu R. Sh., Valeeva A. R. Study of the effect of the temperature of buckwheat husk ash production on the antifriction properties and wear resistance of epoxy coatings. *Butlerovskie soobshcheniya = Butlerov Communications*. 2021;68(12):70-76. (In Russian). <https://doi.org/10.37952/ROI-jbc-01/21-68-12-70>.

13. Rohani A. B., Rosiyah Y., Seng N. G. Production of high purity amorphous silica from rice husk. *Procedia Chemistry*. 2016;19:189-195. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2016.03.092>.

[org/10.1016/j.proche.2016.03.092](https://doi.org/10.1016/j.proche.2016.03.092).

14. Vurasko A. V., Driker B. N., Mozyreva E. A., Zemnukhova L. A., Galimova A. R., Gulemina N. N. Energy-saving technology for the production of cellulose materials in the processing of agricultural waste. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*. 2006;(4):5-10. (In Russian).

15. Klintsevich V. N., Flyurik E. A. Methods of using buckwheat husk (review). *Zhurnal Trudy BGTU. Seriya 2: Khimicheskie tekhnologii, biotekhnologiya, geoekologiya = Proceedings of BSTU. Issue 2, Chemical Engineering, Biotechnology, Geoecology*. 2020;2(1):68-81. (In Russian).

16. Gotlib E. M., Valeeva A. R., Yamaleeva E. S., Tverdov I. D., Dolgova A. V. Comparison of the modifying effect of rice and buckwheat husk ash in epoxy antifriction coatings. *Vestnik Yugorskogo gosudarstvennogo universiteta = Yugra State University Bulletin*. 2021;63(4):9-15. (In Russian). <https://doi.org/10.17816/byusu20210409-15>.

17. Perez J., Munoz-Dorado J., Rubia T., Martirnez J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology*. 2002;5(2):53-63. <https://doi.org/10.1007/s10123-002-0062-3>.

18. Sanchez C. Ligno-cellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*. 2009;27(2):185-194. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.001>.

19. Rahman W. A., Isa N. M., Rahmat A. R., Adenan N., Ali R. R. Rice husk/high density polyethylene bio-composite: effect of rice husk filler size and composition on injection molding processability with respect to impact property. *Advanced Materials Research*. 2009;83-86:367-374. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.83-86.367>.

20. Klebanovich N. V., Kindeev A. L. Geostatic assessment of variability of soil properties. *Vestnik Udmurtskogo universiteta. Seriya: Biologiya. Nauki o Zemle = Bulletin of Udmurt University. Series Biology. Earth Sciences*. 2018;28(1):91-102. (In Russian).

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Е. М. Готлиб,
д.т.н., профессор,
Казанский национальный исследовательский
технологический университет,
420015, г. Казань, ул. Карла Маркса, 68,
Российская Федерация,
egotlib@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2318-7333>

Е. В. Перушкина,
к.т.н., доцент,
Казанский национальный исследовательский
технологический университет,
420015, г. Казань, ул. Карла Маркса, 68,
Российская Федерация,
perushkina_elena@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1403-364X>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Elena M. Gotlib,
Dr. Sci. (Engineering), Professor,
Kazan National Research Technological University,
68, Karl Marks St., 420015, Kazan,
Russian Federation,
egotlib@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2318-7333>

Elena V. Perushkina,
Cand. Sci. (Engineering), Associate Professor,
Kazan National Research Technological University,
68, Karl Marks St., 420015, Kazan,
Russian Federation,
perushkina_elena@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1403-364X>

Р. Ш. Нцуму,
аспирант,
Казанский национальный исследовательский
технологический университет,
420015, г. Казань, ул. Карла Маркса, 68,
Российская Федерация,
david_schelton@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-0056-5592>

Е. С. Ямалеева,
к.т.н., доцент,
Казанский национальный исследовательский
технологический университет,
420015, г. Казань, ул. Карла Маркса, 68,
Российская Федерация,
curls888@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5754-205X>

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.*

Информация о статье

*Поступила в редакцию 14.07.2022.
Одобрена после рецензирования 07.09.2022.
Принята к публикации 15.09.2022.*

Rutthe Sch. Ntsoumou,
Postgraduate Student,
Kazan National Research Technological University,
68, Karl Marks St., 420015, Kazan,
Russian Federation,
david_schelton@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-0056-5592>

Ekaterina S. Yamaleeva,
Cand. Sci. (Engineering), Associate Professor
Kazan National Research Technological University,
68, Karl Marks St., 420015, Kazan,
Russian Federation,
curls888@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5754-205X>

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.*

Information about the article

*The article was submitted 14.07.2022.
Approved after reviewing 07.09.2022.
Accepted for publication 15.09.2022.*



UV irradiation testing of biodiesel from the Alhagi oil and diesel-biodiesel mixtures

Salatin G. Guliyeva, Ibrahim G. Mamedov

Baku State University, Baku, Republic of Azerbaijan

Corresponding author: Ibrahim G. Mamedov, bsu.nmrlab@mail.ru

Abstract. The chemical stability of fuels is one of the key factors in ensuring the proper operation of combustion engines. Progressive destruction of components of diesel-biodiesel fuels during storage and transportation can adversely affect their physical and chemical parameters. Besides, the destruction of petroleum products under sunlight and the formation of toxic compounds have ecological importance. The purpose of the presented work is to investigate the influence of UV irradiation ($\lambda = 300\text{--}450\text{ nm}$) on the chemical content of petroleum diesel and B5, B10, B20, B50, and B100 fuel blends for the 24 h. As biodiesel, the product of transesterification of non-edible Alhagi oil with methanol was used. Chemical changes after irradiation were controlled by the BRUKER FT NMR spectrometer. The relationship between changes in the chemical composition and important physicochemical parameters (density, viscosity, flash point, and cetane index), before and after photochemical destructions was discussed. Based on the obtained results, it was determined that the B20 fuel mixture has more chemical stability after UV irradiation than conventional diesel and other diesel-biodiesel mixtures.

Keywords: UV irradiation, photo-destruction, biodiesel, Alhagi oil

For citation: Guliyeva S. G., Mamedov I. G. UV irradiation testing of biodiesel from the Alhagi oil and diesel-biodiesel mixtures. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2022;12(3):455-461. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-455-461>.

CHEMICAL TECHNOLOGY

Научная статья

УДК 662.75 + 662.756

Тестирование УФ-облучением биодизеля из масла верблюжьей колючки и дизель-биодизельных смесей

Салатын Габиль Кулиева, Ибрагим Гариб Мамедов

Бакинский государственный университет, г. Баку, Республика Азербайджан

Автор, ответственный за переписку: Мамедов Ибрагим Гариб, bsu.nmrlab@mail.ru

Аннотация. Химическая стабильность топлив является одним из ключевых факторов обеспечения исправной работы двигателей внутреннего сгорания. Прогрессирующая деструкция компонентов дизель-биодизельных топлив при хранении и транспортировке может отрицательно сказаться на их физико-химических показателях. Кроме того, разрушение нефтепродуктов под действием солнечных лучей и образование токсичных соединений имеет экологическое значение. Целью представленной работы является исследование влияния УФ-облучения ($\lambda = 300\text{--}450\text{ nm}$) на химический состав нефтяного дизельного топлива и топливных смесей B5, B10, B20, B50 и B100 в течение 24 ч. В качестве биодизеля использовали продукт переэтерификации пищевого масла верблюжьей колючки с метанолом. Химические изменения после облучения контролировали с помощью ЯМР-спектрометра FT BRUKER. Изучена взаимосвязь изменений химического состава и важных физико-химических параметров (плотность, вязкость, температура вспышки, цетановое число) до и после фотохимической деструкции. На основании полученных результатов установлено, что топливная смесь B20 обладает большей химической стабильностью после УФ-облучения, чем обычное дизельное топливо и другие дизель-биодизельные смеси.

Ключевые слова: УФ-облучение, фотодеструкция, биодизель, масло верблюжьей колючки

Для цитирования: Кулиева С. Г., Мамедов И. Г. Тестирование УФ-облучением биодизеля из масла верблюжьей колючки и дизель-биодизельных смесей // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2022. Т. 12. N 3. С. 455–461. (In English). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-455-461>.

© Guliyeva S. G., Mamedov I. G., 2022

INTRODUCTION

Despite the use of diesel fuel having a clear negative impact on the environment, it still remains the leader in terms of consumption among all commercial liquid fuels. The increasing demand for fuel, depletion of fossil fuels, and protection of the environment from the harmful effects of fossil fuels are forcing us to find new alternatives to petroleum fuels. One of the alternative fuels for internal combustion engines is biodiesel. Biodiesel fuels have the potential advantages of lower emissions, longer engine life due to better lubrication, biological decomposition, high cetane number, absence of aromatic, nitrogen and sulfur compounds [1–3].

One of the main factors that ensure the proper operation of diesel engines is the chemical stability of the fuel. During the transportation, storage and ecological pollution, petroleum products are regularly exposed to sunlight, which leads to the progressive destruction of components of fuels with the formation of toxic compounds. Except these, chemical changes seriously affect the physicochemical and exploitation parameters of the fuel, resulting in engine failure [4].

As we know, diesel fuel is a complex mixture obtained from the fractional distillation of crude oil and consists of a mixture of aliphatic, aromatic and olefin hydrocarbons [5]. Biodiesel, one of the environmentally friendly and alternative fuels, is obtained by transesterification of saturated and unsaturated fatty acids with simply alcohols. Diesel and biodiesel fuels contain a certain number of unsaturated compounds with high reactivity. It can lead to chemical changes in the chemical composition of fuels during long-term storage, transportation and pollution. Also, ultraviolet rays from the sun accelerate the decomposition of organic compounds and subject them to photo-destruction [6]. The destruction of components of diesel and biodiesel fuels also has a negative impact on physical and chemical parameters, which in turn can lead to some problems with the regular operation and performance of combustion engines [7].

Considering the above indicated, the purpose of this study is to investigate changes in the chemical composition of diesel and diesel-biodiesel mixtures under ultraviolet irradiation (300–450 nm) and their influence on exploitation properties. Testing of chemical changes under UV was investigated by using NMR spectroscopy.

MATERIALS AND METHODS

Samples of diesel fuel and Alhagi oil used for the study were obtained from a gas station and a pharmacy in Baku, Azerbaijan.

To stimulate natural solar irradiation, a visible and UV-emitting model PRK2-IV-59 model using a lamp with a wavelength of 300–450 nm was used.

NMR experiments were performed on a BRUKER FT NMR spectrometer (UltraShield™ Magnet) AVANCE 300 (300.130 MHz for ^1H and 75.468 MHz for ^{13}C) with a BVT 3200 variable temperature unit in 5 mm sample tubes using Bruker Standard software (TopSpin 3.1). The ^1H and ^{13}C chemical shifts were

referenced to internal tetramethylsilane (TMS). NMR-grade CDCl_3 was used for the analysis of fuel blends.

The procedure for preparation of biodiesel. For the synthesis of biodiesel (B100), 0.69 g of KOH was dissolved in 37.5 ml of methanol (CH_3OH) without heating (at room temperature). After complete dissolution, 50 g of non-edible Alhagi oil was added to this mixture. The reaction was carried out in a conical flask equipped with a reverse refrigerator and magnetic stirrer at 55 °C for 6 h (rotation speed was maintained at 1000 rpm). After mixing, the reaction mass was kept in the separator funnel for at least 12 h. The reaction mass was divided into 2 layers using a separating funnel: biodiesel in the upper layer and glycerin in the lower layer. It was washed several times with water to remove untreated biodiesel catalysts. 5 g of Na_2SO_4 was added to the pure biodiesel and filtered through filter paper after 12 h of storage. B5, B10, B20, and B50 diesel-biodiesel mixtures were prepared on the basis of received diesel fuel and diesel fuel obtained from filling stations. Biodiesel and diesel-biodiesel mixtures synthesized from non-edible Alhagi oil have been characterized in accordance with the American Test and Materials Standard (ASTM) methods (relative density – D1298, kinematic viscosity – D445, flash point – D93).

Samples of Experiments of UV irradiation. 3 ml of each of B0, B5, B10, B20, B50, B100 samples, prepared in the appropriate proportions with crude diesel and Alhagi biodiesel and were added to the closed glass ampoules. The samples were irradiated for 24 h at room temperature (20 °C) by means of a model lamp PRK2-IV-59, which emits visible and UV (300–450 nm) rays. Within 24 h, visible changes occurred in each of the samples (Fig. 1 and 2). Samples were analyzed on a BRUKER FT NMR spectrometer to determine changes in chemical composition.

RESULT AND DISCUSSION

As known, diesel fuel is a complex mixture of aliphatic, aromatic, and olefin hydrocarbons. In diesel fuel, aliphatic hydrocarbons are in the form of normal paraffinic, isoparaffinic, and cycloparaffinic, while aromatic hydrocarbons are benzene and its derivatives: alkylbenzenes, benzo cyclopentane, benzo cyclopentene, tetralin, biphenyl, naphthalene, fluorenes, phenanthrene, etc. [8, 9]. Biodiesel fuel consists of alkyl esters of various fatty acids, which, depending on the oil obtained, contain 1, 2 or 3 unsaturated double bonds [1, 2]. The presence of large amounts of unsaturated compounds with π electrons in diesel and biodiesel fuels confirms the possibility of oxidation, polymerization and other destruction reactions of double bonds, which are commonly accepted mechanisms of photo-destruction during UV irradiation. As a result of the absorption of ultraviolet and visible light, photons collide with π electrons, and these π electrons easily become excited. These changes are likely to indicate that photo-destruction processes are taking place in fuel components under the influence of UV rays [5, 8]. The energy of photons in UV rays with a wavelength of 300–450 nm varies in



Fig. 1. Diesel, B5, B10, B20, B50 and B100 blends before the UV irradiation

Рис. 1. Дизель, смеси B5, B10, B20, B50 и B100 до УФ-облучения



Fig. 2. Diesel, B5, B10, B20, B50 and B100 blends after the UV irradiation

Рис. 2. Дизель, смеси B5, B10, B20, B50 и B100 после УФ-облучения

the range of about 266–400 kC/mol. During this excitement, physical and photochemical changes occur and photo-destruction processes take place in diesel and biodiesel components [10–12].

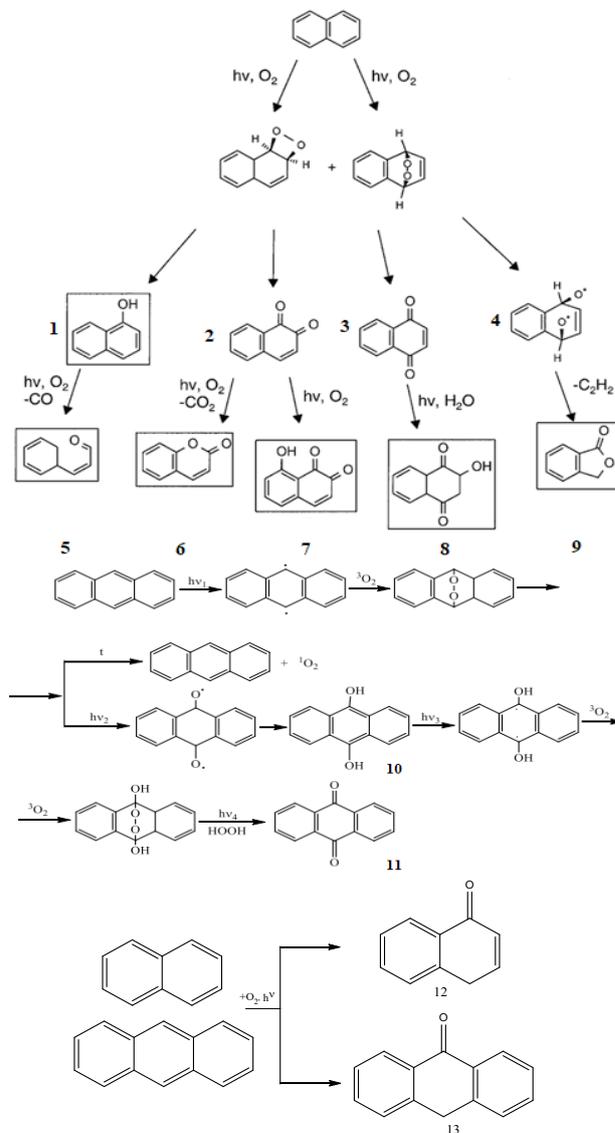
The fact that this energy exceeds the dissociation energy of certain unsaturated compounds in diesel and biodiesel fuels leads to the formation of radical centers, resulting in many chemical reactions [13]. Polycyclic aromatic hydrocarbons in heavy fuels are the most sensitive to photo-oxidation and are easily destroyed when exposed to sunlight [14]. Solar irradiation and the presence of oxygen cause the oxidation of these hydrocarbons, including various oxygenated hydrocarbons, aliphatic and aromatic ketones, aldehydes, carboxylic acids, fatty acids, esters, epoxides [15].

As shown in Scheme 1 during the photo-oxidation of polyaromatic hydrocarbons, aromatic ketones are formed, which first carry one oxygen atom and then combine two or more oxygen atoms. The deeper the photo-destruction, these polycyclic ketones can be converted into smaller acids, ketones and epoxides.

In addition to photo-oxidation, polyaromatic hydrocarbons undergo a dimerization reaction under the influence of UV irradiation (Scheme 2) [16–17].

Like polyaromatic hydrocarbons, alkylbenzenes in diesel fuel can be converted into oxygenated compounds such as aromatic ketones and alcohols [18–22].

For example, in the presence of air, under the influence of ultraviolet rays, 1-methylnaphthalene is initially converted to oxidized compounds in the side chain, such as 1-naphthaldehyde, 1-naphthoic acid and 1 naphthalenemethanol and in the next step to the products opened by the ring. Significant dimeriza-

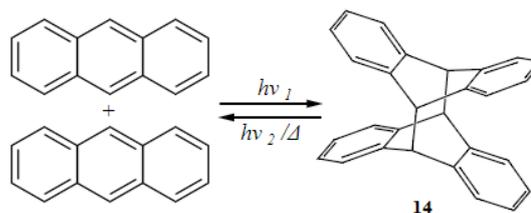


Scheme 1. Photo-oxidation products of naphthalene and anthracene

Схема 1. Продукты фотоокисления нафталина и антрацена

tion occurs when the reaction is carried out in an inert atmosphere (Scheme 3) [23].

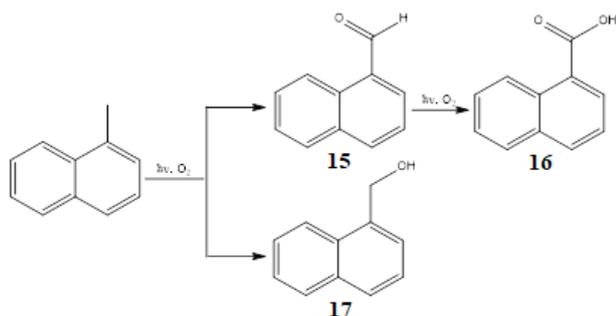
In addition to diesel fuel, biofuels obtained from



Scheme 2. Photo-dimerization product of anthracene

Схема 2. Продукт фотодимеризации антрацена

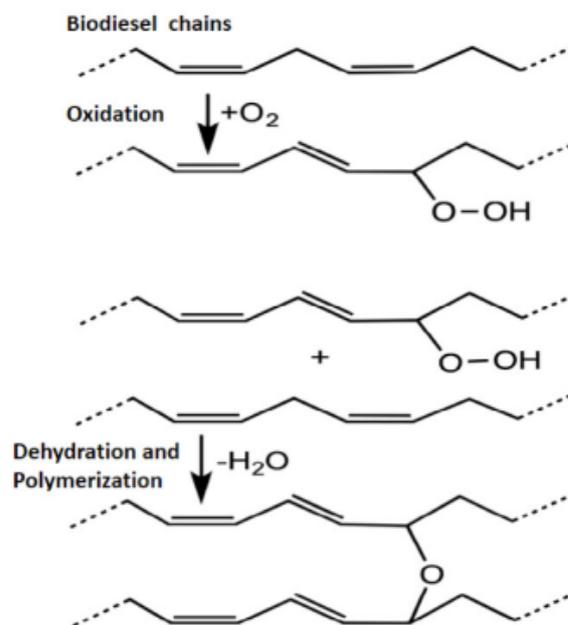
the transesterification of fatty acids with simple alcohols can also undergo photochemical transformations. Alhagi oil has the highest percentage of linoleic acid (50–54%), oleic acid (23–29%) and palmitic acid (7–8%) among the additional fatty acids [24]. The unsaturated compounds have a strong effect on the stability of biodiesel. Polyunsaturated esters are more sensitive to oxidation than saturated or unsaturated esters. This is due to the fact that the double bonds in the fatty acid esters are not in the conjugated structures, but in the configuration isolated with methylene. The bis-allylic in



Scheme 3. Photo-oxidation products of alkylbenzenes
Схема 3. Продукты фотоокисления алкилбензолов

these structures is sensitive to the abstraction of hydrogen by free radicals, which easily form hydroperoxides with elemental oxygen. The resulting peroxides are relatively unstable, reacting intramolecularly to break down the double-bonded compound into low-molecular-weight radicals, which then form acids, aldehydes, ketones, alcohols, olefins, and alkanes. These species, in turn, undergo reactions to form oligomeric and polymer products (Scheme 4) [25–27].

Changes in the samples are clearly visible at first glance for B5, B10, B20, B50, and B100 fuels made from diesel and non-edible Alhagi oil are exposed to UV rays (300–450 nm) for 24 h. After ultraviolet irradiation, the color of the fuel samples darkens (brown), turbidity and a small amount of brown sediment is observed at the bottom of the sample container (Fig. 1 and 2). This precipitation is likely to be caused by the gum formation of fuel compounds [4, 5]. Along with conventional petroleum diesel, visible changes in the color of biodiesel samples are also observed, which indicates that serious chemical



Scheme 4. Photo-oxidation products of biodiesel
Схема 4. Продукты фотоокисления биодизеля

transformations are taking place in the fuel. To discuss these changes, before and after UV irradiation using the ^1H NMR spectroscopy method amounts of alkanes, olefins, and aromatic hydrocarbons in diesel and biodiesel fuel samples were determined (Tab. 1). Analyzing the obtained data, we can see different changes in the amounts of paraffin, aromatic, and olefin hydrocarbons in the content of diesel-biodiesel mixtures under UV rays for 24 h.

As seen from Tab. 1, while the concentration of some hydrocarbons decreases, others increase. It is believed that these changes are due to processes such as photo-oxidation, destruction, and polymerization by UV irradiation.

Comparing the NMR ^1H spectra of diesel fuel before and after ultraviolet irradiation, we can see the amounts of paraffin hydrocarbons increased under the influence of UV rays, while the amount of aromatic and olefin hydrocarbons decreased. This indicates the possibility of the conversion of aromatic and olefin hydrocarbons to saturated hydrocarbon fragments as a result of the photo-destruction of unsaturated

Table 1. Determination of hydrocarbon content of fuel blends from the ^1H NMR spectra before and after UV irradiation

Таблица 1. Определение содержания углеводородов в топливных смесях по спектрам ЯМР ^1H до и после УФ-облучения

Before UV irradiatin	PH	OH	AH	After UV irradiation	PH	OH	AH
Diesel	95.1	0.5	4.7	Diesel	96.4	0.0	3.6
B5	95.5	0.7	3.3	B5	94.8	0.8	1.9
B10	94.2	0.8	2.6	B10	94.6	1.2	1.7
B20	97.0	1.1	1.9	B20	96.5	1.7	1.3
B50	92.9	4.3	2.4	B50	96.1	3.1	0.9

Note. *PH – paraffinic hydrocarbons; OH – olefinic hydrocarbons; AH – aromatic hydrocarbons.

compounds in diesel fuel. It can be explained that (Scheme 1 and 2) firstly in diesel 2 and 3 ring aromatic hydrocarbons, such as naphthalene, anthracene, and pyrene are photo-destroyed by UV irradiation. In this case, as a result of oxidation of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) obtained products carrying 1 oxygen atom, such as naphthone (**12**) and anthrone (**13**), NMR signals shift to the right in the ¹H spectrum to paraffinic hydrocarbons. The decrease of the aromatic and increase of paraffinic hydrocarbons is connected by the formation of **1-3**, **5-9**, **11-14** type hydrocarbons and saturation of double bonds.

We can note that, as a result of such destruction processes, changes in the physical and chemical parameters of the fuel are also observed: density, flash-point (for B10, B20 and B100), viscosity, and cetane number decrease. The results of the physical parameters also confirm the results of the ¹H NMR. In diesel fuel, the components are destructed to low-viscosity and density compounds compared to primary substances (Tab. 2 and 3). Cetane number of diesel fuel is decreased as a result of the formation of oxygen-containing compounds, such as ketones, alcohols, etc.

After UV irradiation in B5 fuel, a decrease of aromatic and paraffinic hydrocarbons is observed, but an increase in olefin hydrocarbons is observed. Based on obtained results, it is assumed that increasing of olefins is connected to the 5% presence of FAME Alhagi oil with the double bonds. The reason of the decreasing of paraffinic hydrocarbons is due to the replacement of hydrogen in the –CH₂– group with –CH–OOH-type hydrogen in the paraffinic hydrocarbons. Decreasing amounts of aromatic hydrocarbons are connected by the formations of **1-3**, **5-9**, **11**, **14** type compounds. Changes in the physical and chemical parameters of B5 fuel are also observed as in conventional diesel fuel (Tab. 2 and 3).

An increase in the amounts of methyl esters of fatty acids in diesel fuel (B10) resulted in an increase in

the amount of paraffin and olefin hydrocarbons after UV irradiation and a decrease in aromatic hydrocarbons. Decreases were observed in the physical and chemical parameters of the fuel, such as density, viscosity, flash point, cetane number. The decrease of the aromatic and increase of paraffinic hydrocarbons also is connected by the formation of **1-3**, **5-9**, **11-14** type hydrocarbons and reaction of double bonds.

A decrease in the amount of paraffin and aromatic hydrocarbons in the B20 mixture was observed, but a slight increase in the amounts of olefin hydrocarbons was observed. Changes in hydrocarbon content can be explained by a decrease in paraffin hydrocarbons and an increase in olefin hydrocarbons, as in the case of B5 fuel. Thus, the density and viscosity of these compounds are lower than those of the original substances.

According to the results obtained from the ¹H NMR spectra, the photochemical changes observed in the B50 fuel mixture are in the direction of increasing the amounts of paraffin hydrocarbons and decreasing the amounts of olefins and aromatic hydrocarbons. As seen, the B50 fuel contains 50% of diesel and 50% methyl esters of fatty acids. The decrease of the aromatic and increase of paraffinic hydrocarbons also can be is connected by the formation of **1-3**, **5-9**, **11-14** type hydrocarbons and saturation of double bonds. But a decrease in the amounts of olefins in the B50 fuel is likely connected to the dimerization and polymerization reactions, the formation of more heavy products than primary (Scheme 2–4). At the same time, the presence of dimerization polymerization reactions manifests itself in physical properties (increase density, viscosity, cetane number, flashpoint) (Tab. 2, 3).

As a result of the high absorption of methyl esters of fatty acids in fuel B100, the fuel lost its color after UV irradiation (Fig. 1). This visible change is reflected in the ¹H NMR data. Thus, the amount of C18:2 before UV irradiation was 52%, C18:3 1%, and after UV irradiation

Table 2. Properties of biodiesel and diesel samples before UV irradiation

Таблица 2. Свойства образцов биодизеля и дизельного топлива до УФ-облучения

Properties	Diesel	B5	B10	B20	B50	B100
Density at 20 °C, g/cm ³	0.848	0.852	0.856	0.862	0.866	0.899
Viscosity, at 20 °C, mm ² /s	5.142	5.309	5.424	5.515	6.065	9.012
Viscosity, at 40 °C, mm ² /s	3.128	3.348	3.422	3.561	3.781	6.230
Cetane number	43.350	43.236	43.081	42.949	43.764	47.350
Flash point, °C	77	89	98	104	119	177

Table 3. Properties of biodiesel and diesel samples after UV irradiation

Таблица 3. Свойства образцов биодизеля и дизельного топлива после УФ-облучения

Properties	Diesel	B5	B10	B20	B50	B100
Density at 20 °C, g/cm ³	0.845	0.849	0.852	0.855	0.868	0.897
Viscosity, at 20 °C, mm ² /s	4.797	5.206	5.106	5.376	6.197	7.419
Viscosity, at 40 °C, mm ² /s	3.017	3.237	3.273	3.317	3.880	4.637
Cetane number	42.290	42.857	42.675	43.058	43.880	44.643
Flash point, °C	87	101	94	97	122	163

C18:2 43%, C18:3 0.1%. As can be seen, the process of photo-destruction of more unsaturated (C18:3) FAMES occurs first. At the same time, the formation of ketone, aldehyde, and alcohol types compounds is influenced to the physical properties of B100 (decrease density, viscosity, cetane number, flashpoint) (Tab. 2, 3).

CONCLUSIONS

This article is devoted to testing the chemical stability of diesel, diesel-biofuel (from the Alhagi oil) mixtures B5, B10, B20, and B50 against UV irradiation for 24 h. The results showed that photo-destruction processes occur under the influence of UV irradiation, which affects the physico-chemical and exploitation properties of the fuel. As seen from the obtained data, photo-oxidation by UV is negatively influenced the stability of fuels. Including indicated taken place

gum formation processes. It can lead to a malfunction of the fuel engine. However, one of the most important contributions of this work was to obtain a more physicochemical stable fuel mixture under the conditions studied. Obtained data, shows that B20 more stable fuel blend, than diesel (B0), B5, B10, B50, and B100. We think the most effective ratio of diesel to biodiesel can be a mixture of B20, which is the least susceptible to structural changes under the action of UV irradiation. B20 causes only a 4% change in its chemical composition after UV irradiation, and in the quality parameters of the fuel, it retains its properties more than other fuels (Tab. 1). The reported work may be interesting when studying the application of diesel, biodiesel, or their mixtures in different storage, and transportation conditions, and also it has environmental importance.

REFERENCES

1. Mamedov I., Huseynova S., Javadova O., Azimova N., Huseynova R., Gasimova S. Testing of pine oil and glycerol ketal as components of B10 fuel blend. *Energy, Environment and Storage*. 2010;11:11–14.
2. Mamedov I. G., Javadova O. N., Asimova N. V. Preparation of diesel fuel blends and study of their physical properties. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(2):332–338. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-2-332-338>.
3. Janaun J., Ellis N. Perspectives on biodiesel as a sustainable fuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2010;14(4):1312–1320. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.12.011>.
4. Rafał J., Kołomański K., Wądrzyk M., Lewandowski M., Dudek M., Suwała W., et al. Degradation of petroleum diesel fuel accelerated by UV irradiation: the impact of ageing on chemical composition and selected physicochemical properties. *E3S Web of Conferences*. 2019;108:1–14. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/201910802003>.
5. Gad S. C. Diesel Fuel. *Encyclopedia of Toxicology*. 2014;1:115–118.
6. Andrea P., Claudia D., Elke Z. UV irradiation of natural organic matter (NOM): impact on organic carbon and bacteria. *Aquatic Sciences*. 2012;74(3):443–454. <https://doi.org/10.1007/s00027-011-0239-y>.
7. Bouilly J., Mohammadi A., Iida Y., Hashimoto H., Geivanidis S., Samaras Z. Biodiesel stability and its effects on diesel fuel injection equipment. *Search Technical Papers*. 2012;17:2688–3627. <https://doi.org/10.4271/2012-01-0860>.
8. Zhang H., Jin D., Zhao X. J. UV Induced degradation of crude oil in polluted water based on analysis of environmental materials. *Advanced Materials Research*. 2012;534:333–336. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.534.333>.
9. Chang S. H. Diesel fuel analysis. *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation*. 2002;9:6613–6622. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a1806>.
10. Emad Y., Raghad H. Photodegradation and photostabilization of polymers, especially polystyrene: review. *Springer Plus*. 2013;398(2):1–32. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-398>.
11. Richard F. L. Photo-oxidation and photo-toxicity of crude and refined oils. *Spill Science & Technology Bulletin*. 2003;8:157–162. [https://doi.org/10.1016/S1353-2561\(03\)00015-X](https://doi.org/10.1016/S1353-2561(03)00015-X).
12. Silva C. W., Castro M. P. P., Perez V. H., Machado F. A., Mota L., Sthel M. S. Thermal degradation of ethanolic biodiesel: physicochemical and thermal properties evaluation. *Energy*. 2016;114:1093–1099. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2016.08.052>.
13. Denisov E. T., Tumanov V. E. Estimation of the bond dissociation energies from the kinetic characteristics of liquid-phase radical reactions. *Russian Chemical Reviews*. 2005;74(9):825–858. <https://doi.org/10.1070/RC2005v074n09ABEH001177>.
14. Prince R. C., Lessard R. R. Crude oil releases to the environment: natural fate and remediation options. *Encyclopedia of Energy*. 2004;1:727–736.
15. Zodiatis G., Lardner R., Spanoudaki K., Sofianos S., Radhakrishnan H., Coppini G. et al. Operational oil spill modelling assessments. In: *Marine Hydrocarbon Spill Assessments*. 2021; p. 145–197. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819354-9.00010-7>.
16. Bouas-Laurent H., Castellanb A., Desvergne J.-P., Lapouyade R. Photodimerization of anthracenes in fluid solution: structural aspects. *Chemical Society Reviews*. 2000;29(1):43–55. <https://doi.org/10.1039/A8018211>.
17. Lennartson A., Roffey A., Moth-Poulsen K. Designing photoswitches for molecular solar thermal energy storage. *Tetrahedron Letters*. 2015;56:1457–1465.
18. McConkey B. J., Hewitt L. M., Dixon D. G., Greenberg B. M. Natural sunlight induced photooxidation of naphthalene in aqueous solution. *Water, Air, and Soil Pollution*. 2002;136:347–359. <https://doi.org/10.1023/A:1015223806182>.
19. Peter P. F., Qingsu X., Xin S., Hongtao Yu. Phototoxicity and environmental transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) — light-induced reactive oxygen species, lipid peroxidation, and DNA damage. *Journal of Environmental Science and Health. Part*

C, *Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews*. 2012;30(1):1–41. <https://doi.org/10.1080/10590501.2012.653887>.

20. Roberts A. P., Alloy M. M., Oris J. T. Review of the photo-induced toxicity of environmental contaminants. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2017;191:160–167. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.10.005>.

21. Richard F.L. Photo-oxidation and photo-toxicity of crude and refined oils. *Spill Science & Technology Bulletin*. 2003;8:157–162. [https://doi.org/10.1016/S1353-2561\(03\)00015-X](https://doi.org/10.1016/S1353-2561(03)00015-X).

22. Shankar R., Shim W. J., An J. G., Yim U. H. A practical review on photooxidation of crude oil: laboratory lamp setup and factors affecting it. *Water Research*. 2015;68:304–315. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.10.012>.

23. Feng Y.-L., Nandy J. P., Hou Y., Breton F., Lau B., Zhang J., et al. UV Light induced transformation of 1-methylnaphthalene in the presence of air and its

implications for contaminants research. *Journal of Environmental Protection*. 2012;3(11):1519–1531. <https://doi.org/10.4236/jep.2012.311168>.

24. Fathi-Achachlouei B., Azadmard-Damirchi S. Milk thistle seed oil constituents from different varieties grown in Iran. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2009;86(7):643–649. <https://doi.org/10.1007/s11746-009-1399-y>.

25. McCormick R. L., Westbrook S. R. Storage stability of biodiesel and biodiesel blends. *Energy Fuels*. 2010;24:690–698. <https://doi.org/10.1021/ef900878u>.

26. Christensen E. D., McCormick R. L. Long-term storage stability of biodiesel and biodiesel blends. *Fuel Processing Technology*. 2014;128:339–348. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2014.07.045>.

27. Bruna E. A., de Rezende D. B., Pasa V. Aging and stability evaluation of diesel/biodiesel blends stored in amber polyethylene bottles under different humidity conditions. *Fuel*. 2020;279:118289. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.118289>.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Salatin G. Guliyeva,
PhD, Doctoral Student,
Baku State University,
23, Khalilov St., Baku, Az1148,
Republic of Azerbaijan,
abdurahmanlisalatin@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-2412-4596>

Ibrahim G. Mamedov,
Dr. Sci. (Chemistry), Professor,
Baku State University,
23, Khalilov St., Baku, Az1148,
Republic of Azerbaijan,
bsu.nmrlab@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5757-9899>

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.

Information about the article

*The article was submitted 10.04.2022.
Approved after reviewing 08.09.2022.
Accepted for publication 15.09.2022.*

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

С. Г. Кулиева,
докторант (PhD),
Бакинский государственный университет,
Az-1148, г. Баку, ул. З. Халилова, 23,
Республика Азербайджан,
abdurahmanlisalatin@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-2412-4596>

И. Г. Мамедов,
д.х.н., профессор,
Бакинский государственный университет,
Az-1148, г. Баку, ул. З. Халилова, 23,
Республика Азербайджан,
bsu.nmrlab@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5757-9899>

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.

Информация о статье

*Поступила в редакцию 10.04.2022.
Одобрена после рецензирования 08.09.2022.
Принята к публикации 15.09.2022.*

Original article

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-462-470>



Study on thermal decomposition and enrichment quality of coal from Mogoin gol deposit in Mongolia

Damdin Batkhishig, Enkhbold Shagjjav, Sanjaa Batbileg, Ariunbold Ankhtuya, Barnasan Purevsuren

Institute of Chemistry and Chemical Technology, Mongolian Academy of Sciences, Ulaanbaatar, Mongolia
Corresponding author: Damdin Batkhishig, batkhishigee@gmail.com

Abstract. The main purpose of this study is to investigate the thermal stability and the mechanism of thermal decomposition of Mogoin gol coal, the possibility of liquefaction by pyrolysis and thermolysis, and the possibility of enriching by heavy liquids to reduce the mineral content of coal and improve its quality. Under this purpose, the Mogoin gol coal was characterized by proximate and ultimate analysis, thermogravimetry, and investigated its thermal decomposition (thermolysis and pyrolysis). Thermogravimetric analysis was performed using Japanese HITACHI TG/DTA7300 instrument and pyrolysis investigation was carried out at different heating temperatures 200–700 °C with constant heating rate 20 °C/min for 80 min. On the basis of proximate and elemental analysis results, it has been indicated that the Mogoin gol coal is high-rank coking coal. The pyrolysis of Mogoin gol coal was studied by SNOL furnace at different heating temperatures and obtained from pyrolysis products such as hard residue, tar, pyrolytic water, and gas. From pyrolysis, the yield of pyrolysis tar (6.28 %) was highest at 700 °C. The experiment of thermal decomposition (thermolysis) was carried out in air closed autoclave at 350–450 °C and using hydrogen donor solvent (tetraline) with different mass ratios of coal and solvent (1:1.75; 1:1.5). In the thermolysis experiment, the yield of liquid product is highest with the coal-solvent ratio of 1: 1.5 at 450 °C.

Keywords: thermolysis, pyrolysis, enrichment, liquid product, thermogravimetry

For citation: Batkhishig D., Shagjjav E., Batbileg S., Ankhtuya A., Purevsuren B. Study on thermal decomposition and enrichment quality of coal from Mogoin gol deposit in Mongolia. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2022;12(3):462-470. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-462-470>.

ХИМИЧЕСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ

Научная статья
УДК 662.642

Исследование термического разложения и качества обогащения угля месторождения Могоин-гол в Монголии

Дамдин Батхишиг, Энхболд Шагжав, Санджаа Батбилег, Ариунболд Анхтуя, Барнасан Пуревсурен

Институт химии и химической технологии Монгольской академии наук, г. Улан-Батор, Монголия
Автор, ответственный за переписку: Батхишиг Дамдин, batkhishigee@gmail.com

Аннотация. Основной целью настоящего исследования является изучение термической стабильности и механизма термического разложения угля Могоин-гол, возможности ожижения пиролизом и термолизом, а также возможности обогащения тяжелыми жидкостями для снижения минеральности угля и улучшения его свойств. С этой целью могоин-гольский уголь охарактеризован при помощи экспрессивного, предельного анализа и термогравиметрии, исследовано его термическое разложение (термолиз и пиролиз). Термогравиметрический анализ проводили на японском приборе HITACHI TG/DTA7300, изучение пиролиза осуществляли при различных температурах нагрева (200–700 °C) с постоянной скоростью нагрева 20 °C/мин в течение 80 мин. На основании результатов экспресс- и элементного анализа установлено, что могоин-гольский уголь относится к высокосортым коксующимся уголям. Пиролиз могоин-гольского угля изучался в печи СНОЛ при различ-

© Batkhishig D., Shagjjav E., Batbileg S., Ankhtuya A., Purevsuren E., 2022

ных температурах нагрева и получен из продуктов пиролиза, таких как твердый остаток, гудрон, пиролитическая вода и газ. При пиролизе выход пиролизной смолы (6.28%) был самым высоким при температуре 700 °С. Опыт термического разложения (термолиз) проводили в автоклаве закрытого типа при температуре 350–450 °С с использованием растворителя-донора водорода (тетралина) при различном массовом соотношении угля и растворителя (1:1,75; 1:1,5). В эксперименте по термолизу выход жидкого продукта максимален при соотношении уголь–растворитель 1:1,5 при температуре 450 °С.

Ключевые слова: термолиз, пиролиз, обогащение, жидкий продукт, термогравиметрия

Для цитирования: Батхишиг Д., Шагжав Э., Батбилег С., Анхтуя А., Пуревсурен Б. Исследование термического разложения и качества обогащения угля месторождения Могоин-гол в Монголии // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2022. Т. 12. N 3. С. 462–470. (In English). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-462-470>.

INTRODUCTION

Mongolia is among the 10 coal rich countries in the world with the 175 billion ton of geologically estimated coal resources including high quality bituminous coking coals, subbituminous coals and brown coals. More than 1.8 billion ton of this coal resource belongs to the high coking coal. It is important that, to study the mechanism of thermal decomposition of coal, necessary to reduce the amount of minerals in coal [1]. Coal and coal products will play an increasingly important role in fulfilling the energy needs of our society [2–3]. Based on IEA 2008 report, coal accounts for about 26% of the total world primary energy consumption in 2006 [4, 5]. Thermal analysis has been widely used in the recent years for the investigation of combustion and pyrolysis behavior of fossil fuels such as coal, oil shales and tar sands [6–8]. Thermal properties of coal play a significant role industry and impact on coal combustion on environmental pollution. Converting coal into oil and gas allows coal to be utilized as an alternative fuel, which will affect the national security and the economically sustainable development [6–12].

Thermogravimetry is usually used as a means of determining pyrolytic characteristics and kinetic parameters. Thermogravimetry measures the weight change of a tested material as a function of temperature or time in a controlled atmosphere, such as nitrogen or argon atmosphere [13–15]. Measurements are used primarily to determine the composition of materials and to predict their thermal stability at temperatures up to 1000 °С. On the other hand pyrolysis is an efficient form (method) of treatment of organic material at elevated temperatures in the absence of oxygen [16]. It involves the simultaneous and irreversible change of chemical composition and physical phase during thermochemical decomposition of organic material by heat. As a result of pyrolysis, solid (hard residue), condensed liquid (tar and pyrolysis water) and gas (uncondensed) products can be obtained. Solid product is porous material with higher caloric value which can be used as coke, semi-coke, smokeless fuel, adsorbent material and so on. Tar is petroleum like product and can be used as complex raw material for production of chemical substances, gasoline, diesel, oils, bituminous and so on. The gas product can be used as gas fuel after cleaning of nitrogen and sulfur containing pollutants in it [17].

Enrichment plays an important role in increasing the efficiency and effectiveness of coal mining and exploitation. Coal minerals have included some harmful elements in the environment. It is a negative impact on all processes of its use. Reducing the mineral content of coal can significantly reduce its transportation costs, while raw coal used for coking and direct liquefaction of coal is required to be low in minerals [14, 15]. As of 2006, 1/3 of the world's total mined coal was enriched, and there are about 2,500 enrichment plants, of which 2,000 (with a total capacity of 800 million tons/year) are in China and 265 (with a total capacity of 986 million tons/year) in the United States, 53 (total capacity 134 million tons/year) in India, 87 (total capacity 95 million tons/year) in Russia, and 70 million tons/year in Australia [16]. It is possible to reduce the amount of sulfur oxides and volatile toxic elements released from coal combustion by the coal enrichment method [17, 18].

The main purpose of this study is to investigate the thermal stability and the mechanism of thermal decomposition of Mogoin gol coal, the possibility of liquefaction by pyrolysis and thermolysis, and the possibility of enriching by heavy liquids to reduce the mineral content of coal and improve its quality.

EXPERIMENTAL

The Mogoin gol coal is located in the province Khuvsgul 930 km from Ulaanbaatar, 210 km west of Murun soum of Khuvsgul aimag, and 22 km southeast of Tsetserleg soum, Khuvsgul aimag. The total coal resources are 11 million tons.

The analytical samples of Mogoin gol coal were prepared according to ASTM D 2797. The proximate and ultimate analysis were performed according to MNS 656-79 (moisture content), MNS 652-79 (ash yield), MNS 654-79 (volatile matter yield), MNS 669-87 (gross calorific value) and MNS 895-79 (sulphur content). The content of mineral elements in coal ash and their oxides have been determined by using of X-ray spectrometry.

Thermogravimetric analysis was performed using Japanese HITACHI TG/DTA7300 instrument. The instrument was used to study the heat resistance of analytical coal samples and was tested in an argon gas environment at 25–1150 °С for 120 minutes at a heating rate of 10 °С/min.

Enrichment properties of Mogoin gol coal in laboratory conditions were determined by heavy liquid GOST 4790-93 method. During experimental, coal fraction of 3–1.5 mm was separated in heavy liquid that $ZnCl_2$ solution with different densities such as <1.3; 1.3–1.4; 1.4–1.5; 1.5–1.6; 1.6–1.7 and > 1.7 g/cm³. After that, washing and removing the submerged and floating fractions from the solution residue, determined their yield and ash content. Enrichment curves were constructed on the basis of enrichment results.

The pyrolysis experiments were performed in a laboratory quartz retort (tube) which could contain 1 g analytical coal sample. The retort was placed in a horizontal electric tube furnace with a maximum heating temperature of 950 °C. The pyrolysis experiments have been carried out at different heating temperatures 200–700 °C with constant heating rate 20 °C/min for 80 min.

The experiment of thermal decomposition (thermolysis) was carried out in air closed autoclave at 350–450 °C and using hydrogen donor solvent (tetraline) with different mass ratios of coal-solvent (1:1.75; 1:1.5) for 2 h. After cooling, all uncondensed

gas and liquid products were removed from hard residue using chloroform solvent in a Soxhlet apparatus. Then the yield of thermolysis products was calculated by the weight method.

RESULTS AND DISCUSSIONS

The proximate and ultimate analysis of the Mogoin gol coal was determined and the results are shown in Tab. 1.

From Tab. 1, the volatile matter of the Mogoin gol coal is $V^{daf} = 30.7\%$ and the carbon content is $C^{daf} = 76.5\%$ and these results show that, it is a coking coal (high rank coal). The infrared spectrum is mainly used to study different kind of functional groups in coal organic mass. Fig. 1 below shows the FTIR spectrum.

It can be seen from Fig. 1 that the Mogoin gol coal has several functional structures. The absorption intensity of hydroxyl at 3500 cm⁻¹ and absorption intensity at 1373 to 1604 cm⁻¹ totally indicate carboxylic groups. C–O bonds of alcohols, ethers, and esters take to adsorption at 1273 cm⁻¹. C–H bond of aromatic ring indicate band at 500–1033 cm⁻¹ and aliphatic –CH; –CH₂ and –CH₃ groups with

Table 1. Proximate and ultimate analysis of the Mogoin gol coal

Таблица 1. Экспресс- и окончательный анализ угля Могоин-гольского месторождения

W ^a , %	A ^d , %	V ^{daf} , %	Q, kcal/kg	C ^{daf} , %	H ^{daf} , %	S ^{daf} , %	(O+N) ^{daf} , %	H/C
0.62	10.59	30.67	7531.73	76.5	5.2	1.27	17.03	0.8

Table 2. The chemical composition of Mogoin gol coal ash, %

Таблица 2. Химический состав золы угля месторождения Могоин-гол, %

	Mg	Al	Si	P	K	Ca	Ti	Mn	Fe	Zn
Elements	2.2	11.2	2.6	0.2	0.4	4.7	0.2	0.3	34.2	0.1
Oxides	3.5	21.1	5.6	0.3	0.5	6.6	0.4	0.5	49.0	0.2

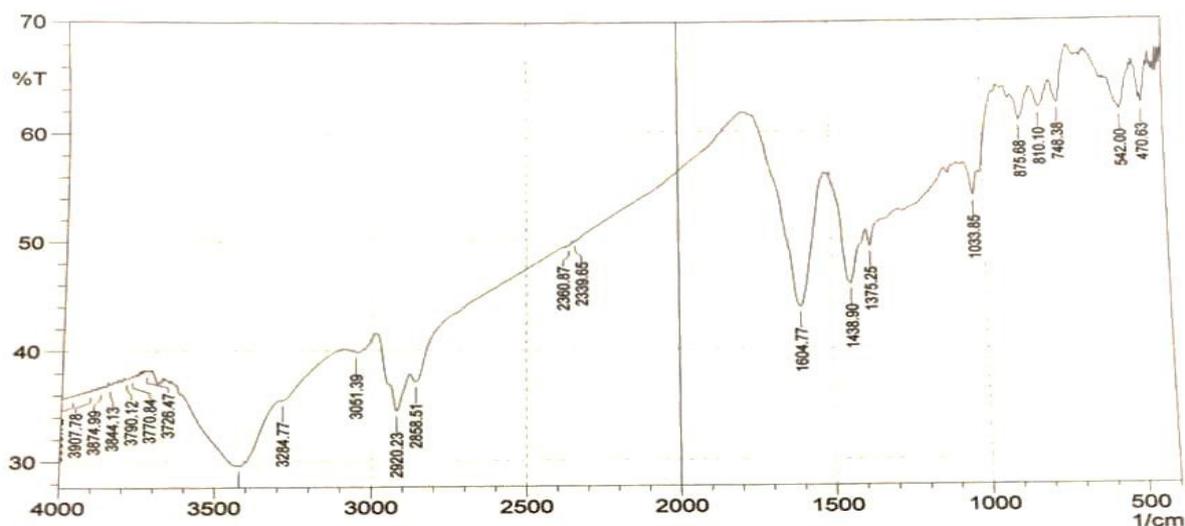


Fig. 1. The FTIR spectrum of Mogoin gol coal

Рис. 1. FTIR-спектр угля месторождения Могоин-гол

Table 3. The result of enrichment of Mogoin gol coal by heavy liquid method

Таблица 3. Результат обогащения Могоин-гольского угля тяжеложидкостным способом

Density, g/cm ³	Yield of fraction, γ%	Ash of fraction, A ^a , %	Total light fraction		Total heavy fraction	
			Yield, γ%	Ash, A ^a , %	Yield, γ%	Ash, A ^a , %
1.3	20.7	4.6	20.7	4.6	98.9	9.0
1.4	35.0	6.0	55.7	5.4	78.2	10.2
1.5	39.6	11.8	95.3	8.1	43.2	13.7
1.6	2.0	25.8	97.3	8.4	3.6	34.5
1.7 light	0.5	45.8	97.8	8.6	1.6	45.8
1.7 heavy	1.1	45.8	98.9	9.0	1.1	45.8

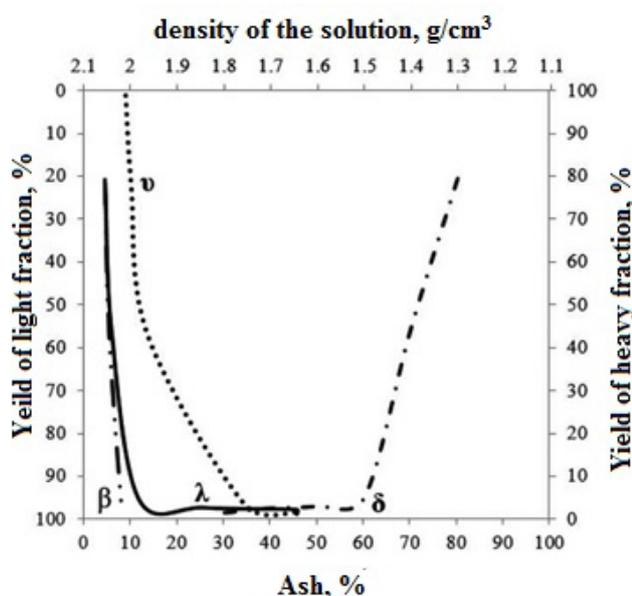


Fig. 2. Coal heavy liquid enrichment curve of 1.5–3 mm fraction:

β – light fraction curve; λ – elementary ash curve;
δ – density curve; u – heavy fraction curve

Рис. 2. Кривая обогащения угля фракцией 1,5–3 мм:
β – кривая легкой фракции; λ – элементарная кривая
зольности; δ – кривая плотности;
u – кривая тяжелой фракции

middle intensity at 1376–1456 cm⁻¹. The chemical composition of coal ash was studied by X-ray fluorescence spectrum and the results are shown in Tab. 2.

Tab. 2 shows that, the Mogoin gol coal ash has the highest content of iron oxide 49.0% and aluminum oxide 21.1%. The melting temperature of ash varies depending on the chemical composition of the coal ash. For example, as the SiO₂ content increases, ash melting temperature is increased.

The fraction of Mogoin gol coal with size 3–1.5 mm was enriched by using of zinc chloride (ZnCl₂) as a heavy liquid with a density of 1.3–1.7 g/cm³. The yields of fractions and ash content of fraction were determined, and the enrichment curve is constructed and shown as a result of enrichment in Tab. 3, 4 and Fig. 2.

The results in Tab. 3 show that enrichment

of Mogoin gol coal in zinc chloride solution with densities 1.3–1.4 g/cm³ show lower ash contents 4.6–6.0%, which is an optimal condition for the enrichment of the Mogoin gol coal.

According to Tab. 4 and Fig. 2, the concentrate's ash in a heavy liquid with a density of δ = 1.3 g/cm³ was low A_a = 4.6% and the yield was γ = 20.7%. As the density of the heavy liquid increases, the ash and yield of the concentrate tend to gradually increase. The tailing ash is A_a = 45.8%, the yield is low γ = 1.1%. The calculation of the yield and ash of the concentrated product using the enrichment quality curve (Tab. 2) shows that the yield of the Middling is γ = 2.5% and the ash is A = 29.4%. Therefore, if the average fractional yield of 1.5–3 mm coal is evaluated, T = 2.5%, which is the property good quality of enrichment. Therefore, sulfur content and calorific value were determined in concentrate and initial coal and shown Tab. 5.

The Tab. 5 above shows that the sulfur content of the concentrate decreased by 18% and the calorific value increased by 8% compared to the initial coal. In order to study the thermal stability and thermal decomposition mechanism of the organic mass of the Mogoin gol coal, the thermogravimetric analysis was performed in an argon gas environment and the TG and DTG curves were shown Fig. 3. The thermal stability indices T5%, T15%, T25% are calculated from the TG curve and are shown in Tab. 6.

From termogravimetric study, Mogoin gol coal ended 72.5% weight loss at 980 °C.

The TG curve of Mogoin gol consists of different temperature intervals (steps) such as 100–360; 360–470; 470–590; 590–980 °C. In the first step (until 360 °C) the weight loss is due to the release of some absorbed gas and moisture in coal.

In the second step at 360–470 °C, (TG – 85.3%, DTG – 84.8*10⁻³ mg/min) intensive thermal decomposition of the organic matter of the coal samples start forming liquid (tar and pyrolysis water) and gas products. In the third step at 550–850 °C, the weight loss strongly decreases, which is an indication for ending the thermal decomposition and starting carbonization and polymerization of the coal sample (TG – 79%, DTG – 24.4*10⁻³ mg/min). In the fourth step at 850–980 °C, the weight loss slowly

Table 4. Coal enrichment products yield, and its ash content

Таблица 4. Выход продуктов обогащения угля и его зольность

Products of heavy liquid	Yield, γ , %	Ash, A^a , %
Concentrate	95.3	8.1
Middling	2.5	29.4
Tailing	1.1	45.8

Table 5. The result of sulfur content and caloric value of concentrate and initial coal

Таблица 5. Сернистость и калорийность концентрата и исходного угля

Samples	Sulfur, S_t^d , %	Caloric value, Q^{daf} , kcal/kg
Concentrate	1.09	7971.15
Initial coal	1.27	7531.73

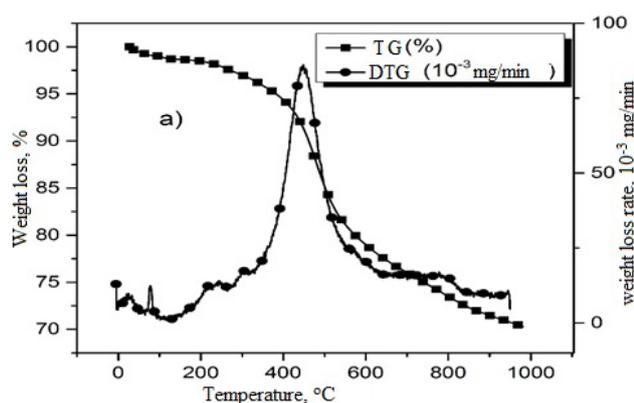


Fig. 3. The TG and DTG curves of Mogoin gol coal

Рис. 3. Термогравиметрические и дифференциальные термогравиметрические кривые угля месторождения Могоин-гол

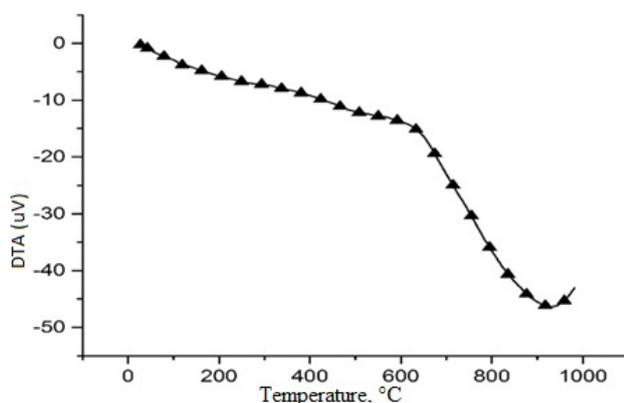


Fig. 4. DTA curve of Mogoin gol coal

Рис. 4. Кривая дифференциального термического анализа угля месторождения Могоин-гол

increases, which is related with the release of gas, e.g. CO_2 , H_2 , CO from the mineral matter of coal sample ($TG = 70.3\%$, $DTG = 10.2 \cdot 10^{-3} \text{ mg/min}$).

The calculated value of thermal stability indices: $T5\% = 382.2 \text{ }^\circ\text{C}$, $T15\% = 501.5 \text{ }^\circ\text{C}$, $T25\% = 740.0 \text{ }^\circ\text{C}$ from the TG curve (Tab. 6) show that Mogoin gol coal characterizes with much higher thermal stability than for example brown coals of lignite type.

To explain the mechanism of thermal decomposition of coal, let us consider the DTA curve that takes place during the thermal decomposition of coal obtained by thermogravimetric analysis (Fig. 4).

Shown at the DTA curve of the Mogoin gol coal, thermal decomposition is an endothermic process that Heat absorption took place at 400–980 and at 900 °C. The thermal stability of different types of solid fossil fuels, such as lignite and hard coal, varies, and the yield of semi-coking and pyrolysis products, such as thermal decomposition, is used to determine whether the coal is suitable for pyrolysis, liquefaction and gasification [19–20]. The yield and properties of the resulting product vary depending on the pyrolysis temperature and heating rate. In this part of the study, the results of pyrolysis experiment of Mogoin gol coal (200–700 °C) are shown in the following Tab. 6.

Experimental results show that when the heating temperature is low at 200–300 °C, the yield of liquid products, pyrolysis water, and gaseous products is low and when an increase in heating temperature, decreased in the solid residue yield and increase the yield of liquid and gaseous product. Maximum yield of liquid product is 6.28% at 700 °C. The results of the technical analysis of hard residue have been shown in Tab. 7.

According to the table above, the yield of volatile matter in pyrolysis hard residue is 16 times lower than the initial coal, and pyrolysis hard residue's yield is (71%) high and ash content down, so the coal is more suitable to produce high-quality smokeless fuel.

Hydrogen donor solvent tetraline was used in the thermolysis experiment. Coal and solvent (coal:solvent = 1: 1.5; 1: 1.75) were taken by mass ratio and tested in a standard laboratory autoclave made of stainless steel at 350, 400, 450 °C for 2 h and the results are shown in the Tab. 8.

According to the experiment, the conditions for the highest yield of liquid products were the carbon-solvent ratio of 1:1.5 at 450 °C. According to the thermolysis process, the yield of liquid products increases as the temperature increases, and when coal decomposition increases, the yield of solid residues decreased. This is due to the fact that, under the influence of high temperatures, the organic mass of coal is decomposed as much as possible and secondly, temperature is a key factor in generating free radicals, so free radicals from the decomposition of coal macromolecules react with donor solvents to increase liquid yield. Fig. 5 and 6 also shows the FTIR spectrum of the pyrolysis and thermolysis process liquid products.

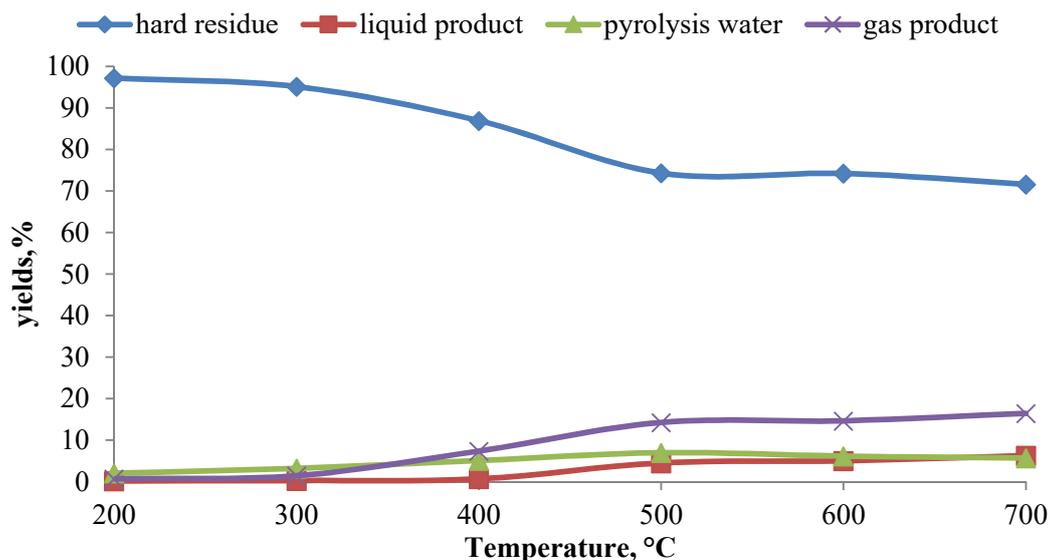


Fig. 5. The results of pyrolysis of Mogoin gol coal
Рис. 5. Результаты пиролиза угля месторождения Могоин-гол

Table 6. The thermal stability index of the Mogoin gol coal

Таблица 6. Показатель термической стабильности угля месторождения Могоин-гол

Heating Rate, °C/min	Thermal stability indices, °C		
	T _{5%}	T _{15%}	T _{25%}
10 °C/min	382.2	501.5	740.0

It can be seen from Fig. 6 A and B that the liquid products have similar functional structures but have different band absorption intensities. The absorption intensity of hydroxyl at 3404 cm⁻¹ significantly decreased in thermolysis liquid product. Ideally, hydrogen-bonded hydroxyl groups tend to be destroyed or broken during thermal treating processes [13]. The absorption intensity at 1707 cm⁻¹ totally came out in thermolysis and pyrolysis liquid products, indicating carboxylic groups. According to the literature, C–O bonds of alcohols, ethers, and esters start to decompose over 200 °C, thus the bands at 1273 cm⁻¹ are almost completely condensed after pyrolysis and thermolysis. The intensity of bands related to aliphatic hydrocarbon, including the vibration of aliphatic

Table 7. The results of the technical analysis of pyrolysis hard residue of Mogoin gol coal

Таблица 7. Результаты технического анализа твердого остатка пиролиза угля месторождения Могоин-гол

W ^a , %	A ^a , %	V ^a , %	V ^{daf} , %	Q ^{daf} , %
0.64	11.01	1.63	1.84	7882.20

methylene and methyl group content significantly. This intensity coincides with the fracture of aliphatic side chains to form methane or other light hydrocarbon gases. Therefore pyrolysis liquid product of Mogoin gol coal consists of mainly aliphatic, aromatic and aromatic-aliphatic compounds with above mentioned functional groups in their molecules.

Table 8. The thermolysis result of Mogoin gol coal

Таблица 8. Результат термолиза угля месторождения Могоин-гол

Ratio	Temperature, °C	Hard residue	Liquid product, %	Gaseous product, %
1:1.5	350	87.31	12.69	-
	400	34.53	59.39	3.92
	450	32.21	63.87	6.08
1:1.75	350	90.61	9.39	-
	400	47.59	48.84	3.57
	450	40.73	53.91	5.36

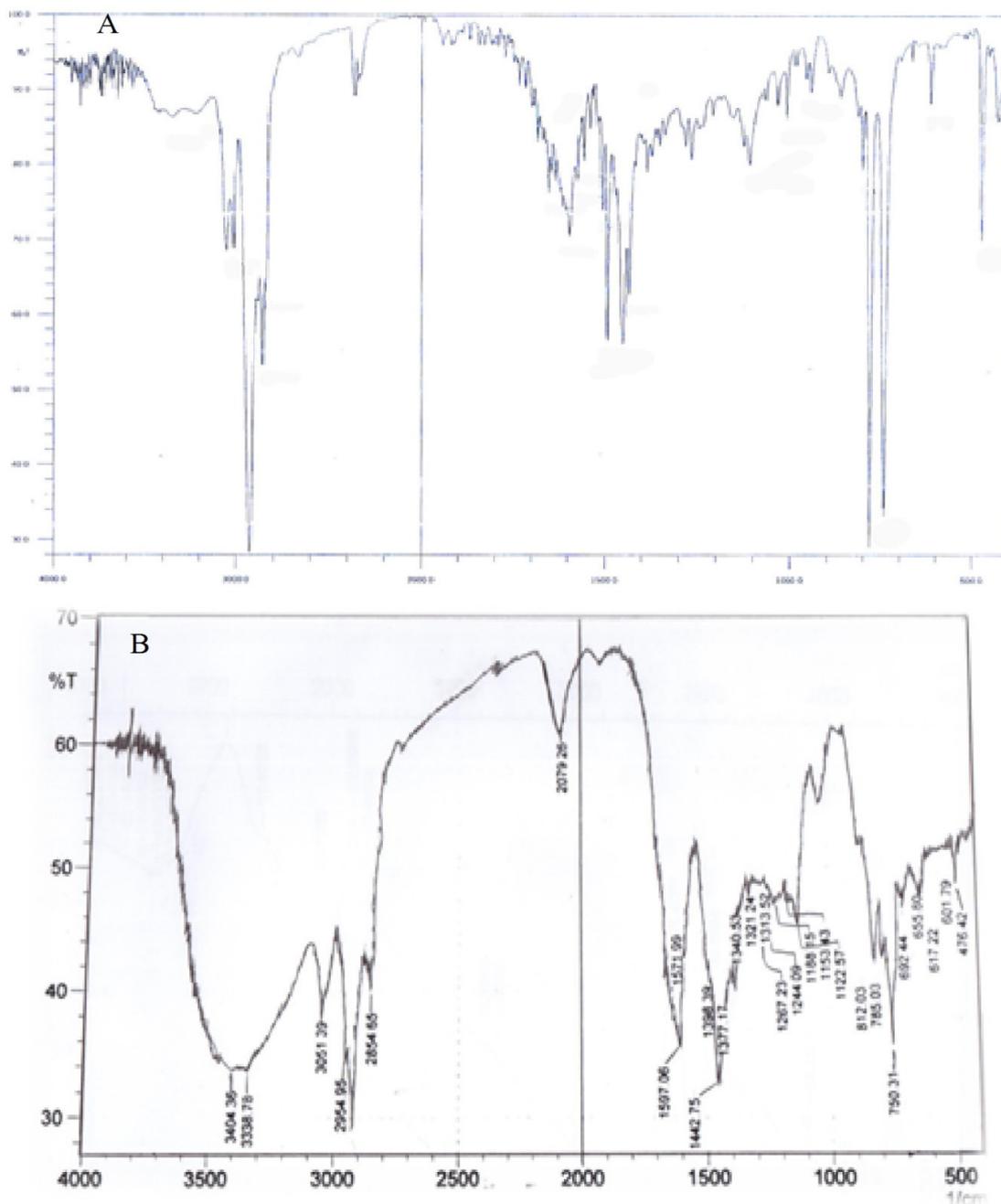


Fig. 6. FTIR spectrum: A – thermolysis liquid product; B – pyrolysis liquid product

Рис. 6. ИК-Фурье спектр: А – жидкий продукт термоллиза; В – жидкий продукт пиролиза

CONCLUSION

On the basis of proximate and ultimate analysis results, it has been confirmed that the coal of Mogoin gol deposit is a high rank coking coal. The ash content of concentrate of Mogoin gol coal is 1.5 times less than initial coal and is the result of good quality of enrichment.

Selecting the heating temperature regions and explaining the process taking place in each region, the thermal effects were recorded as endothermic at 25–100 °C, exothermic at 360–590 °C, and endothermic at 595–980 °C. The temperature value occurs is $T = 470\text{--}590$ °C. The calculated value of thermal stability indices: $T_{5\%} = 382.2$ °C, $T_{15\%} = 501.5$ °C,

$T_{25\%} = 740.0$ °C from the TG curve show that the Mogoin gol characterizes higher thermal stability than for example brown coals.

The pyrolysis process has a yield of 71% hard residue at 700 °C, low ash content and volatile matter yield, and high calorific value, which makes it possible to produce high quality smokeless fuel from Mogoin gol coal. As a result of the thermolysis experiment, coal (coal:solvent = 1:1.5) processed at 450 °C in a donor solvent tetraline with a high yield of 63.87%, the liquid product includes benzene and its derivatives and aliphatic-alkylated aromatic hydrocarbon compounds.

REFERENCES

1. Fetisova O. Yu., Kuznetsov P. N., Purevsuren B., Avid B. A kinetic study of the stepwise thermal decomposition of various coals from Mongolia. *Solid Fuel Chemistry*. 2021;55(1):1–7. <https://doi.org/10.3103/S0361521921010031>.
2. Widayat, Satriadi H., Wibawa L. P., Hanif G. F., Qomaruddin M. Oil and gas characteristics of coal with pyrolysis process. *AIP Conference Proceedings*. 2022;2453(1):020077. <https://doi.org/10.1063/5.0094759>.
3. Gu S., Xu Z., Ren Y., Tu Y., Sun M., Liu X. An approach for upgrading lignite to improve slurryability: blending with direct coal liquefaction residue under microwave-assisted pyrolysis. *Energy*. 2021;222:120012. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2021.120012>.
4. Gabriel G. F., Jheyaaseelan J. S., Kumaraguru D., Osman K., Hamzah N. H. Pyrolytic key indicators of burnt porcine tissue in the presence of petrol under outdoor conditions. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*. 2019;23(2):274–289. <https://doi.org/10.17576/mjas-2019-2302-12>.
5. Deng J., Li Q.-W., Xiao Y., Shu C.-M., Zhang Y.-N. Predictive models for thermal diffusivity and specific heat capacity of coals in Huainan mining area, China. *Thermochimica Acta*. 2017;656:101–111. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2017.09.005>.
6. Gross M. Closing the carbon cycle. *Current Biology*. 2014;24(13): R583-R585. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.06.051>.
7. Morgan T. J., Kandiyoti R. Pyrolysis of coals and biomass: analysis of thermal breakdown and its products. *Chemical Reviews*. 2014;114(3):1547–1607. <https://doi.org/10.1021/cr400194p>.
8. Jianfang J., Wang Q., Yingyu W., Weicjeng T. GC/MS analysis of coal tar composition produced from coal pyrolysis. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*. 2007;21(2):229–240. <https://doi.org/10.4314/bcse.v21i2.21202>.
9. Liu F.-J., Fan M., Wei X.-Y., Zong Z.-M. Application of mass spectrometry in the characterization of chemicals in coal-derived liquids. *Mass Spectrometry Reviews*. 2017;36(4):543–579. <https://doi.org/10.1002/mas.21504>.
10. Vasireddy S., Morreale B., Cugini A., Song C., Spivey J. J. Clean liquid fuels from direct coal liquefaction: chemistry, catalysis, technological status and challenges. *Energy & Environmental Science*. 2011;4(2):311–345. <https://doi.org/10.1039/C0EE00097C>.
11. Chen Z., Wu Y., Huang S., Wu S., Gao J. Coking behavior and mechanism of direct coal liquefaction residue in coking of coal blending. *Fuel*. 2020;280:118488. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.118488>.
12. Zhang L., Wei J., Wang J., Bai Y., Song X., Su W., et al. Deep insight into the ash fusibility and viscosity fluctuation behavior during co-gasification of coal and indirect coal liquefaction residue. *Fuel*. 2021;305:121620. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.121620>.
13. Song Y., Lei S., Li J., Yin N., Zhou J., Lan X. In situ FT-IR analysis of coke formation mechanism during Co-pyrolysis of low-rank coal and direct coal liquefaction residue. *Renewable Energy*. 2021;179:2048–2062. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2021.08.030>.
14. Shen Q., Wu H. Rapid pyrolysis of biochar prepared from slow and fast pyrolysis: the effects of particle residence time on char properties. *Proceedings of the Combustion Institute*. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.proci.2022.07.119>.
15. Lanzerstorfer C. Pre-processing of coal combustion fly ash by classification for enrichment of rare earth elements. *Energy Reports*. 2018;4:660–663. <https://doi.org/10.1016/j.egy.2018.10.010>.
16. Xian Y., Tao Y., Ma F., Zhou Y. The study of enhanced gravity concentrator for maceral enrichment of low-rank coal with heavy medium. *International Journal of Coal Preparation and Utilization*. 2021:1–17. <https://doi.org/10.1080/19392699.2021.2000403>.
17. Erdogdu A. E., Polat R., Ozbay G. Pyrolysis of goat manure to produce bio-oil. *Engineering Science and Technology, an International Journal*. 2019;22(2):452–457. <https://doi.org/10.1016/j.jestch.2018.11.002>.
18. Salas-Peregrin M., Carrasco-Marin F., Lopez-Garzon F., Moreno-Castilla C. Additions and corrections — adsorption of CO₂ on activated carbons from diluted ambient environments. *Energy & Fuels*. 1995;9(2):390. <https://doi.org/10.1021/ef00050a601>.
19. Mianowski A., Radko T. Thermokinetic analysis of coal pyrolysis process. *Journal of Thermal Analysis Calorim*. 1995;43:247–259. <https://doi.org/10.1007/BF02635992>.
20. Li Q.-W., Xiao Y., Wang C.-P., Deng J., Shu C.-M. Thermokinetic characteristics of coal spontaneous combustion based on thermogravimetric analysis. *Fuel*. 2019;250:235–244. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.04.003>.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

D. Batkhisig,
Master, Researcher,
Institute of Chemistry and Chemical Technology,
MAS,
4, Peace Ave., 13330, Bayanzurkh district,
Ulaanbaatar, Mongolia,
batkhisigee@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-24252846>

E. Shagjjav,
Master, Researcher,
Institute of Chemistry and Chemical Technology,

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Д. Батхшиг,
магистр, научный сотрудник,
Институт химии и химической технологии
Монгольской академии наук,
13330, г. Улан-Батор, пр-т Мира, корп. 4,
Монголия,
batkhisigee@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-24252846>

Э. Шагжав,
магистр, научный сотрудник,
Институт химии и химической технологии

MAS,
4, Peace Ave., 13330, Bayanzurkh district,
Ulaanbaatar, Mongolia,
eshagjjav19@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-3339-1477>

S. Batbileg,
Dr. Sci., Researcher,
Institute of Chemistry and Chemical
Technology, MAS,
4, Peace Ave., 13330, Bayanzurkh district,
Ulaanbaatar, Mongolia,
bilegsanjaa@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0001-8633-1553>

A. Ankhtuya,
Master, Researcher,
Institute of Chemistry and Chemical Technology,
MAS,
4, Peace Ave., 13330, Bayanzurkh district,
Ulaanbaatar, Mongolia,
ankhtuya36@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-0447-8461>

B. Purevsuren,
Dr. Sci., Academician, Head of the Laboratory,
Institute of Chemistry and Chemical Technology,
MAS,
4, Peace Ave., 13330, Bayanzurkh district,
Ulaanbaatar, Mongolia,
bpurevsuren.icct@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0001-7959-0645>

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.*

Information about the article

*The article was submitted 16.03.2022.
Approved after reviewing 14.09.2022.
Accepted for publication 15.09.2022.*

Монгольской академии наук,
13330, г. Улан-Батор, пр-т Мира, корп. 4,
Монголия,
eshagjjav19@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-3339-1477>

С. Батбилег,
доктор наук, научный сотрудник,
Институт химии и химической технологии
Монгольской академии наук,
13330, г. Улан-Батор, пр-т Мира, корп. 4,
Монголия,
bilegsanjaa@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0001-8633-1553>

А. Анхтуя,
магистр, научный сотрудник,
Институт химии и химической технологии
Монгольской академии наук,
13330, г. Улан-Батор, пр-т Мира, корп. 4,
Монголия,
ankhtuya36@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-0447-8461>

Б. Пуревсурен,
доктор наук, академик, заведующий
лабораторией,
Институт химии и химической технологии
Монгольской академии наук,
13330, г. Улан-Батор, пр-т Мира, корп. 4,
Монголия,
bpurevsuren.icct@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0001-7959-0645>

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.*

Информация о статье

*Поступила в редакцию 16.03.2022.
Одобрена после рецензирования 14.09.2022.
Принята к публикации 15.09.2022.*

Научная статья

УДК 541.64

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-471-478>



Исследование влияния природы пластификатора на свойства полимер-битумных композиций методом флуоресцентной микроскопии

Андрей Сергеевич Лукин*, Роман Георгиевич Житов**,
Виктор Владимирович Баяндин*, Нина Савельевна Шаглаева*

*Иркутский национальный исследовательский технический университет,

г. Иркутск, Российская Федерация

**ООО «Байкальский битумный терминал»,

г. Ангарск, Российская Федерация

Автор, ответственный за переписку: Шаглаева Нина Савельевна, shaglaevans@yandex.ru

Аннотация. Данная работа посвящена исследованию влияния природы пластификатора на свойства полимер-битумных композиций методом флуоресцентной микроскопии. На сегодняшний день нефтяные дорожные битумы для строительства автомобильных, мостовых и аэродромных покрытий не удовлетворяют предъявляемым к ним требованиям по трещиностойкости, теплостойкости, эластичности, адгезии к поверхности минеральных материалов. Введение в состав нефтяных дорожных битумов термоэластопластов, пластификаторов и поверхностно-активных веществ значительно повышает эксплуатационные свойства покрытия. Наилучшие результаты получены при использовании блоксополимера стирола и бутадиена, индустриального масла и катионного поверхностно-активного вещества на основе полиаминоамидов и полиаминоимидазолинов. Выбор в качестве пластификатора индустриального масла обусловлен хорошей совместимостью с битумом и полимером, а также высокой температурой вспышки – 200 °С. Содержание парафино-нафтеновых углеводородов в индустриальном масле больше 70%. Несмотря на большой объем производства индустриального масла, наблюдается острый дефицит этого продукта нефтехимии из-за широкого применения, поэтому интенсивно ведутся исследования по замене индустриального масла в составе сополимера полимерно-битумно вяжущего. В данной работе предложено использование в качестве пластификаторов при создании полимерно-битумного вяжущего тяжелого газойля, полученного при каталитическом крекинге и замедленном коксовании, тяжелой смолы пиролиза, экстракта селективной очистки масел, таллового масла. В этой связи исследовано влияние предложенных пластификаторов на коллоидную структуру полимерно-битумного вяжущего методом флуоресцентной микроскопии. Исходные полимерно-битумные вяжущие получены на предприятии АО «АНХК» (г. Ангарск) по ГОСТ Р 52056-2003 «Вяжущие полимерно-битумные дорожные на основе блоксополимеров типа стирол–бутадиен–стирол». Определен групповой состав исследуемых пластификаторов. Доказано, что для получения устойчивого к расслоению полимерно-битумного вяжущего требуются пластификаторы с содержанием ароматических соединений больше 60%.

Ключевые слова: полимерно-битумные вяжущие, флуоресцентная микроскопия, пластификатор, нефтяной дорожный битум, сополимер стирол–бутадиен–стирол

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 19-08-00342/19).

Для цитирования: Лукин А. С., Житов Р. Г., Баяндин В. В., Шаглаева Н. С. Исследование влияния природы пластификатора на свойства полимер-битумных композиций методом флуоресцентной микроскопии // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2022. Т. 12. N 3. С. 471–478. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-471-478>.

Original article

Study into the effect of plasticizer nature on the properties of polymer-bitumen compositions via fluorescence microscopy

Andrey S. Lukin*, Roman G. Zhitov**, Victor V. Bayandin*, Nina S. Shaglaeva*

*Irkutsk National Research Technical University, Irkutsk, Russian Federation

**LLC "Baikal bitumen terminal", Angarsk, Russian Federation

Corresponding author: Nina S. Shaglaeva, shaglaevans@yandex.ru

Abstract. The paper studies how the nature of the plasticizer affects the properties of polymer-bitumen compositions using the fluorescence microscopy. The current petroleum road bitumen used for the construction of road, bridge, and airfield pavements does not meet the requirements for cracking/heat resistance, elasticity, and adhesion to the mineral material surface. Pavement performance characteristics can be significantly improved by introducing thermoplastic elastomers, plasticizers, and surfactants into the composition of petroleum road bitumen. The best results were obtained when using a block copolymer of styrene and butadiene, industrial oil, and cationic surfactant on the basis of polyaminoamides and polyaminoimidazolines. The choice of industrial oil as a plasticizer is attributed to its good compatibility with bitumen and polymer, as well as its high flash point (200 °C). The content of paraffin-naphthenic hydrocarbons in industrial oil is over 70%. Although industrial oil is produced in large quantities, an acute shortage of this petrochemical product is observed due to its wide application; thus, intensive studies are underway to replace industrial oil in the composition of the polymer-bitumen binder. It is proposed to use heavy gas oil produced via catalytic cracking and delayed coking, heavy pyrolysis tar, solvent-extracted oil, and tall oil as plasticizers in the creation of the polymer-bitumen binder. In this connection, the effect of proposed plasticizers on the colloidal structure of the polymer-bitumen binder was studied using the method of fluorescence microscopy. Initial polymer-bitumen binders were produced at ANHK (Angarsk) according to GOST R 52056-2003 Polymer-Bitumen Road Binders Based on Styrene-Butadiene-Styrene-Type Block Polymers. The group composition of the plasticizers under study was determined. It was shown that in order to obtain a polymer-bitumen binder resistant to stratification, plasticizers having a content of aromatic compounds of over 60% are required.

Keywords: polymer-bitumen binders, fluorescence microscopy, plasticizer, petroleum bitumen, styrene-butadiene-styrene copolymer

Funding. This work was financially supported by the Russian Foundation for Basic Research (project 19-08-00342/19).

For citation: Lukin A. S., Zhitov R. G., Bayandin V. V., Shaglaeva N. S. Study into the effect of plasticizer nature on the properties of polymer-bitumen compositions via fluorescence microscopy. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2022;12(3):471-478. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-471-478>.

ВВЕДЕНИЕ

Эффективное развитие дорожной сети является стратегическим приоритетом для России, поэтому строительство дорожных, мостовых и аэродромных покрытий с высокими эксплуатационными характеристиками представляет собой актуальную проблему. Установлено, что применение в качестве связующих окисленных нефтяных битумов при производстве асфальтобетонов не обеспечивает необходимые требования к трещиностойкости, теплостойкости, эластичности, адгезии к поверхности минеральных материалов кислых пород и др. [1]. Повышение качества покрытий удастся достичь при использовании полимерно-битумных вяжущих (ПБВ), которые состоят из нефтяного дорожного битума (БНД), сополимера, пластификатора и поверхностно-активного

вещества (ПАВ). Полимерная матрица повышает температуру размягчения и вязкость ПБВ и придает продукту эластичные свойства. Наилучшие результаты получены при использовании блоксополимера на основе стирола и бутадиена (СБС) [2, 3]. ПАВ обеспечивают требуемую адгезию к минеральным материалам кислых пород. Пластифицирующие добавки должны понижать температуру хрупкости и не оказывать влияние на температуру размягчения ПБВ. В качестве пластификатора традиционно выбирают индустриальное масло, т. к. температура его вспышки выше 200 °С, кроме того, при 140–150 °С оно хорошо совмещается не только с битумом, но и с сополимером. Количество вводимого индустриального масла в ПБВ составляет от 5 до 20% [1–4]. Несмотря на большой объем его производства, наблюдается

острый дефицит этого продукта нефтехимии из-за широкого применения в качестве смазочных материалов в узлах трения трущихся деталей станков, прокатных и волочильных станов, прессов, гидросистем и другого подобного оборудования, поэтому интенсивно ведутся исследования по замене индустриального масла в составе ПБВ [5–9].

Целью данной работы является изучение методом флуоресцентной микроскопии структуры ПБВ на основе БНД 100/130, сополимера СБС марки SBS СН 1301-1Н и пластификатора различной структуры.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве пластифицирующих добавок были использованы промышленные продукты нефтехимической промышленности без дополнительной очистки: масло индустриальное И-40 в качестве эталона, тяжелый газойль, полученный при каталитическом крекинге (ТГКК) и замедленном коксовании (ТГЗК), тяжелая смола пиролиза (ТСП), экстракт селективной очистки масел (ЭСОМ), талловое масло сырое (ТМС). Полимерная матрица представляла собой сополимер марки SBS СН 1301-1Н, который относится к типу СБС-каучуков.

Групповой анализ выбранных пластифицирующих добавок (табл. 1) осуществляли методом тонкослойной хроматографии.

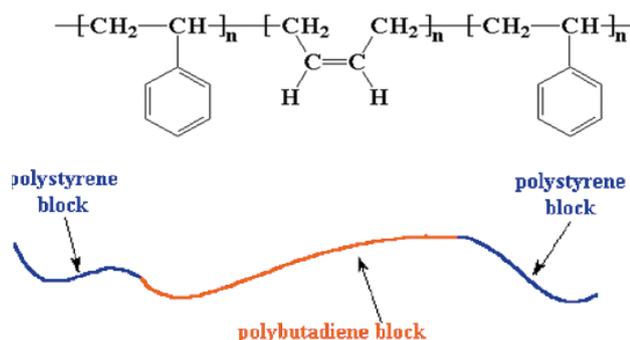
Плотность пластифицирующих добавок определяли с помощью пикнометра и ареометра, а значение условной вязкости – вискозиметрически по стандартной методике.

Изучение структуры ПБВ проводили на приборе Levenhuk MED PrO 600 Fluo (Levenhuk Inc., США).

Получение модифицированного ПБВ. К БНД добавляли рассчитанное количество сополимера СБС, пластифицирующей добавки (ПД) и при температуре 175 °С перемешивали в течение 6 ч, затем выдерживали 2 ч при комнатной температуре. Полученную смесь охлаждали в термостате до минус 40 °С и замороженное ПБВ раскалывали при помощи ножа, с образовавшейся свежесколотой поверхности откалывали небольшие фрагменты плоской формы и исследовали методом флуоресцентной микроскопии.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сополимер СБС относится к блоксополимеру и состоит из блоков стирола, разделенных блоками бутадиена:



Блоки, состоящие из полистирола и полибутадиена, цепляясь «хвостами» один к другому, образуют структуру, напоминающую сетку, которая обладает разными физическими свойствами. Полибутадиен сохраняет эластичность до минус 60 °С, а полистирольные части остаются жесткими вплоть до температуры стеклования полистирола (~100 °С). При этом каждая часть сополимера отвечает за эластичность в разном диапазоне температур, поэтому сополимер СБС обладает эластичными свойствами в широком температурном диапазоне. Образование таких структур в битуме при растворении в нем блоксополимера приводит к увеличению теплостойкости ПБВ в сравнении с исходным битумом¹ [10–12].

Из анализа литературных данных [13–19] можно заключить, что наиболее эффективными пластификаторами являются соединения с высоким содержанием смол и ароматических соединений, т. к. эти фракции способствуют растворению сополимера СБС в ПБВ и образованию однородной и устойчивой смеси. Результаты группового анализа, значения плотности и условной вязкости пластифицирующих добавок приведены в табл. 1. В исходном БНД количество ароматических соединений составляет 37%, а содержание смол равно 28%. Значения плотности исходного БНД и пластифицирующих добавок практически не отличаются и находятся в пределах 0,869–1,063 кг/м³. Величина условной вязкости БНД равна 253,6. Падение этой величины наблюдается от 15,4 до 2,7 в ряду ТМС→ЭСОМ→И-40→ТСП→ТГЗК→ТГКК. Количество смол варьируется в пределах от 76 до 4% и понижается в ряду ТМС→ТСП→И-40→ТГКК→ЭСОМ→ТГЗК. Следовательно, изменение условной вязкости пластифицирующих добавок не зависит от содержания смол в образцах.

Содержание ароматических соединений в пластификаторах уменьшается в ряду ТГКК→И-40→ТГЗК→ЭСОМ→ТСП→ТМС от 66 до 12%. Количество парафинов и нафтенов в пластификаторах понижается от 35 до 5%: ТГЗК→ЭСОМ→ТГКК→И-40→ТСП→ТМС. Нерастворимые фракции (в петролейном эфире) присутствуют в ТМС и ТСП и составляют 7 и 6% соответственно.

Предварительными экспериментами найдены оптимальные соотношения БНД (100/130), сополимера СБС (3%), ПАВ (0,2%) и пластификатора (12%). Проведено изучение полученных ПБВ методом флуоресцентной микроскопии в отсутствие пластифицирующих добавок и установлено, что в данной системе наблюдается расслоение БНД и сополимера (эксперимент 1, табл. 2).

Добавление эталонного пластификатора И-40 (эксперимент 2, см. табл. 2) благоприятно влияет на распределение сополимера, отдельные частицы, распределенные по всей системе, свидетельствуют о хорошем сопротивлении к расслоению. Смеси, приготовленные с ТГЗК (эксперимент 3, см. табл. 2) и ТСП (эксперимент 4, см. табл. 2), имеют равномерное распределение по всей системе при разном групповом составе, но очень близкое на-

хождение частиц, что говорит о возможном образовании больших частиц, которое должно привести к расслоению. Смеси, приготовленные с ТГКК (эксперимент 5, см. табл. 2) и ЭСОМ (эксперимент 6, см. табл. 2), имеют равномерное распределение по всей системе. Их влияние очень схоже с эталонным пластификатором И-40, что говорит о возможной замене И-40 на ЭСОМ или на ТГКК при получении ПБВ. ТМС в отличие от ТСП содержит большое количество смол, что приводит к плохому распределению полимера (эксперимент 7, см. табл. 2).

Таким образом, высокое содержание смол в ТГКК препятствует равномерному распределению

сополимера в ПБВ (эксперимент 5, см. табл. 2). Композиции, приготовленные с ТГЗК и ТСП, имеют равномерное распределение по всей системе, но следует учитывать очень близкое нахождение компонентов СБС, поэтому нельзя исключить агломеризацию частиц сополимера и, как следствие, расслоение ПБВ. Добавление пластифицирующих добавок И-40, ТГКК и ЭСОМ (эксперименты 2–4, см. табл. 2) в ПБВ приводит к равномерному распределению сополимера в БНД. Это означает, что пластифицирующие добавки ТГКК и ЭСОМ могут заменить индустриальное масло (эксперименты 3, 4, см. табл. 2).

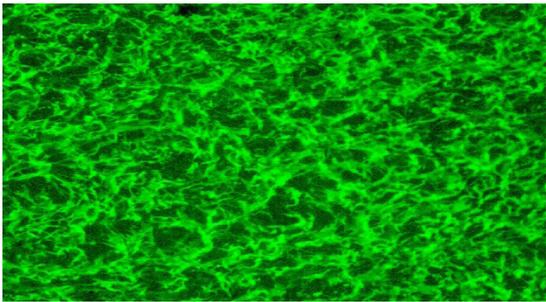
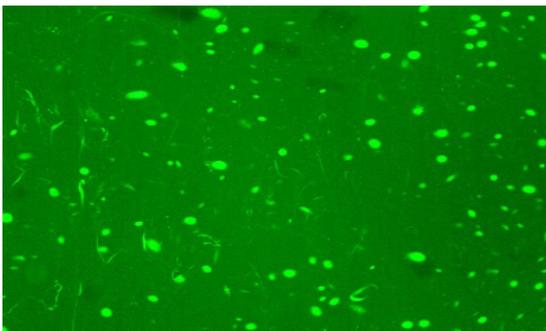
Таблица 1. Групповой анализ пластифицирующих добавок

Table 1. Group analysis of plasticizing additives

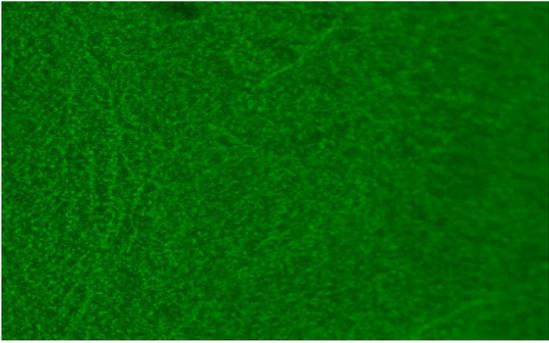
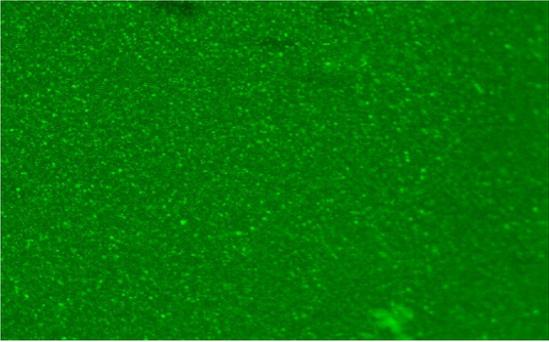
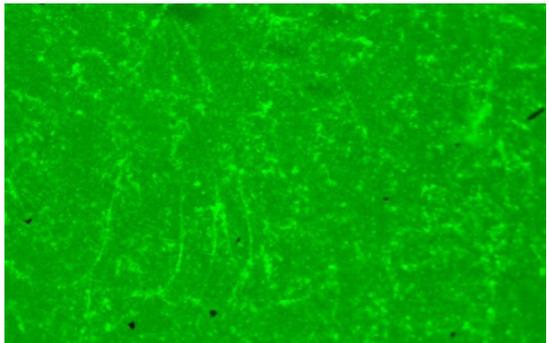
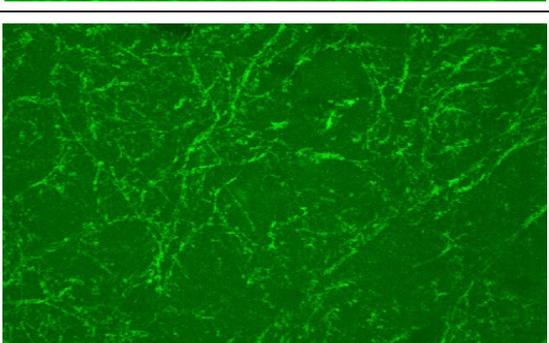
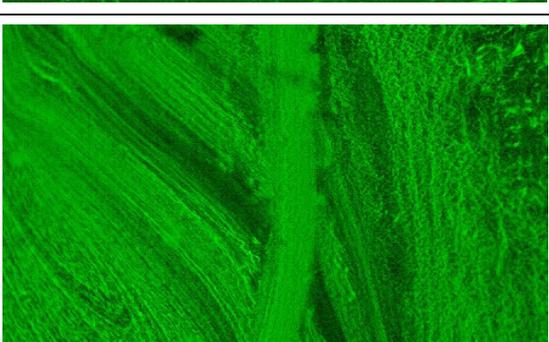
Продукт	Содержание ароматических соединений, %	Содержание парафинов и нафтенов, %	Содержание смол, %	Содержание фракций, нерастворимых в петролейном эфире, %	Плотность, г/см ³	Условная вязкость при 100 °С
БНД	37	12	28	23	0,984	253,6
И-40	64	16	20	0	0,869	10,2
ТГКК	66	27	7	0	0,971	2,7
ТГЗК	61	35	4	0	0,942	3,4
ТСП	55	15	24	6	1,063	4,5
ЭСОМ	60	34	6	0	0,926	11,2
ТМС	12	5	76	7	0,994	15,4

Таблица 2. Результаты метода флуоресцентной микроскопии

Table 2. Results of the fluorescence microscopy method

Номер эксперимента	Состав смеси	Флуоресцентные микрофотографии
1	БНД (100/130), ПАВ (0,2%), сополимер СБС (3%)	
2	БНД (100/130), ПАВ (0,2%), сополимер СБС (3%), пластификатор И-40 (12%)	

¹ Житов Р. Г. Получение и свойства полимер-битумных композитов: дис. ... канд. хим. наук. Иркутск, 2013. 121 с.

3	БНД (100/130), ПАВ (0,2%), сополимер СБС (3%), пластификатор ТГЗК (12%)	
4	БНД (100/130), ПАВ (0,2%), сополимер СБС (3%), пластификатор ТСП (12%)	
5	БНД (100/130), ПАВ (0,2%), сополимер СБС (3%), пластификатор ТГКК (12%)	
6	БНД (100/130), ПАВ (0,2%), сополимер СБС (3%), пластификатор ЭСОМ (12%)	
7	БНД (100/130), ПАВ (0,2%), сополимер СБС (3%), пластификатор ТМС (12%)	

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пластификаторы, содержащие смолы и нефтенные фракции, препятствуют равномерному распределению сополимера в композиции. Пластифицирующие добавки ТГКК и ЭСОМ, которые содержат ароматические соединения от 66 до 60%, способствуют равномерному распределению сополимера в БНД. Результаты метода флуоресцентной микро-

скопии при применении ТГКК и ЭСОМ сопоставимы с таковыми при использовании индустриального масла (И-40), и, следовательно, эти пластифицирующие добавки могут заменить индустриальное масло в составе ПБВ. Основной характеристикой исследованных пластифицирующих добавок для получения устойчивого ПБВ является содержание ароматических соединений больше 60%.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Гохман Л. М. Полимерно-битумные вяжущие материалы на основе СБС для дорожного строительства. М.: Информавтдор, 2002. 110 с.
2. Airey G. D. Fundamental binder and practical mixture evaluation of polymer modified bituminous materials // *International Journal of Pavement Engineering*. 2004. Vol. 5, no. 3. P. 137–151. <https://doi.org/10.1080/10298430412331314146>.
3. Polacco G. A review of the fundamentals of polymer-modified asphalts: asphalt/polymer interactions and principles of compatibility advances in colloid and interface science // *Advances in Colloid and Interface Science*. 2015. Vol. 224. P. 72–112. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.07.010>.
4. Gogoi R., Biligiri K. P., Das N. C. Performance prediction analyses of styrenebutadiene rubber and crumb rubber materials in asphalt road applications // *Materials and Structures*. 2016. Vol. 49, no. 9. P. 3479–3493. <https://doi.org/10.1617/s11527-015-0733-0>.
5. Karger-Kocsis J., Meszaros L., Barany T. Ground tyre rubber (GTR) in thermoplastics, thermosets, and rubbers // *Journal of Materials Science*. 2013. Vol. 48, no. 1. P. 1–38. <https://doi.org/10.1007/s10853-012-6564-2>.
6. Alonso S., Medina-Torres L., Zitzumbo R., Avalos F. Rheology of asphalt and styrene-butadiene blends // *Journal of Materials Science*. 2010. Vol. 45, no. 10. P. 2591–2597. <https://doi.org/10.1007/s10853-010-4230-0>.
7. Diab A. Studying viscosity of asphalt binders and effect of varied production temperatures on engineering properties of hot mix asphalt mixtures // *Canadian Journal of Civil Engineering*. 2016. Vol. 44, no. 1. P. 1–9. <https://doi.org/10.1139/cjce-2016-0383>.
8. Zhang F., Yu J., Wu S. Effect of ageing on rheological properties of storage-stable SBS/sulfur-modified asphalts // *Journal of Hazardous Materials*. 2010. Vol. 182, no. 1–3. P. 507–517. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.06.061>.
9. Airey G. D. Rheological properties of styrene butadiene styrene polymer modified road bitumens // *Fuel*. 2003. Vol. 82, no. 14. P. 1709–1719. [https://doi.org/10.1016/S0016-2361\(03\)00146-7](https://doi.org/10.1016/S0016-2361(03)00146-7).
10. Гохман Л. М., Гавриленко О. В. Влияние эластичности вяжущих на усталостную прочность полимерасфальтобетона // *Наука и техника в дорожной отрасли*. 2011. Т. 59. N4. С. 21–25.
11. Тюкилина П. М., Гуреев А. А. Закономерности влияния состава пластификатора на эластичность и когезионную прочность полимерно-битумных вяжущих // *Нефтепереработка и нефтехимия. Научно-технические достижения и передовой опыт*. 2018. N2. С. 12–16.
12. Гохман Л. М. Выбор полимера и приготовление ПБВ // *Автомобильные дороги*. 2016. N2. С. 55–61.
13. Петров К. Р., Дауров З. С., Тихонов Р. С. Проблемы и способы устройства дорожных покрытий на слабых основаниях // *Форум молодых ученых*. 2017. Т. 16. N12. С. 1448–1452.
14. Беляев П. С., Полушкин Д. Л., Макеев П. В., Фролов В. А. Модификация нефтяных дорожных битумов полимерными материалами для получения асфальтобетонных покрытий с повышенными эксплуатационными характеристиками // *Вестник Тамбовского государственного технического университета*. 2016. Т. 22. N2. С. 264–271. <https://doi.org/10.17277/vestnik.2016.02.pp.264-271>.
15. Plewa A., Belyaev P. S., Andrianov K. A., Zubkov A. F., Frolov V. A. The effect of modifying additives on the consistency and properties of bitumen binders // *Advanced Materials & Technologies*. 2016. No. 4. P. 35–40. <https://doi.org/10.17277/amt.2016.04.pp.035-040>.
16. Polacco G., Stastna J., Biondi D., Antonelli F., Vlachovicova Z., Zanzotto L. Rheology of asphalts modified with glycidylmethacrylate functionalized polymers // *Journal of Colloid and Interface Science*. 2016. Vol. 280, no. 2. P. 366–373. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.08.043>.
17. Abdullah M. E., Zamhari K. A., Shamshudin M. K., Mohd Rosli H., Idham M. K. Rheological properties of asphalt binder modified with chemical warm asphalt additive // *Advanced Materials Research*. 2013. Vol. 671. P. 1692–1699. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/amr.671-674.1692>.
18. Евдокимова Н. Г., Егорова Н. А., Султанова Д. П., Куннакулова Э. М., Сержкина Н. Г. Формирование золь-гелевой наноструктуры дорожных битумов методом подбора группового химического состава // *Нанотехнологии в строительстве*. 2019. Т. 11. N5. С. 512–525. <https://doi.org/10.15828/2075-8545-2019-11-5-512-525>.
19. Высоцкая М. А., Кузнецов Д. А., Литовченко Д. П., Барковский Д. В., Ширяев А. О. Пластификатор при производстве полимерно-битумных вяжущих — как необходимость // *Вестник Белгородского государственного технологического университета им. В. Г. Шухова*. 2019. N5. С. 16–22. https://doi.org/10.34031/article_5cd6df466bb9e0.32764094.

REFERENCES

1. Gokhman L. M. *Polymer-bitumen binders based on SBS for road construction*. Moscow: Informavtodor; 2002. 110 p. (In Russian).
2. Airey G. D. Fundamental binder and practical mixture evaluation of polymer modified bituminous materials. *International Journal of Pavement Engineering*. 2004;5(3):137–151. <https://doi.org/10.1080/10298430412331314146>.
3. Polacco G. A review of the fundamentals of polymer-modified asphalts: asphalt/polymer interactions and principles of compatibility advances in colloid and interface science. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2015;224:72–112. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.07.010>.
4. Gogoi R., Biligiri K. P., Das N. C. Performance prediction analyses of styrenebutadiene rubber and crumb rubber materials in asphalt road applications. *Materials and Structures*. 2016;49(9):3479–3493. <https://doi.org/10.1617/s11527-015-0733-0>.
5. Karger-Kocsis J., Meszaros L., Barany T. Ground tyre rubber (GTR) in thermoplastics, thermosets, and rubbers. *Journal of Materials Science*. 2013;48(1):1–38. <https://doi.org/10.1007/s10853-012-6564-2>.
6. Alonso S., Medina-Torres L., Zitzumbo R., Avalos F. Rheology of asphalt and styrene-butadiene blends. *Journal of Materials Science*. 2010;45(10):2591–2597. <https://doi.org/10.1007/s10853-010-4230-0>.
7. Diab A. Studying viscosity of asphalt binders and effect of varied production temperatures on engineering properties of hot mix asphalt mixtures. *Canadian Journal of Civil Engineering*. 2016;44(1):1–9. <https://doi.org/10.1139/cjce-2016-0383>.
8. Zhang F., Yu J., Wu S. Effect of ageing on rheological properties of storage-stable SBS/sulfur-modified asphalts. *Journal of Hazardous Materials*. 2010;182(1–3):507–517. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.06.061>.
9. Airey G. D. Rheological properties of styrene butadiene styrene polymer modified road bitumens. *Fuel*. 2003;82(14):1709–1719. [https://doi.org/10.1016/S0016-2361\(03\)00146-7](https://doi.org/10.1016/S0016-2361(03)00146-7).
10. Gokhman L. M., Gavrilenko O. V. Influence of binding agent elasticity on fatigue resistance of polymer-asphalt concrete. *Nauka i tekhnika v dorozhnoi otrasli = Science and Engineering for Highways*. 2011;59(4):21–25. (In Russian).
11. Tyukilina P. M., Gureev A. A. Regularities of influence of plasticizer composition on elasticity and cohesion strength of polymer-bitumen binders. *Neft-epenerabotka i neftekhimiya. Nauchno-tekhnicheskie dostizheniya i peredovoi opyt*. 2018;(2):12–16. (In Russian).
12. Gokhman L. M. Polymer selection and PMB preparation. *Avtomobil'nye dorogi*. 2016;(2):55–61.
13. Petrov K. R., Daurov Z. S., Tikhonov R. S. Problems and methods of road coverings construction on weak bases. *Forum molodykh uchenykh*. 2017;16(12):1448–1452. (In Russian).
14. Belyaev P. S., Polushkin D. L., Makeev P. V., Frolov V. A. Petroleum bitumen modified by polymer materials for asphalt concrete surfacing with improved operational performance. *Vestnik Tambovskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta = Transaction of the Tambov State Technical University*. 2016;22(2):264–271. (In Russian). <https://doi.org/10.17277/vestnik.2016.02.pp.264-271>.
15. Plewa A., Belyaev P. S., Andrianov K. A., Zubkov A. F., Frolov V. A. The effect of modifying additives on the consistency and properties of bitumen binders. *Advanced Materials & Technologies*. 2016;(4):35–40. <https://doi.org/10.17277/amt.2016.04.pp.035-040>.
16. Polacco G., Stastna J., Biondi D., Antonelli F., Vlachovicova Z., Zanzotto L. Rheology of asphalts modified with glycidymethacrylate functionalized polymers. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2004;280(2):366–373. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.08.043>.
17. Abdullah M. E., Zamhari K. A., Shamshudin M. K., Mohd Rosli H., Idham M. K. Rheological properties of asphalt binder modified with chemical warm asphalt additive. *Advanced Materials Research*. 2013;671:1692–1699. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/amr.671-674.1692>.
18. Evdokimova N. G., Egorova N. A., Sultanova D. P., Kunakulova E. M., Serezhkina N. G. The formation of the sol-gel nanostructures of road bitumen by selecting chemical group composition. *Nanotekhnologii v stroitel'stve = Nanotechnologies in Construction*. 2019;11(5):512–525. (In Russian). <https://doi.org/10.15828/2075-8545-2019-11-5-512-525>.
19. Vysotskaya M. A., Kuznecov D. A., Litovchenko D. P., Barkovskiy D. V., Shiryaev A. O. The need for a plasticizer in the production of polymeric-bitumen binders. *Vestnik Belgorodskogo gosudarstvennogo tekhnologicheskogo universiteta im. V. G. Shukhova = Bulletin of Belgorod State Technological University Named After V. G. Shukhov*. 2019;(5):16–22. (In Russian). https://doi.org/10.34031/article_5cd6df466bb9e0.32764094.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

А. С. Лукин,
аспирант,
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
lukin3095@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3679-4941>

Р. Г. Житов,
к.х.н., технический директор,
ООО «Байкальский битумный терминал»,
665806, г. Ангарск, 37-й квартал,
1-й промышленный массив, стр. 35,
zhitov@rambler.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6218-5619>

В. В. Баяндин,
к.т.н., доцент,
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
bayandinvv@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-0999-6313>

Н. С. Шаглаева,
д.х.н., профессор,
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
shaglaevans@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7889-0574>

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.*

Информация о статье

*Поступила в редакцию 06.10.2021.
Одобрена после рецензирования 15.02.2022.
Принята к публикации 15.09.2022.*

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Andrey S. Lukin,
Postgraduate Student,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
lukin3095@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3679-4941>

Roman G. Zhitov,
Cand. Sci. (Chemistry),
LLC "Baikal bitumen terminal",
35, First industrial area, 37th quarter, Angarsk,
665806, Russian Federation,
zhitov@rambler.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6218-5619>

Victor V. Bayandin,
Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
bayandinvv@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-0999-6313>

Nina S. Shaglaeva,
Dr. Sci. (Chemistry), Professor,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
shaglaevans@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7889-0574>

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.*

Information about the article

*The article was submitted 06.10.2021.
Approved after reviewing 15.02.2022.
Accepted for publication 15.09.2022.*

УДК 579.695

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-479-484>



Получение полигидроксиалканоата с помощью культуры *Pseudomonas helmanticensis* в нестерильных средах, содержащих глицерин и додецилсульфат натрия

Илья Николаевич Зубков*, Юрий Сергеевич Букин**,
Павел Николаевич Сорокоумов*, Сергей Михайлович Шишлянников*

*Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых добавок – филиал «ФНЦ Пищевых систем им. В. М. Горбатова» РАН, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

**Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск, Российская Федерация

Автор, ответственный за переписку: Зубков Илья Николаевич, zub-i@bk.ru

Аннотация. Получаемые биосинтетическим путем с помощью бактерий *Pseudomonas* поли-3-гидроксиалканоаты (ПГА) являются перспективной заменой традиционных пластиков. Снизить стоимость производства ПГА за счет уменьшения энергозатрат можно при использовании питательных сред, не прошедших паровую стерилизацию. Культивирование бактерий *Pseudomonas*, устойчивых к додецилсульфату натрия (SDS), на содержащих SDS нестерильных средах позволяет получить биомассу, состоящую преимущественно из продуцента ПГА. При этом SDS играет роль антимикробного агента, подавляющего рост посторонних микроорганизмов. В настоящей работе использовалась SDS-устойчивая культура *Pseudomonas helmanticensis* и среды, содержащие глицерин и SDS. Концентрации источников углерода (глицерин) и азота оптимизированы с помощью эксперимента, поставленного по центральному композиционному ротатабельному плану. Варьировались концентрация субстрата С и соотношение С/Н между содержанием в среде глицерина и источника азота. Построение зависимости степени конверсии субстрата в ПГА от С и С/Н проводилось в среде программирования R. Построенная модель адекватно описывает экспериментальные данные при уровне значимости 0,05 (дисперсия адекватности регрессионного уравнения $4,1 \times 10^{-2}$, $R^2=0,98$). Рассчитанная с помощью модели степень конверсии глицерина в ПГА составляет $6,9 \pm 0,4\%$. В оптимизированных условиях (0,61 г/л источника азота, 8,4 г/л глицерина, 96 ч) *P. helmanticensis* конвертирует 7,0% субстрата в ПГА со средней длиной мономерных звеньев. С помощью метагеномного анализа 16S рРНК показано, что доля посторонних бактерий при культивировании *P. helmanticensis* на нестерильной среде, содержащей 0,5 г/л SDS, составляет 2%.

Ключевые слова: *Pseudomonas helmanticensis*, полигидроксиалканоаты, культивирование в нестерильных средах, додецилсульфат натрия, глицерин

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования РФ (проект FGUS 2022-0003).

Для цитирования: Зубков И. Н., Букин Ю. С., Сорокоумов П. Н., Шишлянников С. М. Получение полигидроксиалканоата с помощью культуры *Pseudomonas helmanticensis* в нестерильных средах, содержащих глицерин и додецилсульфат натрия // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2022. Т. 12. N 3. С. 479–484. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-479-484>.

BRIEF COMMUNICATION

Preparation of polyhydroxyalkanoates using *Pseudomonas helmanticensis* in non-sterile media containing glycerol and sodium dodecyl sulfate

Ilya N. Zubkov*, Yurii S. Bukin**, Pavel N. Sorokoumov*, Sergey M. Shishlyannikov*

*All-Russian Research Institute for Food Additives, Branch of V. M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems (RAS), Saint Petersburg, Russian Federation

**Limnological Institute SB RAS, Irkutsk, Russian Federation

Corresponding author: Ilya N. Zubkov, zub-i@bk.ru

Abstract. Biosynthetically-produced *Pseudomonas poly-3-hydroxyalkanoates* (PHAs) are a promising substitute for conventional plastics. Costs involved with the production of PHAs can be reduced by optimizing power consumption, which can be achieved using nutrient media without preliminary steam sterilization. Cultivation of *Pseudomonas* bacteria resistant to sodium dodecyl sulfate (SDS) on SDS-containing non-sterile media yields a biomass consisting predominantly of a PHA producer. SDS plays the role of an antimicrobial agent that inhibits the growth of foreign microorganisms. In this work, an SDS-resistant culture of *Pseudomonas helmanticensis* and media containing glycerol and SDS were used. The concentrations of carbon (glycerol) and nitrogen sources were optimized using an experiment performed according to a central composite rotatable design. The concentration of substrate C and the C/N ratio between the glycerol and nitrogen content were varied. The dependence of the degree of substrate conversion in PHA on C and C/N was derived in the R programming environment. The constructed model adequately describes the experimental data at a significance level of 0.05 (adequacy variance of the regression equation 4.1×10^{-2} ; $R^2=0.98$). According to the constructed model, the conversion of glycerol to PHA equals $6.9 \pm 0.4\%$. Under optimized conditions (0.61 g/L nitrogen source; 8.4 g/L glycerol; 96 h), *P. helmanticensis* converts 7.0% of the substrate to PHA with an average monomer unit length. Using a 16S rRNA metagenomic assay, the proportion of foreign bacteria in *P. helmanticensis* cultures on non-sterile media containing 0.5 g/L SDS was shown to be 2%.

Keywords: *Pseudomonas helmanticensis*, polyhydroxyalkanoates, cultivation in non-sterile media, sodium dodecyl sulfate, glycerol

Funding. The work was financially supported by the Russian Ministry of Science and Higher Education (project FGUS 2022-0003).

For citation: Zubkov I. N., Bukin Yu. S., Sorokoumov P. N., Shishlyannikov S. M. Preparation of polyhydroxyalkanoates using *Pseudomonas helmanticensis* in non-sterile media containing glycerol and sodium dodecyl sulfate. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2022;12(3):479-484. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-479-484>.

ВВЕДЕНИЕ

Биополимеры обладают множеством преимуществ по сравнению с традиционными пластиками. Среди множества природных полимеров своими свойствами выделяются полигидроксиалканоаты (ПГА) – биоразлагаемые полиэфир, продуцируемые бактериями *Pseudomonas* [1]. ПГА являются перспективной заменой синтетических полимеров. Тем не менее высокая стоимость производства ПГА ограничивает их применение. Множество современных работ посвящено вопросу снижения стоимости ПГА за счет использования дешевых сред для культивирования [2–4]. Однако значительную часть издержек составляют энергозатраты на проведение паровой стерилизации сред. Избежать стерилизации иногда можно при использовании сред с высокой концентрацией солей [5, 6]. В некоторых случаях можно применять другую стратегию: использовать среды, содержащие сильный ионный детергент (например, доде-

цилсульфат натрия, SDS) и продуцент, устойчивый к этому детергенту. Добавление SDS в среду для культивирования в количестве десятых долей грамма на литр позволяет подавить рост нежелательных микроорганизмов, большинство из которых подвержены действию детергента [7]. Существуют бактерии *Pseudomonas*, способные к накоплению ПГА в присутствии до 5 г/л SDS [8]. Такие продуценты являются наиболее перспективными с учетом возможности их культивирования на нестерильных SDS-содержащих средах. В качестве источника углерода при получении ПГА часто используют глицерин, образующийся в больших количествах при производстве биотоплива [9]. Большое влияние на продуктивность биосинтеза ПГА оказывает концентрация источника азота: его дефицит активирует накопление клеткой запасных метаболитов. Ограничение по азоту считается общепризнанной стратегией максимизации выхода ПГА [10]. Наилучшим источником азота

для культивирования бактерий *Pseudomonas* являются соли аммония – сульфат или хлорид [11]. Так как на выход полимера наибольшее влияние оказывают концентрации источников углерода и азота, эти два параметра наиболее целесообразно оптимизировать по методу Бокса–Уилсона [12, 13]. В качестве факторов оптимизации используют, как правило, концентрацию субстрата и отношение концентраций источника углерода и азота [14].

Целью настоящей работы была разработка процесса препаративного получения ПГА при периодическом культивировании SDS-устойчивой культуры *P. helmanticensis* на средах, содержащих глицерин и 0,5 г/л SDS, которые не подвергались паровой стерилизации.

Результаты экспериментов по оптимизации выхода поли-3-гидроксиалканоата

Results of the optimization experiments

№	C	N	C/N	w	q _{РНА}	№	C	N	C/N	w	q _{РНА}
1	5 (-1)	1,00	5 (-1)	12	4,3	9				25	6,5
2	15 (+1)	3,00	5 (-1)	14	3,7	10				25	6,3
3	5 (-1)	0,33	15 (+1)	35	6,3	11	10 (0)	1,00	10 (0)	26	6,5
4	15 (+1)	1,00	15 (+1)	34	5,9	12				25	6,5
5	2,93 (-√2)	0,29	10 (0)	25	6,0	13				25	6,8
6	17,07 (+√2)	1,71	10 (0)	24	4,8						
7	10 (0)	3,41	2,93 (-√2)	9	3,3						
8	10 (0)	0,59	17,07 (+√2)	37	6,7						

Примечание. Уровни факторов приведены в скобках. C – концентрация глицерина (г/л), N – концентрация источника азота (г/л), w – содержание ПГА в биомассе (%), q_{РНА} – степень конверсии глицерина в ПГА (%).

KH₂PO₄·H₂O и 0,01 г/л MgSO₄. Содержание источника углерода (глицерин) и азота (смесь NH₄Cl и (NH₄)₂SO₄ в массовой пропорции 1:1) варьировалось согласно центральному композиционному ротатабельному плану эксперимента (табл.). Кислотность сред доводили до нейтрального значения (7,0) с помощью 1N раствора NaOH. По достижении культурой поздней стационарной фазы роста (96 ч после начала культивирования) биомассу отделяли центрифугированием (10 мин при 6800 × g) и высушивали. Выделение ПГА из сухой биомассы проводили по известной методике с помощью экстракции хлороформом и последующего осаждения полимера холодным этанолом [16].

Построение зависимости степени конверсии субстрата в ПГА от содержания глицерина (C) и отношения концентраций глицерина и источника азота (C/N) в среде осуществлялось в среде программирования R¹. Использовалась функция lm(). Адекватность модели оценивалась с помощью F-критерия Фишера.

Анализ мономерного состава полученного полимера проводился по методике [17], включающей стадии метанолиза образца (15% H₂SO₄

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектом исследований служила культура *P. helmanticensis*, выделенная из образца загрязненной почвы в Ленинградской области [15]. Культура хранится во Всероссийском научно-исследовательском институте пищевых добавок – филиале «ФНЦ Пищевых систем им. В. М. Горбатова» РАН.

Использованные в работе неорганические соли и глицерин имели степень чистоты analytical grade (Merck, Германия).

Выращивание инокулята (20 мл) и основное культивирование (100 мл) проводили в колбах Эрленмейера объемом 750 мл на шейкере-инкубаторе при температуре 28 °C и скорости перемешивания 250 об/мин. Все среды для культивирования содержали 0,5 г/л SDS, 3 г/л Na₂HPO₄·12H₂O, 2 г/л

в метаноле, 4 ч, 100 °C), экстракции аналитов и их анализа методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии на приборе Varian 450-GC (Varian, США), снабженном колонкой WCOT fused silica 50m×0,25mm ID Coating CP-Wax 58 (Varian, США), и масс-спектрометрическим детектором Varian 240-MS (Varian, США). Условия хроматографического разделения аналогичны описанным в работе [17]. Количественное определение мономеров ПГА осуществлялось с помощью внутреннего стандарта (2-гидроксибензойной кислоты).

Наличие посторонних бактерий при культивировании на нестерильной среде контролировалось с помощью метабаркодингового анализа образца ДНК, выделенного из культуры клеток на стационарной фазе роста. Фрагмент V3–V4 гена 16S рPHK был амплифицирован с помощью универсальных праймеров 343FL и 806R. Библиотеки для секвенирования по технологии Illumina MiSeq были подготовлены с помощью NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit (New England Biolabs, США). Расшифровка 16S рPHK проводилась на генетическом анализаторе MiSeq (Illumina, США) с использованием

¹R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing [Электронный ресурс]. URL: <https://www.R-project.org/> (17.03.22).

набора MiSeq Standard Kit v.3 (Illumina, США). Ампликоны анализировали с помощью программы Mothur v.1.47.0 по стандартной схеме MiSeq SOP [18]. Отфильтрованные последовательности были выровнены, сгруппированы и таксономически идентифицированы с использованием базы данных SILVA 123.

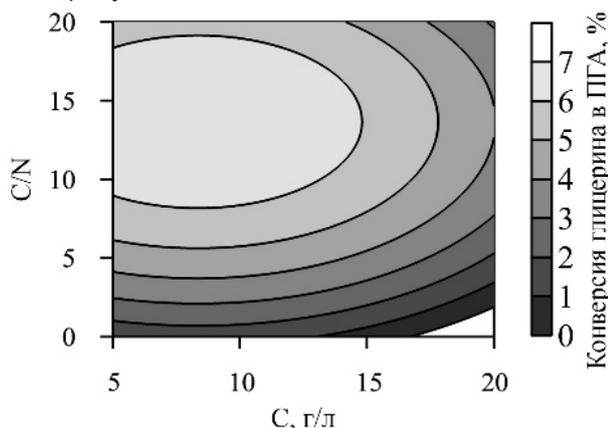
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты экспериментов по оптимизации концентраций источников углерода (С) и азота (N) приведены в таблице. На основе полученных данных построена функция (1), выражающая зависимость степени конверсии глицерина в ПГА (q_{PHA}) от концентраций субстрата (С) и соотношения (С/N).

$$q_{\text{PHA}}(\%) = 0,351C + 0,792C/N - 0,021C^2 - 0,029(C/N)^2, \quad (1)$$

где q_{PHA} – степень конверсии глицерина в ПГА, выраженная в процентах; С – концентрация глицерина (г/л); С/Н – отношение концентраций глицерина и источника азота.

Контурная карта полученной функции показана на рисунке.



Контурная карта функции зависимости степени конверсии глицерина в поли-3-гидроксиалканоат от концентраций глицерина (С) и отношения (С/Н)

Contour map of the dependence of glycerol conversion to PHA on glycerol concentration (C) and C/N ratio

Дисперсия воспроизводимости результатов эксперимента (рассчитана по культивированиям 9–13) составляет $3,1 \times 10^{-2}$, а дисперсия адекватности построенной регрессионной модели – $4,1 \times 10^{-2}$. Соответствующее значение F-критерия равно 1,3. Табличное значение F-критерия ($F_{\text{табл.}}(0,05; 5; 4) = 6,3$) превышает рассчитанное. Следовательно, при уровне значимости 0,05 построенная модель адекватно описывает экспериментальные данные. Наибольшая степень конверсии глицерина

в ПГА ($6,9 \pm 0,4\%$), согласно модели (1), должна наблюдаться при концентрациях субстрата 8,4 г/л и смеси солей аммония 0,61 г/л. Полуширина доверительного интервала данного значения (0,4%) рассчитана с помощью дисперсии воспроизводимости и критерия Стьюдента при уровне значимости 0,05. При культивировании *P. helmanticensis* в указанных условиях образуется 0,59 г/л ПГА (степень конверсии субстрата в продукт 7,0%).

Полученный в оптимизированных условиях (8,4 г/л глицерина; 0,61 г/л источника азота; 0,5 г/л SDS; время культивирования 96 ч) полимер состоит из остатков гидроксигексановой (7%), гидроксидекакановой (46%), гидроксидодекановой (25%) и гидроксидодекановой (25%) кислот, т. е. представляет собой образец ПГА со средней длиной мономерных звеньев (mcl-ПГА). Чистота выделенного образца полимера составляет около 99%.

Согласно результатам метагеномного анализа в сообществе, образующемся при культивировании *P. helmanticensis* в нестерильной среде, содержащей 8,4 г/л глицерина, 0,61 г/л источника азота и 0,5 г/л SDS, доля продуцента ПГА составляет 98%. Наличие SDS подавляет рост посторонних бактерий при культивировании *P. helmanticensis* в среде, содержащей глицерин. Это подавление усиливается биогенными детергентами, которые присутствуют в культурах бактерий *Pseudomonas* [19]. Совместное действие SDS (на стационарной фазе роста) и биодетергентов (в течение всего периода роста), обладающих антимикробной активностью [19], обеспечивает низкую долю посторонних микроорганизмов при культивировании *P. helmanticensis* в нестерильной среде.

ВЫВОДЫ

Использование сред, содержащих глицерин и 0,5 г/л SDS, позволяет проводить периодическое культивирование *P. helmanticensis* в нестерильных условиях. Оптимизированы параметры проведения биосинтетического получения ПГА с помощью *P. helmanticensis* в нестерильной SDS-содержащей среде. При уровне значимости 0,05 построенная модель адекватно описывает экспериментальные данные (дисперсия адекватности регрессионного уравнения $4,1 \times 10^{-2}$; $R^2 = 0,98$). Оптимальная концентрация глицерина составляет 8,4 г/л, а источника азота (смесь сульфата и хлорида аммония 1:1) – 0,61 г/л. В этих условиях *P. helmanticensis* накапливает 0,59 г ПГА на литр среды, степень конверсии глицерина в ПГА составляет 7,0% (предсказанная моделью величина – $6,9 \pm 0,4\%$). С помощью метагеномного анализа 16S рРНК было показано, что *P. helmanticensis* преобладает в культурах, полученных в нестерильных условиях.

REFERENCES

1. Junyu Z., Shishatskaya E. I., Volova T. G., da Silva L. F., Chen G.-Q. Polyhydroxyalkanoates (PHA) for therapeutic applications. *Materials Science and Engineering: C*. 2017;86:144-150. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.12.035>.

org/10.1016/j.msec.2017.12.035.

2. Ruiz C., Kenny S. T., Narancic T., Babu R., O' Connor K. Conversion of waste cooking oil into medium chain polyhydroxyalkanoates in a high cell density

fermentation. *Journal of Biotechnology*. 2019;306:9-15. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.08.020>.

3. Kumar M., You S., Beiyuan J., Tsang D. C. W., Luo G., Gupta J., et al. Lignin valorization by bacterial genus *Pseudomonas*: state-of-the-art review and prospects. *Bioresource Technology*. 2021;320:124412. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124412>.

4. Mannina G., Presti D., Montiel-Jarillo G., Carra J., Suarez-Ojeda M. E. Recovery of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from wastewater: a review. *Bioresource Technology*. 2020;297:122478. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.037>.

5. Marang L., van Loosdrecht M. C. M., Kleerebezem R. Combining the enrichment and accumulation step in non-axenic PHA production: cultivation of *Plasticumulans acidivorans* at high volume exchange ratios. *Journal of Biotechnology*. 2016;231:260-267. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.06.016>.

6. Tan D., Xue Y.-S., Aibaidula G., Chen G.-Q. Unsterile and continuous production of polyhydroxybutyrate by *Halomonas* TD01. *Bioresource Technology*. 2011;102(17):8130-8136. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.05.068>.

7. Johnston M. D., Simons E.-A., Lambert R. J. W. One explanation for the variability of the bacterial suspension test. *Journal of Applied Microbiology*. 2000;88(2):237-242. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00951.x>.

8. Nepomnyashchiy A. P., Shishlyannikov S. M., Shpironok O. G., Alekseeva A. A., Zubkov I. N., Sitnov V. Yu. Soil SDS-degrading bacterium *Pseudomonas helmanticensis* as a potential producer of polyhydroxyalkanoates. In: *Current trends of agricultural industry in global economy: XIX International Scientific and Practical Conference*. Kemerovo, 2021. p. 182-189. <https://doi.org/10.32743/agri.gl.econ.2020.182-189>.

9. Poblete-Castro I., Wittmann C., Nike P. I. Biochemistry, genetics and biotechnology of glycerol utilization in *Pseudomonas* species. *Microbial Biotechnology*. 2020;13(1):32-53. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13400>.

10. Sabapathy P. C., Devaraj S., Meixner K., Anburajan P., Kathirvel P., Ravikumar Y., et al. Recent developments in polyhydroxyalkanoates (PHAs) production in the past decade – a review. *Bioresource Technology*. 2020;306:123132. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123132>.

11. Saranya V., Shenbagarathai R. Effect of nitrogen and calcium sources on growth and production of PHA of *Pseudomonas* sp. LDC-5 and its mutant. *Current Research Journal of Biological Sciences*. 2010;2(3):164-167.

12. Ojhaa N., Das N. A statistical approach to

optimize the production of polyhydroxyalkanoates from *Wickerhamomyces anomalus* VIT-NN01 using response surface methodology. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018;107:2157-2170. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.089>.

13. Zain N. F. M., Paramasivam M., Tan J. S., Lim V., Lee C. K. Response surface methodology optimization of polyhydroxyalkanoate (PHA) production by *Burkholderia cepacia* BPT1213 using waste glycerol from palm oil based biodiesel production. *Biotechnology Progress*. 2021;37(1):e3077. <https://doi.org/10.1002/btpr.3077>.

14. Pokoj T., Klimiuk E., Ciesielski S. Interactive effect of crude glycerin concentration and C:N ratio on polyhydroxyalkanoates accumulation by mixed microbial cultures modelled with response surface methodology. *Water Research*. 2019;156:434-444. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.03.033>.

15. Zubkov I. N., Nepomnyshchiy A. P., Kondratyev V. D., Sorokoumov P. N., Sivak K. V., Ramsay E. S., et al. Adaptation of *Pseudomonas helmanticensis* to fat hydrolysates and SDS: fatty acid response and aggregate formation. *Journal of Microbiology*. 2021;59(11):1104-1111. <https://doi.org/10.1007/s12275-021-1214-5>.

16. Rebocho A. T., Pereira J. R., Freitas F., Neves L. A., Alves V. D., Sevrin C., et al. Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas citronellolis* grown in apple pulp waste. *Applied Food Biotechnology*. 2019;6(1):71-82. <http://dx.doi.org/10.22037/afb.v6i1.21793>.

17. Kondratyev V. D., Goryacheva D. I., Nepomnyashchiy A. P., Zubkov I. N., Shishlyannikov S. M., Sorokoumov P. N. Quantitative analysis of medium-chain polyhydroxyalkanoates in bacterial cells via gas chromatography-mass spectrometry: classical method revision and optimization. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*. 2022;27(1):32-42. <https://doi.org/10.1080/1023666X.2021.1992581>.

18. Kozich J. J., Westcott S. L., Baxter N. T., Highlander S. K., Schloss P. D. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Applied and Environmental Microbiology*. 2013;79(17):5112-5120. <https://doi.org/10.1128/AEM.01043-13>.

19. Schlüsselhuber M., Godard J., Sebban M., Bernay B., Garon D., Seguin V., et al. Characterization of milkisin, a novel lipopeptide with antimicrobial properties produced by *Pseudomonas* sp. UCMA 17988 isolated from bovine raw milk. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9:1030. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01030>.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

И. Н. Зубков,
младший научный сотрудник,
Всероссийский научно-исследовательский
институт пищевых добавок – филиал «ФНЦ
Пищевых систем им. В. М. Горбатова» РАН,

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Ilya N. Zubkov,
Junior Researcher,
All-Russian Research Institute for Food Additives,
Branch of V. M. Gorbатов Federal Research Center
for Food Systems RAS,

191014, г. Санкт-Петербург, Литейный пр., 55,
Российская Федерация,
zub-i@bk.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6533-8139>

Ю. С. Букин,
к.б.н., старший научный сотрудник,
Лимнологический институт СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3,
Российская Федерация,
bukinyura@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4534-3846>

П. Н. Сорокоумов,
научный сотрудник,
Всероссийский научно-исследовательский
институт пищевых добавок – филиал «ФНЦ
Пищевых систем им. В. М. Горбатова» РАН,
191014, г. Санкт-Петербург, Литейный пр., 55,
Российская Федерация,
sorokoumov_pavel@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8767-3720>

С. М. Шишлянников,
к.б.н., старший научный сотрудник,
Всероссийский научно-исследовательский
институт пищевых добавок – филиал «ФНЦ
Пищевых систем им. В. М. Горбатова» РАН,
191014, Санкт-Петербург, Литейный пр., 55,
Российская Федерация,
sershilin@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-6377-7445>

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.*

Информация о статье

Поступила в редакцию 05.05.2022.
Одобрена после рецензирования 06.09.2022.
Принята к публикации 15.09.2022.

55, Liteinyi Ave., St. Petersburg, 191014,
Russian Federation,
zub-i@bk.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6533-8139>

Yurii S. Bukin,
Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Limnological Institute SB RAS,
3, Ulan-Batorskaya St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
bukinyura@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4534-3846>

Pavel N. Sorokoumov,
Researcher,
All-Russian Research Institute for Food Additives,
Branch of V. M. Gorbato Federal Research Center
for Food Systems (RAS),
55, Liteinyi Ave., St. Petersburg, 191014,
Russian Federation,
sorokoumov_pavel@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8767-3720>

Sergey M. Shishlyannikov,
Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
All-Russian Research Institute for Food Additives,
Branch of V. M. Gorbato Federal Research Center
for Food Systems (RAS),
55, Liteinyi Ave., St. Petersburg, 191014,
Russian Federation,
sershilin@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-6377-7445>

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.*

Information about the article

The article was submitted 05.05.2022.
Approved after reviewing 06.09.2022.
Accepted for publication 15.09.2022.

УДК 631.811.98

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-485-490>



Влияние протатранов на физиологические параметры яровой пшеницы при хлоридном засолении

Анатолий Владимирович Поморцев*, Николай Владимирович Дорофеев*, Сергей Николаевич Адамович**, Елизавета Николаевна Оборина**

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

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

Автор, ответственный за переписку: Дорофеев Николай Владимирович, nikolay.v.dorofeev@gmail.com

Аннотация. В современном сельскохозяйственном производстве для управления посевами полевых культур, снижения отрицательного влияния абиотических факторов среды, повышения продуктивности и качества продукции используют химические соединения – аналоги эндогенных фитогормонов. Физиологическая ценность ряда этих веществ обусловлена способностью увеличивать устойчивость растений к неблагоприятным факторам среды. Повышенный интерес к подобным препаратам связан с их невысокой стоимостью и эффективностью в низких концентрациях. Изучено влияние смеси протатранов (а, b, с) в низких концентрациях (10^{-6} и 10^{-9} г/л) на изменение физиологических параметров (ростовые характеристики, водный статус) яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в условиях хлоридного засоления. Растения выращивали в лабораторных условиях в камере CLF PlantClimatics, где необработанные и обработанные химическими соединениями семена яровой пшеницы оценивали по изменению морфологических и физиологических показателей в условиях солевого стресса (150 mM NaCl). Анализ полученных данных показал, что протатраны положительно влияют на морфометрические параметры и водный статус растений при действии хлоридного засоления. Так, исследуемые вещества уменьшают ингибирование ростовых процессов при хлоридном засолении. Обработка семян исследуемыми веществами приводит к увеличению оводненности тканей и уменьшению падения осмотического потенциала в листьях и корнях. Химические соединения протатраны, независимо от соотношения смеси, способствуют улучшению водного режима растений и смягчают отрицательное действие хлоридного засоления на рост растений.

Ключевые слова: пшеница, хлоридное засоление, протатраны, осмотический потенциал

Благодарности. Исследования проводились на оборудовании ЦКП «Биоаналитика» с коллекцией ЦКП «Биоресурсный центр» Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН и на оборудовании Байкальского аналитического центра коллективного пользования СО РАН.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке государственного контракта (АААА-А16-116112510004-0).

Для цитирования: Поморцев А. В., Дорофеев Н. В., Адамович С. Н., Оборина Е. Н. Влияние протатранов на физиологические параметры яровой пшеницы при хлоридном засолении // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2022. Т. 12. N 3. С. 485–490. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-485-490>.

BRIEF COMMUNICATION

Effect of protatranes on the physiological parameters of spring wheat under chloride salinity conditions

Anatolii V. Pomortsev*, Nikolai V. Dorofeev*, Sergey N. Adamovich**, Elizaveta N. Oborina**

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

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

Corresponding author: Nikolai V. Dorofeev, nikolay.v.dorofeev@gmail.com

Abstract. In order to manage field crop production, reduce the negative impact of abiotic factors, and increase productivity and product quality, the modern agricultural industry uses chemical compounds analogous to endogenous phytohormones. Some of these substances are physiologically valuable due to their capability to improve the resistance of plants to adverse environmental factors. The increased interest in such preparations can be attributed to their low cost and effectiveness at low concentrations. The effect of a protatrane mixture (a, b, c) on changes in the physiological parameters (growth characteristics; water status) of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) was studied at low concentrations (10^{-6} and 10^{-9} g/L) under chloride salinity conditions. The plants were grown under laboratory conditions in a CLF PlantClimatics chamber, in which untreated and chemically treated spring wheat seeds were evaluated for changes in morphological and physiological parameters under salt stress conditions (150 mM NaCl). The analysis of obtained data revealed that protatranes have a positive effect on the morphometric parameters and water status of plants under chloride salinity conditions. Thus, the examined substances decrease the inhibition of growth processes under chloride salinity conditions. The treatment of seeds with the studied substances increases the tissue water content while decreasing the osmotic potential drop in leaves and roots. Irrespective of the mix ratio, protatranes help to improve the plant water status and mitigate the negative effects of chloride salinity on plant growth.

Keywords: wheat, chloride salinity, protatranes, osmotic potential

Acknowledgements. The studies were carried out on the equipment of the Center for Collective Use "Bioanalytics" with the collection of the Center for Collective Use "Bioresource Center" of the Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences and on the equipment of the Baikal Analytical Center for Collective Use of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences.

Funding. The work was supported by the state contract (AAAA-A16-116112510004-0).

For citation: Pomortsev A. V., Dorofeev N. V., Adamovich S. N., Oborina E. N. Effect of protatranes on the physiological parameters of spring wheat under chloride salinity conditions. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2022;12(3):485-490. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-485-490>.

ВВЕДЕНИЕ

Адаптация растений к неблагоприятным факторам среды (засоление) сопровождается метаболическими изменениями, которые приводят к накоплению веществ для защиты клеточных структур и процессов, для поддержания ионного гомеостаза, уменьшения свободных радикалов, экспрессии определенных белков, регуляции их генов и индукции фитогормонов [1–3]. Фитогормоны – это соединения, которые контролируют многие физиологические и биохимические процессы в растениях [2, 5]. Они играют жизненно важную роль в реакции растений на абиотический стресс и имеют решающее значение для модулирования физиологических реакций, способствующих адаптации к неблагоприятным условиям окружающей среды [6–8]. Получено много данных о действии синтетических соединений, положительно влияющих на рост и развитие растений и повышающих их устойчивость к неблагоприятным факторам внешней среды [9]. Особый интерес вызывают доступные и недорогие

аналоги фитогормонов – арилхалькогенилацетаты трис(2-гидроксиэтил)аммония, так называемые протатраны, которые в крайне низких концентрациях оказались мощными биостимуляторами различных биологических процессов [10]. Во-первых, объединение 2-х биологических активных компонентов (арилхалькогенилсульфоновых кислот и аминоспиртов) в одной молекуле обеспечивает их синергетический эффект [11]. Во-вторых, уникальная структура атранов, в частности протатранов, обеспечивает легкую химическую адсорбцию на поверхности биологических мембран и дальнейшее проникновение в клетку [12]. Цель исследования состояла в изучении влияния протатранов на физиологические процессы яровой пшеницы при хлоридном засолении.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В исследованиях использовали семена пшеницы сорта Новосибирская 29. На основании предварительных данных [4] обработку семян прово-

дили смесью протатранов (рис. 1), а именно веществом (CP1) и веществом (CP2) в концентрациях 10⁻⁶ и 10⁻⁹ г/л соответственно. Вещество CP1 представляет собой смесь a+b+c (соотношение 1:1:10 соответственно), вещество CP2 – смесь a+b+c (соотношение 10:1:1 соответственно).

Для определения морфометрических параметров (длины растений и корней) в каждой биологической повторности проводили по 50 независимых измерений. Относительное содержание воды измеряли согласно Р. Э. Смарту и Г. Э. Бингхэму [13]. Осмолярность сока (с) определяли с помощью осмометра ОМКА 1Ц-01 (НПО «Медлабортехника», Россия) и переводили в МПа по формуле: Ψ_s (МПа) = $-c \times 2,58 \times 10^{-3}$ по уравнению Вант-Гоффа [14]. Все экспериментальные данные были подвергнуты статистическому анализу с использованием SigmaPlot для Windows 14.0.

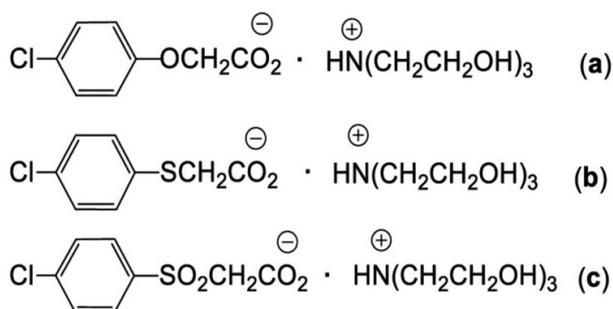


Рис. 1. Структура исследуемых веществ
 Fig. 1. Structure of investigated substances

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ полученных данных показал, что рост надземной части и корней яровой пшеницы значительно снижался на 35 и 67% под действием NaCl (150 mM) по сравнению с контролем (табл. 1). Применение веществ CP1 и CP2 для обработки семян статистически значимо снижало ингибирующее действие засоления NaCl на рост как надземной части растений (23%), так и корней (55%). Положительное действие ростовых веществ на ослабление влияния солевого стресса на рост растений было показано другими исследователями на примере индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) [15, 16]. Было предположено, что экзогенное добавление ИУК компен-

сировало ее недостаток, возникающий из-за засоления [17].

Данные представлены в виде $M \pm SD$ ($n=4$). К – необработанные семена (контроль); К+CP1 – семена, обработанные веществом №1 без стресса; К+CP2 – семена, обработанные веществом №2 без стресса; Х3 – необработанные семена при действии 150 mM NaCl (стресс); Х3+CP1 – семена, обработанные веществом №1 при стрессе; Х3+CP2 – семена, обработанные веществом №2 при стрессе. Различными надстрочными буквами показаны статистически значимые различия при $P \leq 0,05$ (метод Дункана), одинаковые буквы демонстрируют отсутствие различий.

Воздействие солевого стресса достоверно снижало осмотический потенциал в листьях и корнях (рис. 2, С), а также относительное содержание воды (рис. 2, А) в этих органах по сравнению с контролем. Применение синтетических веществ CP1 и CP2 (обработка семян) при хлоридном засолении способствовало меньшему падению осмотического потенциала (рис. 2, D) и нормализации содержания воды (рис. 2, В) в тканях надземной и корневой частей растений.

Следует отметить, что у растений, выращенных из семян, обработанных тестируемыми веществами и не подвергаемых стрессу хлоридным засолением, относительное содержание воды и осмотический потенциал в корнях и листьях не отличались от контрольных растений. Способность веществ CP1 и CP2 снижать падение осмотического потенциала, возможно, обусловлена регуляцией клеточных транспортных систем, обеспечивающих трансмембранный транспорт ионов натрия и калия [18, 19]. Аналогичная реакция при обработке листьев пшеницы brassinosterоидами в период засоления показана в работе А. Касима и др. [20].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных лабораторных исследований о влиянии протатранов в микроконцентрациях (10⁻⁶ и 10⁻⁹ г/л) на устойчивость яровой пшеницы к хлоридному засолению установлено следующее:

– обработка семян протатранов (CP1 и CP2) снижает ингибирующий эффект ростовых процессов надземной части и корней при стрессовых условиях (150 mM NaCl);

Таблица 1. Влияние протатранов на длину растений и корней при NaCl (150 mM)

Table 1. Protatranes influence on the length of plants and roots with NaCl (150 mM)

Варианты	Длина надземной части, мм	Длина корней, мм
К	197,6±16,3 ^{ae}	126,9±20,9 ^a
К+CP1	202,3±13,5 ^{bf}	109,5±24,6 ^{bf}
К+CP2	200,9±17,3 ^{cfе}	108,1±20,0 ^{cf}
Х3	121,8±27,0 ^d	41,5±10,6 ^d
Х3+CP1	145,0±20,7 ^h	57,5±15,5 ^h
Х3+CP2	146,9±24,3 ^h	60,1±15,2 ^h

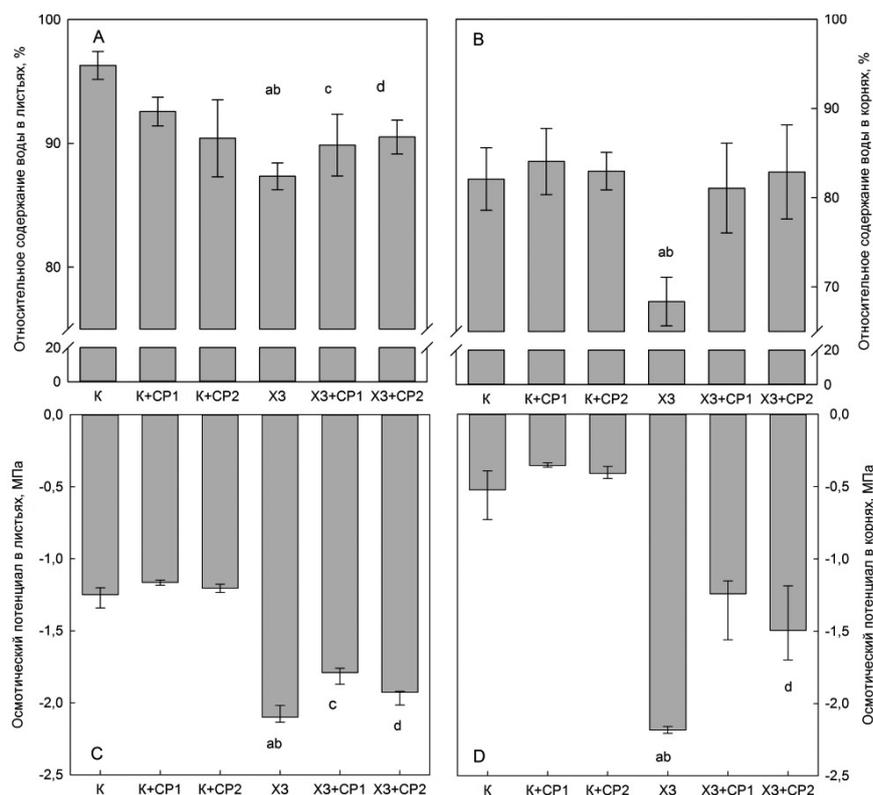


Рис. 2. Влияние протатранов на относительное содержание воды в листьях (А), корнях (В) и осмотический потенциал (Ψ_s) в листьях (С), корнях (D) при действии солевого стресса (150 mM NaCl). К – необработанные семена (контроль); К+СР1 – семена, обработанные веществом №1 без стресса; К+СР2 – семена, обработанные веществом №2 без стресса; X3 – необработанные семена при действии 150 mM NaCl (стресс); X3+СР1 – семена, обработанные веществом №1 при стрессе; X3+СР2 – семена, обработанные веществом №2 при стрессе. Данные по содержанию относительной оводненности представлены в виде $M \pm SD$ ($n=3$). Данные по осмотическому потенциалу – в виде медианы ($n=3$). Барами представлены 25 и 75%-е процентиля. Буквами показаны статистически значимые различия при $P \leq 0,05$ (метод Стьюдента-Ньюмена-Кейлса)

Fig. 2. Protatranes influence on the relative water content in leaves (A), roots (B) and osmotic potential (Ψ_s) in leaves (C), roots (D) under the action of salt stress (150 mM NaCl). K – untreated seeds (control); K+CP1 – seeds treated with substance no. 1 without stress; K+CP2 – seeds treated with substance no. 2 without stress; CS, untreated seeds exposed to 150 mM NaCl (stress); XZ+CP1 – seeds treated with substance no. 1 under stress; X3+CP2 – seeds treated with substance no. 2 under stress. Data on the relative water content are presented as $M \pm SD$ ($n=3$). Osmotic potential data are presented as a median ($n=3$). Bars represent 25 and 75% percentiles. Letters show statistically significant differences at $P \leq 0.05$ (Student-Newman-Keuls method)

– протатраны (СР1 и СР2) при действии хлоридного засоления способствуют меньшему падению осмотического потенциала и улучшают водный статус растений;

– данные вещества могут рассматриваться как возможные стресс-протекторы растений для применения в сельском хозяйстве.

REFERENCES

- Munns R., Tester M. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Physiology*. 2008;59:651-681. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>.
- Hussain S., Khalig A., Matloob A., Wahid M. A., Afzal I. Germination and growth response of three wheat cultivars to NaCl salinity. *Soil Environment*. 2013;32:36-43.
- Mustafa Z., Pervez M. A., Ayyub C. M., Matloob A., Khalig A., Hussain S., et al. Morpho-physiological characterization of chilli genotypes under NaCl salinity. *Soil Environment*. 2014;33:133-141.
- Peleg Z., Blumwald E. Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Current Opinion in Plant Biology*. 2011;14(3):290-295. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.02.001>.
- Gavelienė V., Novickienė L., Pakalniškytė L. Effect of auxin physiological analogues on rapeseed (*Brassica napus*) cold hardening, seed yield and quality. *Journal of Plant Research*. 2013;126:283-292. <https://doi.org/10.1007/s10265-012-0525-3>.
- Skirycz A., Inzé D. More from less: plant growth under limited water. *Current Opinion in Biotechnology*. 2010;21(2):197-203. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.03.002>.
- Khan M. I. R., Khan N. A. Salicylic acid

and jasmonates: approaches in abiotic stress tolerance. *Journal of Plant Biochemistry and Physiology*. 2013;1(4). <https://doi.org/10.4172/2329-9029.1000e113>.

8. Fatma M., Khan M. I. R., Masood A., Khan N. A. Coordinate changes in assimilatory sulphate reduction are correlated to salt tolerance: involvement of phytohormones. *Annual Research & Review in Biology*. 2013;3:267-295.

9. Merkys A., Novickienė L., Darginavičienė J., Maksimov G. Advantages of auxin analogues of plant growth and productivity regulators. *International Journal of Environment and Pollution*. 2007;29(4):443-456.

10. Mirskova A. N., Adamovich S. N., Mirskov R. G. Protatranes as effective biostimulators for agriculture, biotechnology, and microbiology. *Chemistry for Sustainable Development*. 2016;6:713-728.

11. Adamovich S. N. New atranes and similar ionic complexes. Synthesis, structure, properties. *Applied Organometallic Chemistry*. 2019;33(7):e4940. <https://doi.org/10.1002/aoc.4940>.

12. Adamovich S. N., Kondrashov E. V., Ushakov I. A., Shatokhina N. S., Oborina E. N., Vashchenko A. V., et al. Isoxazole derivatives of silatran: synthesis, characterization, in silico ADME profile, prediction of potential pharmacological activity and evaluation of antimicrobial action. *Applied Organometallic Chemistry*. 2020;34(22):e5976. <https://doi.org/10.1002/aoc.5976>.

13. Smart R. E., Bingham G. E. Rapid estimates of relative water content. *Plant Physiology*. 1974;53(2):258-260. <https://doi.org/10.1104/pp.53.2.258>.

14. Martinez J.-P., Lutts S., Schanck A., Bajjia M., Kinet J.-M. Is osmotic adjustment required for wa-

ter stress resistance in the mediterranean shrub *Atriplex halimus* L? *Journal of Plant Physiology*. 2004;161(9):1041-1051. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2003.12.009>.

15. Javid M. G., Sorooshzadeh A., Moradi F., Modarres Sanavy S. A. M., Allahdadi I. The role of phytohormones in alleviating salt stress in crop plants. *Australian Journal of Crop Science*. 2011;5(6):726-734.

16. Zörb C., Geilfus C.-M., Mühling K. H., Ludwig-Müller J. The influence of salt stress on ABA and auxin concentrations in two maize cultivars differing in salt resistance. *Journal of Plant Physiology*. 2013;170(2):220-224. <http://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.09.012>.

17. Sastry E. V. D., Shekhawala K. S. Alleviatory effect of GA₃ on the effect of salt at seedling stage in wheat (*Triticum aestivum*). *Indian Journal of Agricultural Research*. 2001;35:226-231.

18. Koyro H.-W. Effect of salinity on growth, photosynthesis, water relations and solute composition of the potential cash crop halophyte *Plantago coronopus* (L.). *Environmental and Experimental Botany*. 2006;56(2):136-146. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.02.001>.

19. Hasegawa P. M., Bressan R. A., Zhu J.-K., Bohnert H. J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 2000;51:463-499. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.51.1.463>.

20. Qasim A., Habib A., Ashraf M. Influence of exogenously applied brassinosteroids on the mineral nutrient status of two wheat cultivars grown under saline conditions. *Pakistan Journal of Botany*. 2006;38(5):1621-1632.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

А. В. Поморцев,

к.б.н., научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии и биохимии
растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
pomorcevanatolii@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-8025-7647>

Н. В. Дорофеев,

к.б.н., заместитель директора по прикладной
и инновационной работе,
Сибирский институт физиологии и биохимии
растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
nikolay.v.dorofeev@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-0005-0134>

С. Н. Адамович,

д.х.н., ведущий научный сотрудник,
Иркутский институт химии им. А. Е. Фаворского
СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Фаворского, 1,
Российская Федерация,

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Anatolii V. Pomortsev,

Cand. Sci. (Biology), Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., 664033, Irkutsk,
Russian Federation,
pomorcevanatolii@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-8025-7647>

Nikolai V. Dorofeev,

Cand. Sci. (Biology), Deputy Director for Applied
and Innovative Work,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., 664033, Irkutsk,
Russian Federation,
nikolay.v.dorofeev@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-0005-0134>

Sergey N. Adamovich,

Dr. Sci. (Chemistry), Leading Researcher,
A. E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry
SB RAS,
1, Favorsky St., 664033, Irkutsk,
Russian Federation,

mir@iriioch.irk.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1276-924X>

Е. Н. Оборина,
к.х.н., старший научный сотрудник,
Иркутский институт химии им. А. Е. Фаворского
СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Фаворского, 1,
Российская Федерация,
oborina@iriioch.irk.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4770-3403>

Вклад авторов

С. Н. Адамович, Е. Н. Оборина – выполнение
работы по синтезу протатранов.

А. В. Поморцев, Н. В. Дорофеев – проведение
экспериментальной работы по оценке
биологической эффективности протатранов.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

*Все авторы прочитали и одобрили
окончательный вариант рукописи.*

Информация о статье

*Поступила в редакцию 31.03.2022.
Одобрена после рецензирования 07.09.2022.
Принята к публикации 15.09.2022.*

mir@iriioch.irk.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1276-924X>

Elizaveta N. Oborina,
Cand. Sci. (Chemistry), Senior Researcher,
A. E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry
SB RAS,
1, Favorsky St., 664033, Irkutsk,
Russian Federation,
oborina@iriioch.irk.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4770-3403>

Contribution of the authors

Sergey N. Adamovich, Elizaveta N. Oborina –
synthesis of protatranes.

Anatolii V. Pomortsev, Nikolai V. Dorofeev – carrying
out the experimental work on the assessment of the
biological effectiveness of protatrans.

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.*

Information about the article

*The article was submitted 31.03.2022.
Approved after reviewing 07.09.2022.
Accepted for publication 15.09.2022.*

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: Russian Science Citation Index (**RSCI**), 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 Russian Science Citation Index (**RSCI**), 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 12 N 3 (42) 2022

12+

PROCEEDINGS OF UNIVERSITIES
Applied chemistry and biotechnology
Volume 12 No. 3 (42) 2022

Редактор Л.М. Щепина
Перевод на английский язык: Anastasia Stocis, Е.А. Привалова,
редактор Thomas A. Beavitt

Компьютерный набор и верстка В.В. Макаров

Дата выхода в свет 30.09.2022. Формат 60 x 90 / 8.
Бумага офсетная. Печать цифровая. Усл. печ. л. 18.
Тираж 500 экз. Зак. 114. Поз. плана 5н.

Отпечатано в типографии издательства
ФГБОУ ВО «ИРНИТУ»
Адрес типографии:
664074, Россия, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 81/12А

Издание распространяется бесплатно
ФГБОУ ВО «ИРНИТУ»,
664074, Россия, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83