

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

# ИЗВЕСТИЯ САРАТОВСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

Новая серия

Серия: Химия. Биология. Экология

2023

Том 23

Выпуск 3



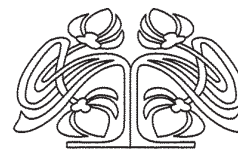
IZVESTIYA OF SARATOV UNIVERSITY  
CHEMISTRY. BIOLOGY. ECOLOGY



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

# ИЗВЕСТИЯ САРАТОВСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

Новая серия  
Серия Химия. Биология. Экология, выпуск 3



Научный журнал  
2023 Том 23

ISSN 1816-9775 (Print)

ISSN 2541-8971 (Online)

Издается с 2005 года

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

## СОДЕРЖАНИЕ

### Научный отдел

#### Химия

**Большаков Д. С., Шаока З. А. Ч., Амелин В. Г.**

Использование смартфона в твердофазно-флуориметрическом определении некоторых полипептидных антибиотиков в лекарственных препаратах

252

**Соколова Т. А., Бурмистрова А. А., Доронин С. Ю.**

Аналитические реакции 2,4-динитрофенилгидразина с некоторыми альдегидами в мицеллах катионных ПАВ

262

**Внуков И. В., Ашихмин Е. А., Ромаденкина С. Б., Аниськова Т. В.**

Исследование активности бифункциональных катализаторов на превращение n-гексана

272

**Кузьмина Р. И., Кубашева Р. Н., Кунашева З. Х.**

Исследование свойств твердого остатка пиролиза осадков сточных вод

280

**Чеботарева Е. А., Цыгулёва Э. И., Доронин С. Ю.**

Микроэкстракционное концентрирование неионными ПАВ и цветометрическое определение фенола

289

**Пузанов Д. А., Скляр А. Е., Коненкова М. В., Кривенько А. П.**

Превращения замещенных цианоиминооктагидрохиназолинов в условиях окисления

299

#### Биология

**Даштоян Ю. В., Калинина А. В., Коробко В. В.** Влияние засоления на морфогенез проростков интрогрессивных линий мягкой пшеницы с генетическим материалом *Aegilops columnaris*

308

**Касаткина М. А., Решетников М. В., Плешакова Е. В.** Изучение биологических и функциональных свойств микроорганизмов с высокой устойчивостью к марганцу (II)

318

**Поверенный Н. М., Аникин В. В.** Филогенетический анализ скорпионов рода *Mesobuthus* (Vachon, 1950), обитающих на территории Казахстана, на основании анализа фрагментов митохондриальных и ядерных генов

331

**Величко Н. С., Кондюрина Н. К., Федоненко Ю. П.**

Антагонистическая активность некоторых представителей рода *Herbaspirillum* в отношении фитопатогенных микромицетов

337

**Парчайкина М. В., Кузьменко Т. П., Чудайкина Е. В., Гладышева М. Ю., Ревина Э. С., Ревин В. В.** Исследование роли нейротрофических факторов в регуляции регенерационных процессов в поврежденных соматических нервах при действии пептидного препарата «Семакс»

345

#### Экология

**Еремакина А. В., Тарасова А. В., Нечаева О. В., Глинская Е. В.**

Циркуляция грибов в системе конский каштан обыкновенный (*Aesculus hippocastanum*) – каштановая минирующая моль (*Cameraria ohridella*) на территории г. Саратова

356

Журнал «Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия “Химия. Биология. Экология”» зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций.

Запись о регистрации СМИ ПИ № ФС77-76649 от 26 августа 2019 г.

Журнал включен в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук (категория К2, специальности: 1.4.2; 1.4.3; 1.4.4; 1.5.2; 1.5.9; 1.5.12; 1.5.14; 1.5.15).

Журнал входит в Международную базу данных DOAJ

Подписной индекс издания 36013.

Подписку на печатные издания можно оформить в интернет-каталоге ГК «Урал-Пресс» (ural-press.ru).

Журнал выходит 4 раза в год.

Цена свободная.

Электронная версия находится в открытом доступе (ichbe.sgu.ru)

#### Директор издательства

Бучко Ирина Юрьевна

#### Редактор

Митенева Елена Анатольевна

#### Художник

Соколов Дмитрий Валерьевич

#### Редактор-стилист

Агафонов Андрей Петрович

#### Верстка

Пермяков Алексей Сергеевич

#### Технический редактор

Каргин Игорь Анатольевич

#### Корректор

Малютина Елена Анатольевна

#### Адрес учредителя, издателя и издательства (редакции):

410012, Саратов, ул. Астраханская, 83

Тел.: +7(845-2)51-29-94, 51-45-49, 52-26-89

E-mail: publ@sgu.ru, izdat@sgu.ru

Подписано в печать 22.09.2023.

Подписано в свет 29.09.2023.

Формат 60 × 84 1/8.

Усл. печ. л. 13,72 (14,75).

Тираж 100 экз. Заказ 99-Т

Отпечатано в типографии Саратовского университета.

#### Адрес типографии:

410012, Саратов, Б. Казачья, 112А

© Саратовский университет, 2023



## ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Журнал публикует научные статьи по аналитической химии, органической химии, физической химии, биофизике (биологические науки), ботанике, зоологии, экологии, (по отраслям) (биологические науки), энтомологии.

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

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

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

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

Структура подачи материала:

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

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

Требования к аннотации и библиографическому списку:

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

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

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

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

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

## CONTENTS

### Scientific Part

#### Chemistry

- Bolshakov D. S., Shogah Z. A. Ch., Amelin V. G.**  
Smartphone use in solid-phase fluorimetric determination of some polypeptide antibiotics in medicinal preparations 252
- Sokolova T. A., Burmistrova A. A., Doronin S. Yu.**  
Analytical reactions of 2,4-dinitrophenylhydrazine with some aldehydes in micelles of cationic surfactants 262
- Vnukov I. V., Ashikhmin E. A., Romadenkina S. B., Aniskova T. V.**  
Study of the activity of bifunctional catalyzers on the transformation of n-hexane 272
- Kuzmina R. I., Kubasheva R. N., Kunasheva Z. Kh.**  
Investigation of the properties of the solid residue of the pyrolysis of sewage sludge 280
- Chebotaeva E. A., Tsygulyova E. I., Doronin S. Yu.**  
Microextraction preconcentration with nonionic surfactants and colorimetric determination of phenol 289
- Puzanov D. A., Sklyar A. E., Konenkova M. V., Krivenko A. P.**  
Transformations of substituted cyanoiminoctahydroquinazolines under oxidation conditions 299

#### Biology

- Dashtoiyan I. V., Kalinina A. V., Korobko V. V.** Effect of salinity on the morphogenesis of seedlings of introgressive lines of spring bread wheat with genetic material *Aegilops columnaris* 308
- Kasatkina M. A., Reshetnikov M. V., Pleshakova E. V.**  
A study of the biological and functional properties of microorganisms with high resistance to manganese (II) 318
- Poverenniy N. M., Anikin V. V.** Phylogenetic analysis of scorpions of the genus *Mesobuthus* (Vachon, 1950), inhabiting the territory of Kazakhstan, based on the analysis of fragments of mitochondrial and nuclear genes 331
- Velichko N. S., Kondyurina N. K., Fedonenko Yu. P.**  
Antagonistic activity of some *Herbaspirillum* species against phytopathogenic micromycetes 337
- Parchaykina M. V., Kuzmenko T. P., Chudaikina E. V., Gladysheva M. Yu., Revina E. S., Revin V. V.** Study of the role of neurotrophic factors in the regulation of regeneration processes in damaged somatic nerves under the action of semax peptide preparation 345

#### Ecology

- Eremakina A. V., Tarasova A. V., Nechaeva O. V., Glinskaya E. V.**  
Circulation of fungi in the system *Aesculus hippocastanum* – *Cameraria ohridella* on the territory of Saratov city 356



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

**Главный редактор**

Горячева Ирина Юрьевна, доктор химических наук, профессор (Саратов, Россия)

**Заместитель главного редактора**

Коннова Светлана Анатольевна, доктор биологических наук, профессор (Саратов, Россия)

**Ответственный секретарь**

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

**Члены редакционной коллегии:**

Аникин Василий Викторович, доктор биологических наук, профессор (Саратов, Россия)

Берберова Надежда Титовна, доктор химических наук, профессор (Астрахань, Россия)

Богатырев Владимир Александрович, доктор биологических наук, профессор (Саратов, Россия)

Гаркушин Иван Кириллович, доктор химических наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, действительный член РАЕН (Самара, Россия)

Горбунов Олег Григорьевич, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник (Москва, Россия)

Гулий Ольга Ивановна, доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник (Саратов, Россия)

Дубатовол Владимир Викторович, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник (Новосибирск, Россия)

Дыкман Лев Абрамович, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник (Саратов, Россия)

Егорова Алевтина Юрьевна, доктор химических наук, профессор (Саратов, Россия),

Ерошенко Галина Александровна, доктор биологических наук, старший научный сотрудник (Саратов, Россия)

Захаров Владимир Михайлович, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН (Москва, Россия)

Кашин Александр Степанович, доктор биологических наук, профессор (Саратов, Россия)

Кулагин Алексей Юрьевич, доктор биологических наук, профессор, заслуженный деятель науки Республики Башкортостан, академик РАЕН (Уфа, Россия)

Кулиш Елена Ивановна, доктор химических наук, доцент (Уфа, Россия)

Ларионова Дарья Анатольевна, кандидат химических наук (Гент, Бельгия)

Максимов Георгий Владимирович, доктор биологических наук, профессор (Москва, Россия)

Мисра Прадумна Кумар, PhD (Бхопал, Индия)

Монахова Юлия Борисовна, доктор химических наук (Аахен, Германия)

Мостовский Михаил Борисович, доктор биологических наук (Тель-Авив, Израиль; Питермаритцбург, ЮАР)

Опарин Михаил Львович, доктор биологических наук, профессор (Саратов, Россия)

Позднякова Наталия Николаевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник (Саратов, Россия)

Ревин Виктор Васильевич, доктор биологических наук, профессор (Саранск, Россия)

Шанцер Иван Алексеевич, доктор биологических наук, главный научный сотрудник (Москва, Россия)

Шиповская Анна Борисовна, доктор химических наук, доцент (Саратов, Россия)

Шихалиев Хидмет Сафарович, доктор химических наук, профессор (Воронеж, Россия)

Штыков Сергей Николаевич, доктор химических наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, действительный член РАЕН (Саратов, Россия)

Щеголев Сергей Юрьевич, доктор химических наук, профессор (Саратов, Россия),

Юдакова Ольга Ивановна, доктор биологических наук, доцент (Саратов, Россия)

**EDITORIAL BOARD OF THE JOURNAL  
"IZVESTIYA OF SARATOV UNIVERSITY.  
CHEMISTRY. BIOLOGY. ECOLOGY"**

**Editor-in-Chief** – Irina Yu. Goryacheva (Saratov, Russia)

**Deputy Editor-in-Chief** – Svetlana A. Konnova (Saratov, Russia)

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

**Members of the Editorial Board:**

Vasilii V. Anikin (Saratov, Russia)

Nadezhda T. Berberova (Astrakhan, Russia)

Vladimir A. Bogatyrev (Saratov, Russia)

Ivan K. Garkushin (Samara, Russia)

Oleg G. Gorbunov (Moscow, Russia)

Olga I. Guliy (Saratov, Russia)

Vladimir V. Dubatolov (Novosibirsk, Russia)

Lev A. Dykman (Saratov, Russia)

Alevtina Yu. Egorova (Saratov, Russia)

Galina A. Eroshenko (Saratov, Russia)

Alexandr S. Kashin (Saratov, Russia)

Alexey Yu. Kulagin (Ufa, Russia)

Elena I. Kulish (Ufa, Russia)

Dariya A. Larionova (Ghent, Belgium)

Georgiy V. Maksimov (Moscow, Russia)

Pradyumna Kumar Mishra (Bhopal, India)

Yuliya B. Monakhova (Aachen, Germany)

Mikhail B. Mostovski (Tel Aviv, Israel;

Pietermaritzburg, South African Republic)

Michail L. Oparin (Saratov, Russia)

Natalia N. Pozdnyakova (Saratov, Russia)

Viktor V. Revin (Saransk, Russia)

Ivan A. Shanzer (Moscow, Russia)

Anna B. Shipovskaya (Saratov, Russia)

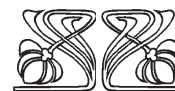
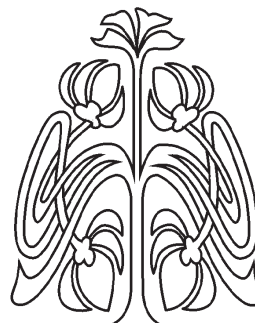
Khidmet S. Shikhaliev (Voronezh, Russia)

Sergey N. Shtykov (Saratov, Russia)

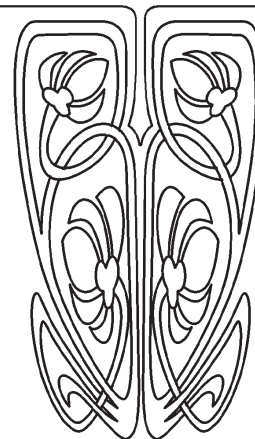
Sergey Ju. Shchyogolev (Saratov, Russia)

Olga I. Yudakova (Saratov, Russia)

Vladimir M. Zakharov (Moscow, Russia)



**РЕДАКЦИОННАЯ  
КОЛЛЕГИЯ**





## ХИМИЯ

Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 3. С. 252–261

*Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2023, vol. 23, iss. 3, pp. 252–261

<https://ichbe.sgu.ru>

<https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-3-252-261>

EDN: ZPAUBY

Научная статья

УДК 543.068.8:543.426:543.062:577.182.99

### Использование смартфона в твердофазно-флуориметрическом определении некоторых полипептидных антибиотиков в лекарственных препаратах

Д. С. Большаков<sup>1</sup>✉, З. А. Ч. Шаока<sup>2</sup>, В. Г. Амелин<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>АО «ГЕНЕРИУМ», Россия, 601125, Владимирская обл., Петушинский район, пос. Вольгинский, ул. Владимирская, д. 14

<sup>2</sup>Владимирский государственный университет имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых (ВлГУ), Россия, 600000, г. Владимир, ул. Горького, д. 87

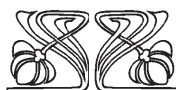
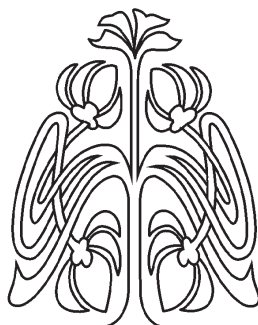
<sup>3</sup>ФГБУ «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов», Россия, 123022, г. Москва, Звенигородское шоссе, д. 5

Большаков Дмитрий Сергеевич, кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории физико-химических методов, [bolshakovina@mail.ru](mailto:bolshakovina@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0001-9233-1349>

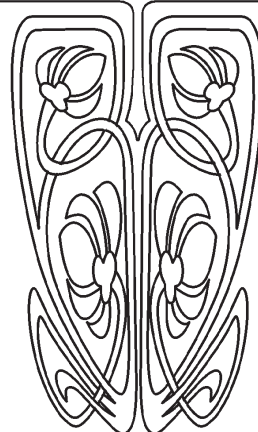
Шаока Зин Алабдин Чалави, аспирант кафедры химии Института биологии и экологии, [zeanalaabideen4@gmail.com](mailto:zeanalaabideen4@gmail.com)

Амелин Василий Григорьевич, доктор химических наук, профессор, <sup>2</sup>профессор кафедры химии Института биологии и экологии, <sup>3</sup>главный научный сотрудник Отделения фармакологических лекарственных средств, безопасности пищевой продукции и кормов, [amelinvg@mail.ru](mailto:amelinvg@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0001-7477-7398>

**Аннотация.** Анализ полупродуктов на разных этапах производства и готовой лекарственной продукции является неотъемлемой составляющей эффективной системы обеспечения качества фармацевтического производства. Традиционные методы, используемые в фармацевтической области, такие как капиллярный электрофорез, газовая и жидкостная хроматография, довольно универсальны и эффективны. Однако их отличает высокая стоимость аппаратного оформления, комплектующих материалов, необходимость использования высокочистых растворителей, отсутствие мобильности и возможности исследований *in situ*. Подобные недостатки можно преодолеть при использовании метода цифровой цветометрии. Ее значительной популяризации способствовало развитие портативных и персональных электронных устройств, среди которых можно выделить смартфон. Цель работы заключалась в разработке быстрого и простого способа определения ряда полипептидных антибиотиков в лекарственных препаратах методом цифровой цветометрии с использованием смартфона в качестве цветорегистрирующего устройства. Для реализации подхода твердофазно-флуориметрического определения полипептидных антибиотиков в качестве матрицы использовали пластины ВЭТСХ на основе силикагеля с алюминиевой подложкой. В данных условиях наблюдали флуоресценцию актиномицина D, виргиниамицина M1, виргиниамицина S1 и новобиоцина при воздействии монохроматического излучения в УФ части спектра (365 нм). Измерение интенсивности флуоресценции на поверхности матриц осуществляли с помощью смартфона. Построены градуировочные характеристики для определения полипептидных антибиотиков в диапазоне концентраций 32–500 мкг/мл. Способ оценки качества готовых лекарственных препаратов априори



НАУЧНЫЙ  
ОТДЕЛ





рован на коммерческих продуктах «Пиостацин», «Космеген», «Дактиномицин», приобретенных в розничных сетях. Относительное стандартное отклонение результатов анализа не превышает 0.05. Продолжительность анализа составила 10–15 мин. Представлен способ определения некоторых антибиотиков полипептидного ряда по собственной флуоресценции нанесенных растворов на твердую подложку при обработке монохроматическим излучением УФ диапазона. Используемые условия постановки эксперимента позволяют осуществлять анализ лекарственных препаратов на основе актиномицина D, виргиниамицина M1, виргиниамицина S1 и новобиоцина.

**Ключевые слова:** полипептидные антибиотики, цифровая цветометрия, твердофазная флуориметрия, смартфон, лекарственные препараты

**Для цитирования:** Большаков Д. С., Шаока З. А. Ч., Амелин В. Г. Использование смартфона в твердофазно-флуориметрическом определении некоторых полипептидных антибиотиков в лекарственных препаратах // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 3. С. 252–261. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-3-252-261>, EDN: ZPAUBY

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0)

Article

## Smartphone use in solid-phase fluorimetric determination of some polypeptide antibiotics in medicinal preparations

D. S. Bolshakov<sup>1</sup>✉, Z. A. Ch. Shogah<sup>2</sup>, V. G. Amelin<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>GENERIUM, 14 Vladimirskaia St., pos. Volginsky, Petushinsky district, Vladimir region 601125, Russia

<sup>2</sup>Vladimir State University named after Alexander and Nikolay Stoletovs, 87 Gor'kogo St., Vladimir 600000, Russia

<sup>3</sup>The Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality, 5 Zvenigorodskoye shosse, Moscow 123022, Russia

Dmitry S. Bolshakov, bolshakovina@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9233-1349>

Zen Alabden Chalawi Shogah, zeanalaabideen4@gmail.com

Vasily G. Amelin, amelinvg@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7477-7398>

**Abstract.** The analysis of semi-products at different stages of production and finished medicinal products is an integral part of an effective quality assurance system for pharmaceutical production. The traditional methods used in the pharmaceutical field, such as capillary electrophoresis, gas and liquid chromatography, are quite versatile and effective. However, they are distinguished by the high cost of instrumentation and component materials, the need to use high-purity solvents, the lack of mobility and the possibility of in situ studies. Such shortcomings can be overcome by using the digital colorimetry method. Its significant popularization has been facilitated by the development of portable and personal electronic devices, among which the smartphone can be distinguished. The aim of the work was to develop a fast and simple method for the determination of a number of polypeptide antibiotics in drugs by digital colorimetry using a smartphone as a color recording device. To implement the solid phase fluorimetric determination of polypeptide antibiotics, HPTLC plates based on silica gel with an aluminum substrate were used as a matrix. Under these conditions, the fluorescence of actinomycin D, virginiamycin M1, virginiamycin S1, and novobiocin was observed when exposed to monochromatic radiation in the UV part of the spectrum (365 nm). The measurement of fluorescence intensity on the surface of the matrices was carried out using a smartphone. Calibration characteristics were constructed for the determination of polypeptide antibiotics in the concentration range of 32–500 µg/mL. The method for assessing the quality of finished drugs was tested on commercial products “Piostacin”, “Cosmegen”, “Dactinomycin” purchased in retail chains. The relative standard deviation of the analysis results does not exceed 0.05. The duration of the analysis was 10–15 min. Based on the results of the studies, the paper presents a method for determining some antibiotics of the polypeptide series by the intrinsic fluorescence of deposited solutions on a solid substrate during treatment with monochromatic UV radiation. The experimental delivery conditions used allow the analysis of drugs based on actinomycin D, virginiamycin M1, virginiamycin S1, and novobiocin.

**Keywords:** polypeptide antibiotics, digital colorimetry, solid phase fluorimetry, smartphone, drugs

**For citation:** Bolshakov D. S., Shogah Z. A. Ch., Amelin V. G. Smartphone use in solid-phase fluorimetric determination of some polypeptide antibiotics in medicinal preparations. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2023, vol. 23, iss. 3, pp. 252–261 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-3-252-261>, EDN: ZPAUBY

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC-BY 4.0)

### Введение

Актуальной проблемой XXI в. является развитие множественной лекарственной устойчивости организма человека, животных и большинства вредоносных агентов (бактерий, крупных вирусов) к различным лекарственным средствам (ЛС). Главным образом, это обусловлено систематическим и неконтролируемым применением лекарственных препаратов (ЛП) в домашнем и народном хозяйстве, животноводстве и пищевой промыш-

ленности при производстве продуктов питания и напитков (например, бутилированной воды).

Наличие остаточных количеств антимикробных веществ в объектах окружающей среды, продукции животного и растительного происхождения приводит к развитию антибиотикорезистентности. Вследствие чего ЛС перестают оказывать должный эффект в терапевтических дозах, вплоть до критических и более высоких концентраций.



Для решения данной проблемы наиболее результативным является комплекс мероприятий, включающий три направления: 1) мониторинговые исследования остаточных количеств антимикробных веществ в воде, почве и продуктах питания; 2) контроль за применением ЛП антимикробного действия в медицине и домашнем хозяйстве; 3) поиск и разработка новых ЛС, использование которых следует значительно ограничить для сохранения их эффективности (так называемые лекарства последнего резерва).

В рамках третьего направления в настоящее время используют антибиотики поли-

пептидного ряда (ПП). Полипептидные антибиотики – химически разнообразная группа противомикробных препаратов с широким спектром действия против многих грамотрицательных и грамположительных бактерий. Представителями семейства ПП являются бацитрацин, колистин А, колистин В, полимиксин В1, полимиксин В2, виргиниамицин S1, виргиниамицин M1, актиномицин D и новобиоцин. Эти соединения с большой молекулярной массой имеют общую структуру гептапептидного кольца с полипептидной боковой цепью (рис. 1).

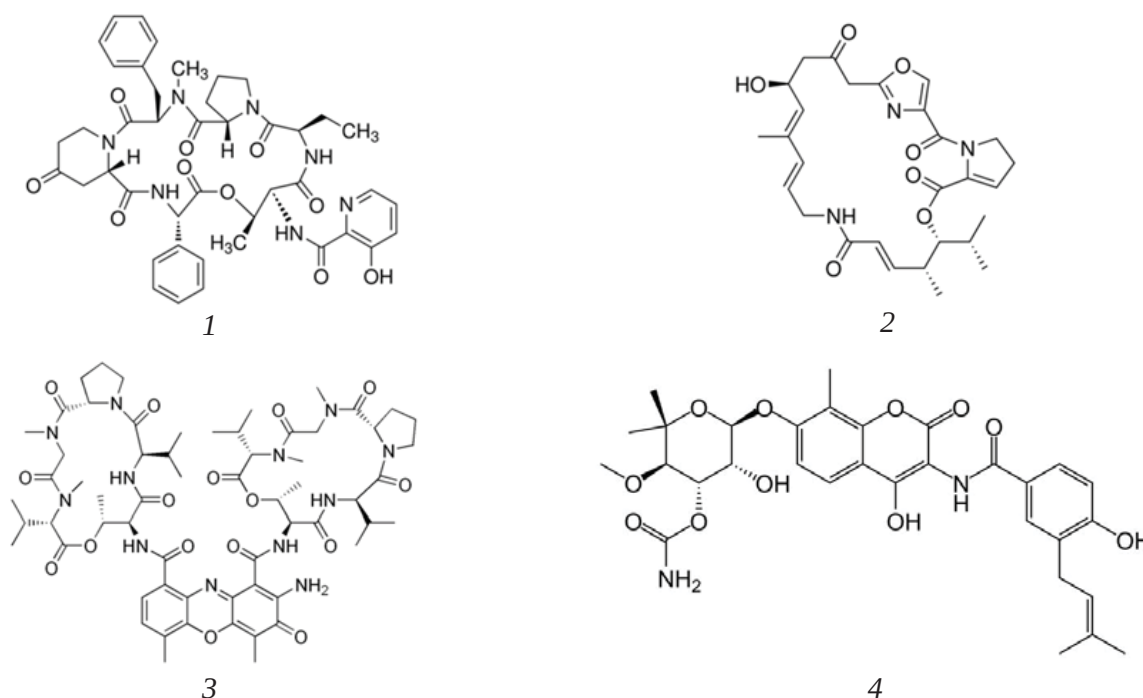


Рис. 1. Структурные формулы виргиниамицина S1 (1), виргиниамицина M1 (2), актиномицина D (дактиномицина) (3), новобиоцина (4)

Fig. 1. Structural formulas of virginiamycin S1 (1), virginiamycin M1 (2), actinomycin D (dactinomycin) (3), novobiocin (4)

Бацитрацин продуцируется *Bacillus licheniformis* и *Bacillus subtilis* и представляет собой смесь нескольких близкородственных полипептидов, в основном состоящих из бацитрацина А (более 50%) и в меньшей степени бацитрацина В1, В2, С и F. Колистин (также известный как полимиксин Е) является важным представителем группы полимиксинов (катионных пептидных антибиотиков) и продуцируется культурами *Bacillus polymyxa* var. *colistinus*. В коммерчески доступном колистине обнаружено не менее тридцати различных соединений. Основными компонентами выступа-

ют колистин А (полимиксин Е1) и колистин В (полимиксин Е2), которые отличаются одним атомом углерода в жирной ацильной части и составляют более 85% от общего количества колистинов, используемых в фармацевтических продуктах. Полимиксин В также является производным *Bacillus polymyxa* и представляет собой смесь более тридцати полипептидов. Полимиксины В1 и В2, которые отличаются одним атомом углерода в жирной ацильной части, являются двумя основными компонентами, на которые приходится более 75% смеси полипептидов.



В отсутствие необходимых контрольных процедур оценки качества исходного сырья и готовой продукции [1] испытательные лаборатории вынуждены пользоваться общими фармакопейными статьями [2] или разрабатывать собственную нормативно-техническую базу [3].

Для идентификации и определения количественного содержания антибиотиков полипептидного ряда в научной литературе предложены подходы, основанные на принципах спектрофотометрии [4–6], высокоэффективной жидкостной хроматографии (**ВЭЖХ**) с масс-спектрометрическим [7–9], УФ- [10, 11] и флуориметрическим [12] детектированием.

Наиболее традиционным и относительно простым в реализации является спектрофотометрический метод, с использованием которого разработан быстрый способ идентификации и определения бацитрацина после реакции конденсации с дабсилхлоридом [4]. В рамках процедуры оптимизации спектрофотометрического определения действующего вещества ЛП выбраны условия проведения реакции дериватизации (время, температурный режим, молярное соотношение исходных веществ) и длины волны максимума поглощения продукта взаимодействия ( $\lambda = 474$  нм). Изучена его стабильность в растворе, которая не превышала 2 ч. Диапазон линейности составил  $2 \times 10^{-6} - 2 \times 10^{-5}$  моль/л.

Разработан и апробирован способ одновременного определения ципрофлоксацина, колистина и ивакафтора в плазме крыс, лизате эпителиальных клеток человека, среде для культивирования клеток и транспортной среде для ЛС методом ВЭЖХ с тандемным масс-спектрометрическим детектированием [9]. При подготовке пробы аликвоту крысиной плазмы или среды для культивирования клеток объемом 200 мкл обрабатывали 600 мкл экстракционного раствора (ацетонитрил, содержащий 0,1% муравьиной кислоты и 0,2% трифторуксусной кислоты (ТФУ)). Добавление 0,2% ТФУ способствовало разрушению комплекса ЛС–белок. После интенсивного перемешивания и центрифугирования подготовленные пробы подвергали хроматографическому анализу при регистрации масс-спектрометрического сигнала в режиме мониторинга множественных реакций (MRM). В качестве внутреннего стандарта использовали полимиксин В1 и В2. Время анализа одного

образца составляло 6 минут, что обеспечивает высокую экспрессность данного подхода. Градуировочные зависимости линейны в диапазоне концентраций 0,029–5,82 мкг/мл для колистина А, 0,016–3,14 мкг/мл для колистина В, 0,05–10,0 мкг/мл для ивакафтора и 0,043–8,58 мкг/мл для ципрофлоксацина.

Представлена быстрая и простая методика качественного и количественного анализа ряда антибиотиков-гликопептидов (эремомидина, ванкомицина, тейкопланина А2, ристомидина А) и грамицидина S с применением метода обращенно-фазовой ВЭЖХ при детектировании в УФ области спектра и градиентном режиме элюирования [10]. УФ ВЭЖХ-анализ антибиотиков проводили на микроколоночном жидкостном хроматографе Милихром А-02 с колонкой из нержавеющей стали 2×75 мм, заполненными сорбентом Nucleosil 100-5C18 РАН. В качестве подвижной фазы использовали систему элюентов, включающую 0,1%-ный раствор ТФУ в дистиллированной воде (элюент А) и 0,1%-ный раствор ТФУ в ацетонитриле (элюент В). Хроматографическое разделение проводили при температуре 35°C. Нижняя граница диапазона определяемых содержаний (**ДОС**) составила 0,1 мкг антибиотика в пробе. В работе представлены результаты исследования антибактериальных веществ в неочищенных препаратах (сырцах).

Существенно повысить чувствительность определения удастся при использовании флуориметрического детектирования при ВЭЖХ-разделении полипептидного антибиотика цинк-бацитрацина (смеси мажорных и минорных компонентов) после реакции дериватизации с *o*-фталевым альдегидом в присутствии нуклеофильного агента 2-меркаптоэтанола [12]. Оптимальные результаты хроматографирования получены при использовании колонки ReprosilODS-AC18 (250×4 мм) с подвижной фазой, представляющей собой смесь ацетонитрил-метанол (1:3, об.) – водный раствор  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,05 М рН 6,0) (60 : 40, об.).

Определение терапевтических количеств полипептидных антибиотиков в кормах для животных проводят методами мицеллярной электрокинетической хроматографии (**МЭКХ**) [13] и ВЭЖХ с тандемным масс-спектрометрическим детектированием при электрораспылительной ионизации [14].





Разработан способ оценки содержания цинкбацитрацина, полимиксина В, окситетрациклина и сульфатамида в кормах для животных методом МЭКХ [13]. Ведущий электролит представлял собой смесь, состоящую из 20 мМ боратного и 20 мМ фосфатного буферных растворов (рН 8,4), 20 мМ додецилсульфата натрия и 10 об.% метанола. Электрофоретическое разделение проводили при 25°C, приложенном напряжении 25 кВ и рабочем давлении 10 мбар. Одновременное детектирование всех аналитов проводили при длине волны УФ излучения  $\lambda=215$  нм. Данный способ апробирован при определении антибактериальных веществ в кормовых добавках и кормах для животных.

Описанные в литературе подходы отличаются значительной ресурсоемкостью, их реализация требует наличия дорогостоящего оборудования, расходных материалов, высокочистых реагентов и обученного персонала. В качестве альтернативы традиционным инструментальным методам следует рассматривать метод цифровой цветометрии, который активно развивается в качестве экспресс-методологии, не уступающей по точности классическим приемам [15–19].

Научная новизна заключалась в изучении возможности контроля качества готовых лекарственных препаратов на основе полипептидных антибактериальных веществ, нанесенных на твердый инертный носитель (пластины для ВЭТСХ), по собственной флуоресценции под действием монохроматического излучения длиной волны 365 нм посредством метода цифровой в рамках аддитивной цветометрической системы RGB с привлечением специализированного программного обеспечения и смартфона в качестве инструмента регистрации аналитических характеристик.

**Цель работы** состояла в разработке быстрого и простого способа определения действующих веществ лекарственных препаратов на основе полипептидов (актиномицина D, виргиниамицина M1, виргиниамицина S1, новобиоцина) методом цифровой цветометрии твердофазной флуоресценции с использованием смартфона в качестве цветорегистрирующего устройства.

#### **Материалы и методы**

**Аппаратура.** В качестве инструмента для регистрации цветометрических параметров

твердофазной флуоресценции в рамках данного исследования использовали смартфон «iPhone X» (Apple, США), оснащенный специализированным программным обеспечением «RGBer». Возбуждение флуоресценции проводили с помощью осветителя люминесцентного диагностического «Лампа Вуда ОЛДД-01» (Россия).

Использовали аналитические весы «Pioneer PA 214C» специального класса точности с пределом взвешивания 0,1 мг (Ohaus Corporation, USA), дозаторы «Proline Biohit» одноканальные механические переменного объема 2–20 мкл, 100–1000 мкл, 1000–5000 мкл (Biohit, Финляндия), пробирки полипропиленовые емкостью 15 мл (SPL Life Sciences Co., Корея), полистирольные планшеты для иммуноферментного анализа.

**Материалы.** В работе применяли пластины для высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) «HPTLC Silica gel 60» (Merck, Германия).

**Реактивы.** Использовали стандартные образцы полипептидных антибиотиков (бацитрацина, колистина сульфата, полимиксина В сульфата, виргиниамицина S1, виргиниамицина M1, актиномицина D, новобиоцина натриевой соли) (98–100%, Sigma-Aldrich, США). Исходные стандартные растворы полипептидных антибиотиков массовой концентрацией 1 мг/мл готовили растворением точной навески препаратов в метаноле (Fisher Scientific UK, Великобритания). Рабочие растворы готовили разбавлением исходных деионизированной водой (15–18 МОм×см, ОСТ 11 029.003-80).

**Построение градуировочной зависимости.** Рабочие растворы полипептидов массовой концентрацией 1 мкг/мл готовили последовательным разбавлением исходного раствора деионизированной водой в полистирольном планшете для иммуноферментного анализа. Полученные таким образом растворы объемом 5 мкл наносили на пластину ВЭТСХ с помощью механического дозатора. После высыхания пятна подвергали обработке монохроматическим УФ излучением ( $\lambda = 365$  нм). Измерение цветометрических характеристик проводили посредством смартфона и специализированного программного обеспечения.

**Аналитический сигнал ( $A_r$ )** в системе RGB рассчитывали по формуле:



$$A_r = \sqrt{(R_0 - R_x)^2 + (G_0 - G_x)^2 + (B_0 - B_x)^2},$$

где  $R_0$ ,  $G_0$ ,  $B_0$ ,  $R_x$ ,  $G_x$ ,  $B_x$  – цифровые значения интенсивностей красного, зеленого, синего цветов холостой и анализируемой пробы соответственно.

**Пробоподготовка.** Одну таблетку лекарственного препарата помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, приливали 1 мл 1 М раствора HCl и небольшое количество деионизированной воды. Содержимое колбы тщательно перемешивали до полного растворения лекарственного препарата. Объем в колбе доводили до метки деионизированной водой и снова перемешивали. Отбирали 1 мл полученного раствора, приливали 9 мл деионизированной воды, перемешивали и фильтровали через мембранный фильтр 0,20 мкм. Отбирали 5 мкл полученного раствора с помощью механического дозатора и наносили на пластины ВЭТСХ. После высыхания пятна облучали монохроматическим УФ излучением (365 нм) и измеряли смартфоном цветометрические характеристики, по градуировочной зависимости определяли содержание полипептида в таблетке с учетом разбавления.

### Результаты и их обсуждение

Для изучения твердофазной флуоресценции антибактериальных веществ полипептидного ряда и ее реализации при оценке качества ЛП в рамках данного исследования рассматривали возможности использования различных матриц: целлюлозная бумага, цеолит, кремнезем и силикагель (в формате пластин ВЭТСХ на алюминиевой подложке). В ходе серии предварительных экспериментов установлено, что наиболее оптимальным является применение пластин ВЭТСХ с силикагелем. Выбор обусловлен простотой использования, наличием инертного носителя, доступностью, экологичностью и относительно низкой себестоимостью данного материала.

Нанесенные на твердую матрицу полипептиды под действием внешнего монохроматического излучения проявляют флуоресцирующие свойства. В рамках реализуемого цветометрического подхода параметры флуоресценции используются в качестве аналитического сигнала

с их последующим преобразованием в цифровой формат посредством аддитивной системы RGB. Из представленного перечня антибактериальных соединений только актиномицин D, виргиниамицин M1, виргиниамицин S1 и новобиоцин при выбранных условиях определения взаимодействуют с электромагнитным излучением длиной волны 365 нм при последующем излучательном переходе в невозбужденное (основное) состояние. Очевидно, что прочие вещества способны к флуоресценции при других, отличных от представленных в данной работе, условиях возбуждения.

В соответствии с описанной выше процедурой получены градуировочные зависимости для определения полипептидных антибиотиков в диапазоне концентраций 32–500 мкг/мл (рис. 2, табл. 1). Согласно представленным данным, следует отметить, что зависимость рассчитанного аналитического сигнала от концентрации компонента для актиномицина D и виргиниамицина M1 носит логарифмический характер, для виргиниамицина S1 и новобиоцина – прямолинейный.

Предел обнаружения ( $c_{\text{мин}}$ ) и предел определения ( $c_{\text{д}}$ ) рассчитывали по формулам  $3.3s/k$  и  $10s/k$  соответственно ( $s$  – стандартное отклонение аналитического сигнала для холостого опыта,  $k$  – тангенс угла наклона градуировочной зависимости на линейном участке). Стандартное отклонение для  $A_r$  холостого опыта составляло  $(0,5 \pm 0,1)$  при  $n = 15$ .

**Анализ готовых лекарственных препаратов.** При выбранных параметрах твердофазно-флуориметрического определения полипептидов по собственной флуоресценции на пластинах ВЭТСХ провели анализ готовых лекарственных препаратов медицинского назначения («Пиостаин», «Космеген», «Дактиномицин»). Результаты количественной оценки содержания действующих (активных) веществ с учетом погрешности совпадают с содержанием, заявленным изготовителем на упаковке. В табл. 2 представлены результаты определения полипептидов в лекарственных препаратах, приобретенных в аптечных пунктах розничной торговли. Относительное стандартное отклонение результатов анализа не превышает 0,05. Продолжительность анализа составила 10–15 мин.

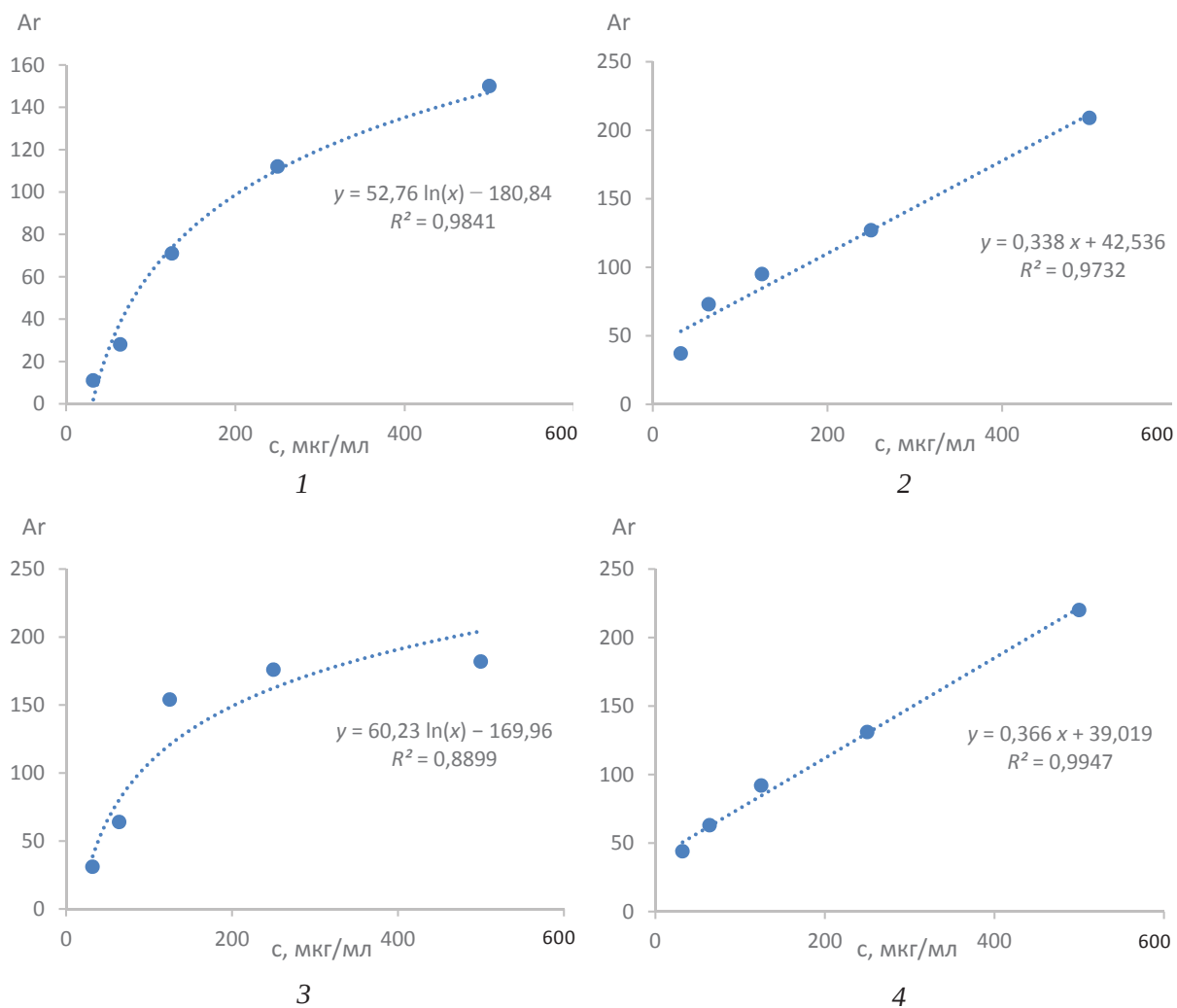


Рис. 2. Градуировочные зависимости для определения актиномицина D (1), виргиниамицина M1 (2), виргиниамицина S1 (3) и новобиоцина (4)

Fig. 2. Calibration dependencies for the determination of actinomycin D (1), virginiamycin M1 (2), virginiamycin S1 (3), and novobiocin (4)

Таблица 1 / Table 1

**Аналитические характеристики определения полипептидных антибиотиков цветометрическим методом в диапазоне концентраций 32–500 мкг/мл**

**Analytical characteristics of the determination of polypeptide antibiotics by the colorimetric method in the concentration range of 32–500 μg/ml**

Полипептид Polypeptide	Уравнение градуировочной зависимости Calibration equation	$R^2$	$C_{\text{мин}}$ , мкг/мл	$C_{\text{н}}$ , мкг/мл
Актиномицин D Dactinomycin	$y = 52,8 \ln(x) - 180,8$	0,984	10	32
Виргиниамицин M1 Virginiamycin M1	$y = 0,34x + 42,54$	0,973	10	32
Виргиниамицин S1 Virginiamycin S1	$y = 60,2 \ln(x) - 170,0$	0,890	10	32
Новобиоцин Novobiocin	$y = 0,37x + 39,02$	0,995	10	32

Результаты определения полипептидных антибиотиков в лекарственных препаратах ( $n = 5$ ,  $P = 0,95$ )  
Results of the determination of polypeptide antibiotics in drugs ( $n = 5$ ,  $P = 0,95$ )

Наименование препарата / Name of the preparation	Действующее (активное) вещество / Active substance	Заявленное содержание действующего вещества / Declared content of the active substance	Установленное содержание действующего вещества, ( $x_{cp} \pm \Delta x$ ) / The established content of the active substance ( $x_{mean} \pm \Delta x$ )	$S_r$
«Пиостацин» «Pyostacin»	Виргиниамицин M1 Virginiamycin M1	500 мг (mg)	495 ± 15	0,05
«Космеген» «Cosmegen»	Актиномицин D Actinomycin D	500 мкг/фл (µg/fl)	507 ± 9	0,04
«Дактиномицин» «Dactinomycin»	Актиномицин D Dactinomycin	500 мкг/фл (µg/fl)	498 ± 10	0,03

### Выводы

В работе представлен способ оценки качества лекарственных препаратов на основе антибактериальных веществ полипептидного ряда по собственной флуоресценции растворов анализов, нанесенных на пластины ВЭТСХ, с использованием метода цифровой цветометрии. Для регистрации цветометрических характеристик в аддитивной системе RGB с последующим расчетом аналитического сигнала применяли смартфон и доступный программный продукт «RGBer». Выбранные условия в рамках данной работы являются пригодными для определения актиномицина D, виргиниамицина M1, виргиниамицина S1 и новобиоцина. После получения стандартных цветовых шкал и построения градуировочных зависимостей в диапазоне концентраций 32–500 мкг/мл апробацию заявленного способа проводили на готовых лекарственных препаратах коммерческого производства «Пиостацин», «Космеген», «Дактиномицин». Результаты определения концентрации действующих (активных) веществ с учетом погрешности совпадают с содержанием, заявленным производителем.

### Список литературы

1. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. III. М.: ФЭМБ, 2018. 1926 с.
2. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. I. М.: ФЭМБ, 2018. 1814 с.
3. ГОСТ Р 52249-2009. Правила производства и контроля качества лекарственных средств. М.: Стандартинформ, 2010. 139 с.
4. Krzek J., Piotrowska J. Spectrophotometric determination of bacitracin in bulk drug as dabsyl derivative in a

range of visible light // Acta Pol. Pharm. 2011. Vol. 68, № 6. P. 853–858.

5. Severino P., Silveira E. F., Vazzana M., Chaud M. V., Santana M. H. A., Souto E.B. Validation of an UV spectrophotometric assay for the quantification of polymyxin B in solid lipid nanoparticles // Pharmazie. 2015. Vol. 70. P. 693–697.
6. Elimam M. M., Shantier S. W., Gadkariem E. A., Mohamed M. A. Derivative spectrophotometric methods for the analysis and stability studies of colistin sulphate // J. Chem. 2015. Vol. 2015 (№ 624316). P. 1–5.
7. Castilhos J. K., Dillenburg T. L., Antunes M. V., Scribel L., Zavascki A. P., Linden R., Verza S. G. Evaluation of the stability of polymyxin B in saline and glucose solutions using LC-MS/MS // Braz. J. Pharm. Sci. 2020. Vol. 56, № e18367.
8. Suleiman S. A., Song F., Su M.-X., Hang T.-J., Song M. Analysis of bacitracin and its related substances by liquid chromatography tandem mass spectrometry // J. Pharm. Anal. 2017. Vol. 7, № 1. P. 48–55.
9. Yuan H., Yu S., Chai G., Liu J., Zhou Q. A LC-MS/MS method for simultaneous analysis of the cystic fibrosis therapeutic drugs colistin, ivacaftor and ciprofloxacin // J. Pharm. Anal. 2017. Vol. 7, № 1. P. 48–55.
10. Тимофеева А. В., Серебрякова М. В., Баратова Л. А., Катруха Г. С. Экспресс-анализ антибиотиков пептидной группы на микроколоночном хроматографе Милюхром А-02 // Биотехнология. 2009. Т. 1. С. 90–95.
11. Хайруллин Д. Д., Галяутдинова Г. Г., Босяков В. И., Шангареев Н. Г., Егоров В.И. Идентификация кормового антибиотика цинкбацилтрацина методом ВЭЖХ // Ученые записки КГАВМ им. Н. Э. Баумана. 2017. Т. 4. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/identifikatsiya-kormovogo-antibiotika-tsinkbatsitratsina-metodom-vezhh> (дата обращения: 26.03.2023).
12. Гуревич П. А., Галяутдинова Г. Г., Босяков В. И., Егоров В. И., Сайфутдинов А. М. Флуориметрическое определение методом ВЭЖХ антибиотика



цинкбацитрацина с предколонной дериватизацией ортофталевым альдегидом его производного в присутствии меркаптоэтанола // Вестник технологического университета. 2019. Т. 22, № 2. С. 10–13.

13. Injac R. D., Mlinaric A., Djordjevic-Milic V., Karljickovic-Rajic K., Strukelj B. Optimal Condition for determination of zinc bacitracin, polymyxin B, oxytetracycline and sulfacetamide in animal feed by micellar electrokinetic capillary chromatography // *Food Addit. Contam.* 2008. Vol. 25, № 04. С. 424–431.
14. Tao Y., Xie S., Zhu Y., Chen D., Pan Y., Wang X., Liu Z., Huang L., Peng D., Yuan Z. Analysis of major components of bacitracin, colistin and virginiamycin in feed using matrix solid-phase dispersion extraction by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. Sci.* 2018. Vol. 56, № 3. P. 285–291.
15. Моногарова О. В., Осколок К. В., Аняри В. В. Цветометрия в химическом анализе // *Журн. аналит. химии.* 2018. Т. 73, № 11. С. 857–867.
16. Shrivastava K., Monisha, Patel S., Thakur S. S., Shankar R. Food safety monitoring of the pesticide phenthoate using a smartphone-assisted paper-based sensor with bimetallic Cu@Ag core-shell nanoparticles // *Lab. Chip.* 2020. Vol. 20. P. 3996–4006.
17. Valek T., Valkova P., Pohanka M. Colorimetric method for the determination of proteins using immobilized microbial protease and a smartphone camera // *Anal. Letters.* 2021. Vol. 54. P. 1023–1037.
18. Calabria D., Mirasoli M., Guardigli M., Simoni P., Zangheri M., Severi P., Caliceti C., Roda A. Paper-based smartphone chemosensor for reflectometric on-site total polyphenols quantification in olive oil // *Sens. Actuators B: Chemical.* 2020. Vol. 305, № 127522.
19. Soares S., Fernandes G. M., Moraes L. M. B., Batista A. D., Rocha F. R. P. Single-phase determination of calcium and magnesium in biodiesel using smartphone-based digital images // *Fuel.* 2022. Vol. 307, № 121837.
5. Severino P., Silveira E. F., Vazzana M., Chaud M. V., Santana M. H. A., Souto E. B. Validation of an UV spectrophotometric assay for the quantification of polymyxin B in solid lipid nanoparticles. *Pharmazie*, 2015, vol. 70, pp. 693–697.
6. Elimam M. M., Shantier S. W., Gadkariem E. A., Mohamed M. A. Derivative spectrophotometric methods for the analysis and stability studies of colistin sulphate. *J. Chem.*, 2015, vol. 2015, no. 624316, pp. 1–5.
7. Castilhos J. K., Dillenburg T. L., Antunes M. V., Scribel L., Zavascki A. P., Linden R., Verza S. G. Evaluation of the stability of polymyxin B in saline and glucose solutions using LC-MS/MS. *Braz. J. Pharm. Sci.*, 2020, vol. 56, no. e18367.
8. Suleiman S. A., Song F., Su M.-X., Hang T.-J., Song M. Analysis of bacitracin and its related substances by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Anal.*, 2017, vol. 7, no. 1, pp. 48–55.
9. Yuan H., Yu S., Chai G., Liu J., Zhou Q. A LC-MS/MS method for simultaneous analysis of the cystic fibrosis therapeutic drugs colistin, ivacaftor and ciprofloxacin. *J. Pharm. Anal.*, 2017, vol. 7, no. 1, pp. 48–55.
10. Timofeeva A. V., Serebryakova M. V., Baratova L. A., Katruha G. S. Express analysis of antibiotics of the peptide group on a Milichrome A-02 microcolumn chromatograph. *Biotehnologiya*, 2009, vol. 1, pp. 90–95 (in Russian).
11. Hajrullin D. D., Galyautdinova G. G., Bosyakov V. I., Shangaraev N. G., Egorov V. I. Identification of feed antibiotic zincbacitracin by HPLC. *Uchenye zapiski KGAVM im. N. E. Baumana*, 2017, vol. 4. Available at: <https://cyberleninka.ru/article/n/identifikatsiya-kormovogo-antibiotika-tsinkbatsitratsina-metodom-vezhh> (accessed March 26, 2023) (in Russian).
12. Gurevich P. A., Galyautdinova G. G., Bosyakov V. I., Egorov V. I., Sajfutdinov A. M. Fluorimetric HPLC determination of the antibiotic zincbacitracin with pre-column derivatization of its derivative with orthophthalaldehyde in the presence of mercaptoethanol. *Herald of Technological University*, 2019, vol. 22, no. 2, pp. 10–13 (in Russian).
13. Injac R. D., Mlinaric A., Djordjevic-Milic V., Karljickovic-Rajic K., Strukelj B. Optimal Condition for determination of zinc bacitracin, polymyxin B, oxytetracycline and sulfacetamide in animal feed by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Food Addit. Contam.*, 2008, vol. 25, no. 04, pp. 424–431.
14. Tao Y., Xie S., Zhu Y., Chen D., Pan Y., Wang X., Liu Z., Huang L., Peng D., Yuan Z. Analysis of major components of bacitracin, colistin and virginiamycin in feed using matrix solid-phase dispersion extraction by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. Sci.*, 2018, vol. 56, no. 3, pp. 285–291.

## References

1. *State Pharmacopoeia of the Russian Federation.* XIV ed. Vol. III. Moscow, FEML, 2018. 1926 p. (in Russian).
2. *State Pharmacopoeia of the Russian Federation.* XIV ed. Vol. I. Moscow, FEML, 2018. 1814 p. (in Russian).
3. GOST R 52249-2009. *Good manufacturing practice for medicinal products (GMP).* Moscow, Standartinform, 2010. 139 p. (in Russian).
4. Krzek J., Piotrowska J. Spectrophotometric determination of bacitracin in bulk drug as dabsyl derivative in a range of visible light. *Acta Pol. Pharm.*, 2011, vol. 68, no. 6, pp. 853–858.



15. Monogarova O. V., Oskolok K. V., Apyari V. V. Colorimetry in chemical analysis. *Journal of Analytical Chemistry*, 2018, vol. 73, no. 11, pp. 857–867 (in Russian).
16. Shrivastava K., Monisha, Patel S., Thakur S.S., Shankar R. Food safety monitoring of the pesticide phenthoate using a smartphone-assisted paper-based sensor with bimetallic Cu@Ag core-shell nanoparticles. *Lab. Chip.*, 2020, vol. 20, pp. 3996–4006.
17. Valek T., Valkova P., Pohanka M. Colorimetric method for the determination of proteins using immobilized microbial protease and a smartphone camera. *Anal. Letters*, 2021, vol. 54, pp. 1023–1037.
18. Calabria D., Mirasoli M., Guardigli M., Simoni P., Zangheri M., Severi P., Caliceti C., Roda A. Paper-based smartphone chemosensor for reflectometric on-site total polyphenols quantification in olive oil. *Sens. Actuators B: Chemical*, 2020, vol. 305, no. 127522.
19. Soares S., Fernandes G. M., Moraes L. M. B., Batista A. D., Rocha F. R. P. Single-phase determination of calcium and magnesium in biodiesel using smartphone-based digital images. *Fuel*, 2022, vol. 307, no. 121837.

Поступила в редакцию 12.04.2023; одобрена после рецензирования 10.05.2023; принята к публикации 23.05.2023  
The article was submitted 12.04.2023; approved after reviewing 10.05.2023; accepted for publication 23.05.2023



Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 3. С. 262–271

*Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2023, vol. 23, iss. 3, pp. 262–271

<https://ichbe.sgu.ru>

<https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-3-262-271>, EDN: ZBGFPU

Научная статья

УДК 543.42.063

## Аналитические реакции 2,4-динитрофенилгидразина с некоторыми альдегидами в мицеллах катионных ПАВ



Т. А. Соколова, А. А. Бурмистрова, С. Ю. Доронин ✉

Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Россия, 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, д. 83

Соколова Татьяна Алексеевна, аспирант 3-го года обучения кафедры аналитической химии и химической экологии Института химии, [tata.sokolova-95@yandex.ru](mailto:tata.sokolova-95@yandex.ru), <https://orcid.org/0009-0004-5785-9403>

Бурмистрова Анна Алексеевна, кандидат химических наук, ведущий инженер испытательной лаборатории Института химии, [BurmistrovaAA@mail.ru](mailto:BurmistrovaAA@mail.ru), <https://orcid.org/0009-0005-0652-3333>

Доронин Сергей Юрьевич, доктор химических наук, профессор, профессор кафедры аналитической химии и химической экологии Института химии, [doroninsu@mail.ru](mailto:doroninsu@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0002-1115-1360>

**Аннотация.** Установлен аналитический эффект влияния мицелл катионных поверхностно-активных веществ (ПАВ) в реакциях некоторых ароматических альдегидов (АА) с 2,4-динитрофенилгидразином (ДНФГ) с образованием соответствующих аци-форм гидразонов. Установлено, что аналитически значимые эффекты мицеллы неионных и анионных ПАВ в исследованной системе не вызывают. Определены аналитические характеристики систем ДНФГ – АА – катионный ПАВ (молярные коэффициенты поглощения ( $\epsilon$ ), диапазоны определяемых содержаний (ДОС), пределы обнаружения), на примере бензальдегида и его нитро-, сульфо-, хлор-, диметиламино- и метоксипроизводных, а также *p*-диметиламинокоричного альдегида (ДМАКА). Для большинства альдегидов ДОС находятся в интервале от 0,2 до 2,1 мкг/мл,  $\epsilon$  от  $2 \cdot 10^{-4}$  до  $1 \cdot 10^{-5}$  л·моль<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>. Синтезирован гидразон, образованный ДНФГ и ДМАКА, осуществлена его идентификация элементным анализом и ИК-спектроскопически. Исследована растворимость полученного гидразона в водной (рН 13) и мицеллярной (цетилпиридиний хлорид (ЦПХ)) средах. Показано, что в мицеллах ЦПХ растворимость его возрастает приблизительно в 60 раз, что приводит к стабилизации исследованной системы ДНФГ – АА – катионный ПАВ во времени (ее изотропности) и увеличению чувствительности определения соответствующего альдегида в отсутствие летучих и токсичных органических растворителей, при этом реализован принцип «зеленой химии». Установленный эффект катионных ПАВ реализован для разработки методики безэкстракционного фотометрического определения стрептомицина (антибиотика группы аминогликозидов широкого спектра действия, эффективного против туберкулеза) в фармацевтических препаратах с ДОС от 2,1 до 87,4 мкг/мл. Погрешность прямого фотометрического определения стрептомицина не превышала 5–9%.

**Ключевые слова:** ароматические альдегиды, 2,4-динитрофенилгидразин, поверхностно-активные вещества, стрептомицин, мицеллярная экстракция

**Для цитирования:** Соколова Т. А., Бурмистрова А. А., Доронин С. Ю. Аналитические реакции 2,4-динитрофенилгидразина с некоторыми альдегидами в мицеллах катионных ПАВ // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 3. С. 262–271. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-3-262-271>, EDN: ZBGFPU

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0)

Article

### Analytical reactions of 2,4-dinitrophenylhydrazine with some aldehydes in micelles of cationic surfactants

T. A. Sokolova, A. A. Burmistrova, S. Yu. Doronin ✉

Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia

Tatiana A. Sokolova, [tata.sokolova-95@yandex.ru](mailto:tata.sokolova-95@yandex.ru), <https://orcid.org/0009-0004-5785-9403>

Anna A. Burmistrova, [BurmistrovaAA@mail.ru](mailto:BurmistrovaAA@mail.ru), <https://orcid.org/0009-0005-0652-3333>

Sergey Yu. Doronin, [doroninsu@mail.ru](mailto:doroninsu@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0002-1115-1360>

**Abstract.** The analytical effect of micelles of cationic surfactants in the reactions of some aromatic aldehydes (AA) with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) with the formation of the corresponding aci-forms of hydrazones has been established. It has been established that micelles of nonionic and anionic surfactants do not cause analytically significant effects in the system under study. Analytical characteristics of systems DNPH–AA–cationic surfactant (molar absorption coefficients ( $\epsilon$ ), ranges of determined contents, limits of detection) were determined, using the example of benzaldehyde and its nitro-, sulfo-, chlorine-, dimethylamino- and methoxy derivatives, as well as *p*-dimethylaminocinnamic aldehyde (DMAC).



For the majority of aldehydes ranges of determined contents are in the range from 0,2 to 2,1  $\mu\text{g/ml}$ ,  $\epsilon$  from  $2 \cdot 10^{-4}$  to  $1 \cdot 10^{-5} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . The hydrazone formed by DNPH and DMAC was synthesized and identified by elemental analysis and IR spectroscopically. The solubility of the resulting hydrazone in aqueous (pH 13) and micellar (cetylpyridinium chloride, CPC) media was studied. It has been shown that its solubility in CPC micelles increases approximately 60 times, which leads to the stabilization of the studied system DNPH – AA – cationic surfactant in time (its isotropy) and an increase in the sensitivity of the determination of the corresponding aldehyde in the absence of volatile and toxic organic solvents, while the principle "green chemistry" has been implemented. The established effect of cationic surfactants was implemented to develop a method for the non-extraction photometric determination of streptomycin (a broad-spectrum aminoglycoside antibiotic effective against tuberculosis) in pharmaceutical preparations with ranges of determined contents from 2,1 to 87,4  $\mu\text{g/ml}$ . The error of direct photometric determination of streptomycin did not exceed 5–9%.

**Keywords:** aromatic aldehydes, 2,4-dinitrophenylhydrazine, surfactants, streptomycin, micellar extraction

**For citation:** Sokolova T. A., Burmistrova A. A., Doronin S. Yu. Analytical reactions of 2,4-dinitrophenylhydrazine with some aldehydes in micelles of cationic surfactants. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2023, vol. 23, iss. 3, pp. 262–271 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-3-262-271>, EDN: ZBGFPU

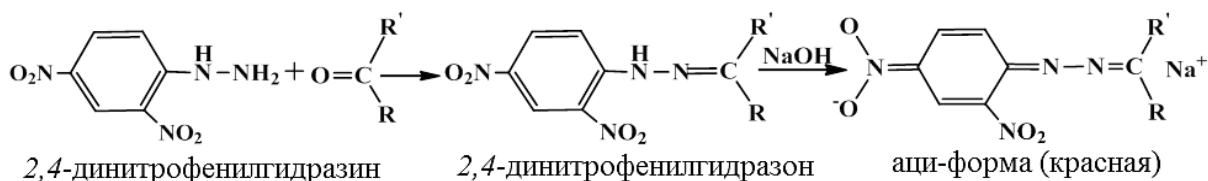
This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC-BY 4.0)

## Введение

Ароматические альдегиды (АА) являются бесцветными жидкостями или кристаллическими веществами с приятным ароматом, наиболее часто применяются в органическом синтезе, производстве трифенилметановых красителей, лекарственной и парфюмерной промышленности [1]. Большинство альдегидов оказывают раздражающее действие на слизистую оболочку глаз и верхних дыхательных путей, вредно влияют на нервную систему. Актуальной аналитической задачей является разработка высокочувствительных и простых безэкстракционных

фотометрических способов определения ароматических альдегидов в различных объектах.

В фотометрическом анализе карбонильных соединений применяют реакции образования аци-форм нитросоединений [2]. В качестве реагента рекомендуют 2,4-динитрофенилгидразин (ДНФГ). Преимуществом динитрофенилгидразинового способа является его высокая специфичность по отношению к карбонильным соединениям. Несмотря на то что ДНФГ представляет собой основание, неспособное существовать в аци-форме, соответствующие ему гидразоны под влиянием щелочей превращаются в интенсивно окрашенные аци-соли:



Реакции такого типа имеют ряд недостатков: применение в качестве среды токсичных растворителей (метанол, бензол и др.); кипячение растворов, в ряде случаев, в течение 3 ч; необходимость проведения жидкостно-жидкостной экстракции для концентрирования гидразонов и снижения пределов обнаружения альдегидов.

Одним из эффективных способов улучшения метрологических характеристик фотометрических реакций органических реагентов является замена органических сред токсичных растворителей на мицеллярные, введением в системы поверхностно-активных веществ (ПАВ) [3]. Такой подход ранее применен нами для реакций конденсации первичных ароматических аминов с некоторыми ароматическими альдегидами. Влияние мицелл ПАВ в таких системах приводило к снижению пределов

обнаружения ариламинов на 1-2 порядка [4–11].

Влияние мицелл ПАВ на аналитические характеристики реакций АА с ДНФГ мало изучено. Имеются лишь единичные работы по влиянию ПАВ на скорость и метрологические характеристики реакций конденсации АА с гидразином [12–14] и фенилгидразином [14]. В связи с этим целью настоящей работы явилось исследование влияния мицелл различных ПАВ на аналитические характеристики систем АА – ДНФГ.

## Материалы и методы

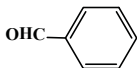
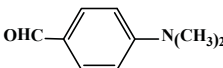
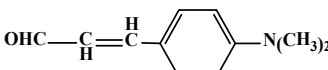
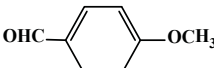
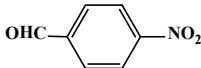
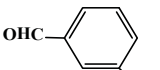
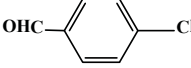
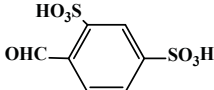
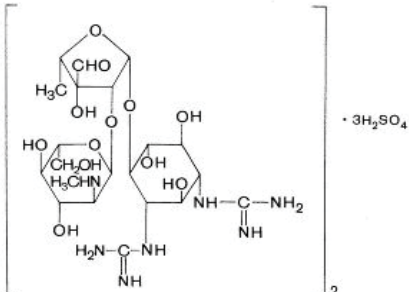
В качестве основного органического реагента применяли 2,4-динитрофенилгидразин, ч. (ГУ-6-09-2394-72), перекристаллизованный из *n*-бутанола. В табл. 1 представлены объекты исследования – бензальдегид и его производные.





Таблица 1 / Table 1

Исследуемые ароматические альдегиды  
Investigated aromatic aldehydes

№	Альдегид / Aldehyde	Формула / Formula	Mr
1	Бензальдегид Benzaldehyde		106,12
2	<i>n</i> -Диметиламинобензальдегид <i>p</i> -Dimethylaminobenzaldehyde		149,19
3	<i>n</i> -Диметиламинокоричный альдегид <i>p</i> -Dimethylaminocinnamaldehyde		176,16
4	Анисовый альдегид Anisaldehyde		136,15
5	<i>n</i> -Нитробензальдегид <i>p</i> -Nitrobenzaldehyde		151,13
6	<i>m</i> -Нитробензальдегид <i>m</i> -Nitrobenzaldehyde		151,13
7	<i>n</i> -Хлорбензальдегид <i>p</i> -Chlorobenzaldehyde		186,5
8	2,4-Дисульфобензальдегид 2,4-Disulfobenzaldehyde		262,12
9	Стрептомицин Streptomycin		581,57

Все альдегиды предварительно перекристаллизовывали из водно-этанольного раствора реактива до постоянной температуры плавления согласно [15], кроме анисового и бензальдегида. Последние применяли свежеперегнанные. Стрептомицина сульфат (фармацевтический препарат) дополнительно не очищали.

В качестве катионных ПАВ применяли моногидрат цетилпиридиния хлорида (ЦПХ), чда,  $C_{21}H_{38}NCl \cdot H_2O$  и цетилтриметиламмония бромид (ЦТМА),  $C_{12}H_{47}NBr$ , чда. Для поддер-

жания постоянного значения pH применяли боратные буферные растворы.

Электронные спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Shimadzu UV-1800, ИК-спектры – на фурье-спектрофотометре ФСМ 1201 ООО «Мониторинг» в гексахлорбутадие (4000–1800, 1500–1300  $cm^{-1}$ ) и вазелиновом масле (1300–400  $cm^{-1}$ ). Дериватограммы получали на дериватографе ОД-103 в интервале температур 0–1000°C в атмосфере воздуха. Скорость нагревания 10°C/мин. Значения pH контролировали на pH-метрах «pH-121», «pH-673».



Синтез гидразона из ДНФГ и *n*-диметиламинокоричного альдегида.

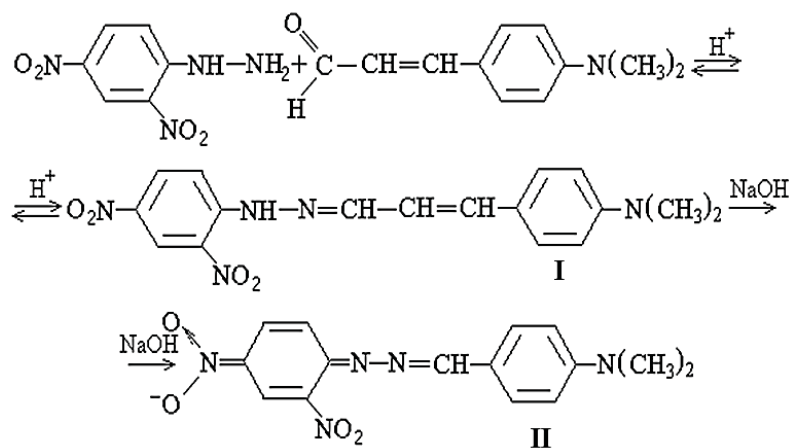
Навеску (0,0277 г) ДНФГ растворяли в колбе на 500 мл дистиллированной водой при нагревании. Раствор подкисляли конц. HCl до pH  $\approx$  1. Аналогично растворяли *n*-диметиламинокоричный альдегид в количестве 0,0492 г. Горячие растворы реагентов смешивали и нагревали при температуре 80–90°C до полной коагуляции осадка. Реакционную смесь тщательно перемешивали стеклянной палочкой. После охлаждения реакционной смеси образовавшийся осадок отфильтровывали и промывали дистиллированной водой. Отсутствие хлоридов в фильтрате определяли

по реакции с нитратом серебра. Полученный гидразон высушивали при температуре 110°C до постоянной массы. Выход продукта составил 70% от теоретически рассчитанного.

### Результаты и их обсуждение

Выбор представленных в табл. 2 альдегидов обусловлен различным положением (*o*-, *m*-, *p*-) и природой заместителей в ароматическом кольце с целью дальнейшего сопоставления и прогнозирования оптимальных условий реакций.

Исследование влияния различных типов ПАВ осуществляли на примере модельной системы 2,4-динитрофенилгидразин – *n*-диметиламинокоричный альдегид (ДМАКА):



Как видно из схемы, реакция протекает в две основные стадии. На первой стадии в кислой среде осуществляется конденсация реагента с карбонильным соединением с образованием малорастворимого в воде гидразона. На второй стадии, в щелочной среде, образуется аци-форма соответствующего гидразона, растворимость которой в воде увеличивается, но незначительно.

Известно [2], что малорастворимые в воде 2,4-динитрофенилгидразоны в фотометрическом анализе карбонильных соединений получают в среде метанола, этанола и других органических растворителей, и для увеличения их растворимости проводят экстракцию бензолом или петролейным эфиром.

Для увеличения растворимости гидразонов в водной среде нами исследовано солюбилирующее действие мицелл ПАВ различных типов. Так, при введении мицелл анионных ПАВ (додецилсульфат натрия) в исследованную систему существенного изменения растворимо-

сти образующегося на первой стадии реакции гидразона (I) не наблюдалось. После добавления щелочи и образования аци-формы (II), растворимость ее также увеличивалась незначительно, так как анионные ПАВ имеют одноименный заряд, что и нитро-группа гидразона. Поэтому происходит электростатическое отталкивание одинаково заряженных фрагментов молекул, что позволяет предполагать отсутствие взаимодействия между данными реагентами.

В мицеллах неионных ПАВ (ОП-10) растворимость (I) также практически не изменялась в течение 5–6 ч, лишь в присутствии мицеллярных концентраций катионных ПАВ (ЦПХ) наблюдалось полное растворение гидразона (I) в виде его аци-формы (II). Образовавшиеся при этом растворы гомогенны и устойчивы в течение нескольких часов. Рассмотрено влияние на модельную реакцию двух представителей катионных ПАВ: цетилпиридиния хлорида и цетилтриметиламмония бромида (рис. 1, а, б).

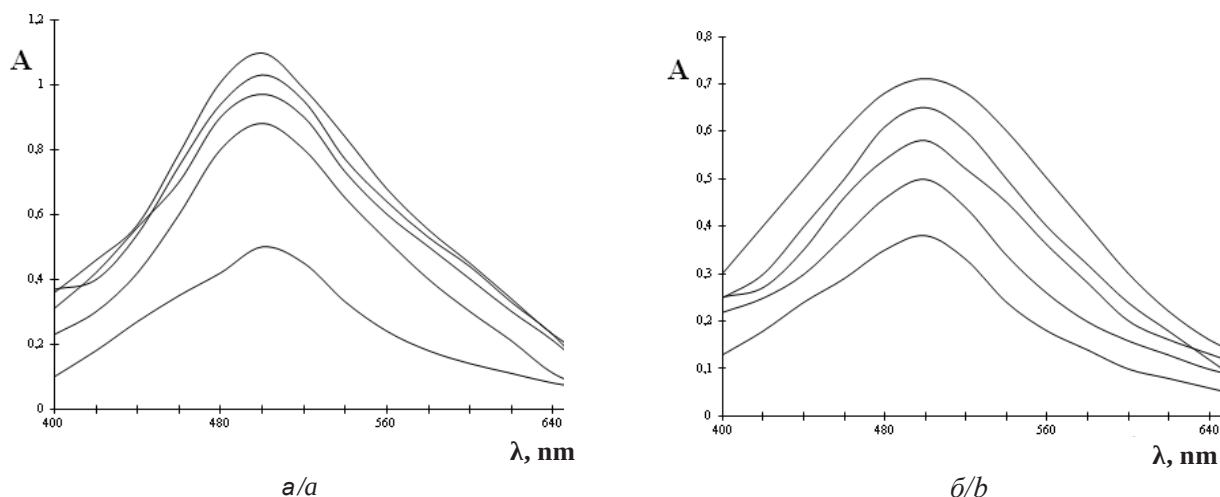


Рис. 1. Спектры поглощения системы ДНФГ–ДМАКА–ПАВ при различных концентрациях ЦПХ (а) и ЦТМА (б).  $c_{\text{ДМАКА}} = 1 \cdot 10^{-5}$  М;  $c_{\text{ДНФГ}} = 1 \cdot 10^{-4}$  М;  $l=1$  см, раствор сравнения – боратный буферный раствор (рН 13).  $c_{\text{ПАВ}}$ : 1 –  $1 \cdot 10^{-4}$  М; 2 –  $2 \cdot 10^{-4}$  М; 3 –  $4 \cdot 10^{-4}$  М; 4 –  $6 \cdot 10^{-4}$  М; 5 –  $8 \cdot 10^{-4}$  М

Fig. 1. Absorption spectra of the DNPН–DMAC – surfactant system at different concentrations of CPC (a) and CTMA (b).  $c_{\text{DMAC}} = 1 \cdot 10^{-5}$  М;  $c_{\text{DNPН}} = 1 \cdot 10^{-4}$  М;  $l=1$  cm, the reference solution is a borate buffer solution (pH 13).  $c_{\text{surfactant}}$ : 1 –  $1 \cdot 10^{-4}$  М; 2 –  $2 \cdot 10^{-4}$  М; 3 –  $4 \cdot 10^{-4}$  М; 4 –  $6 \cdot 10^{-4}$  М; 5 –  $8 \cdot 10^{-4}$  М

Как видно из рис. 1, оба представителя катионных ПАВ дают положительный эффект, однако интенсивность поглощения соответствующей аци-формы гидразона ( $\lambda_{\text{макс}} = 500$  нм) в мицеллах ЦПХ выше, чем в мицеллах ЦТМА, что связано с большей гидрофобностью ЦПХ за счет пиридинового кольца. В связи с этим для дальнейших исследований в качестве катионного ПАВ был выбран цетилпиридиний хлорид.

Для установления оптимальных условий реакции ДНФГ с некоторыми альдегидами (см. табл. 2) варьировали рН, концентрации реагента, ЦПХ, температуру и порядок смешивания растворов. Установлено универсальное действие мицелл ЦПХ во всех исследуемых системах независимо от природы и положения заместителя в ароматическом кольце при оптимальных условиях: рН 13;  $c(\text{ДНФГ}) = 4 \cdot 10^{-4}$  М;  $c(\text{ЦПХ}) = 6 \cdot 10^{-4}$  М; температура – 20–25°C; порядок смешивания: ДНФГ – АА – ЦПХ – буферный раствор.

Положение максимумов светопоглощения соответствующих аци-форм гидразонов приведены в табл. 2, которые варьируют в интервале 470 нм (бензальдегид) – 530 нм (*n*-нитробензальдегид).

Анализ данных табл. 3 показал, что предел обнаружения (ПрО) и диапазон определяемых содержаний (ДОС) практически для всех альдегидов находится в интервале 0,2–3,3 мкг/мл.

Лишь для ДМАКА предел обнаружения на порядок ниже, что можно объяснить наличием более длинной цепи сопряжения в образующемся гидразоне (I).

Синтезированный гидразон (I) исследовали термогравиметрически и ИК-спектроскопически. Установлено, что в его состав не входит как гигроскопическая, так и структурно-связанная вода, о чем свидетельствует широкая площадка на кривой ТГ до 200°C и отсутствие эндотермического эффекта удаления растворителя (воды) на кривой ДТА. Образец выгорает полностью (убыль массы 100%), что свидетельствует об отсутствии неорганических примесей.

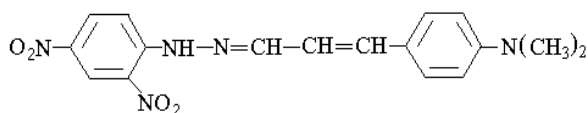
Анализ ИК-спектра гидразона (I) показал наличие характеристических полос в области 1600–1618  $\text{см}^{-1}$  азометиновой группировки  $>\text{C}=\text{N}-$ , а также полосы с частотой 3265  $\text{см}^{-1}$ , которая отвечает валентным колебаниям  $-\text{NH}-$  группы и свидетельствует в пользу принадлежности анализируемого продукта к гидразонам. Кроме того, в ИК-спектре гидразона (I) отсутствуют характерные для исходных веществ частоты альдегидной группы в области 1715–1695  $\text{см}^{-1}$  и  $\text{NH}_2$ -группы в области 3200–3500  $\text{см}^{-1}$ . Таким образом, проведенная идентификация синтезированного продукта позволила сделать вывод о том, что синтезированный гидразон отвечает формуле (I):



Таблица 2 / Table 2

**Некоторые аналитические характеристики систем АА – ДНФГ – ЦПХ**  
**Some analytical characteristics of the systems AA – DNPH – CPC**

№	Аналит Analyte	$\lambda_{\text{макс}}$ , нм $\lambda_{\text{max}}$ , nm	$\epsilon$ , л·моль <sup>-1</sup> ·см <sup>-1</sup> $\epsilon$ , l·m <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup>	ПрО, М LOD, М	ДОС, мкг/мл; Ranges of determined contents, µg/ml
1	Анисовый альдегид Anisaldehyde	470	$4,0 \cdot 10^4$	$1,6 \cdot 10^{-6}$	0,28–2,1
2	Бензальдегид Benzaldehyde	470	$2,1 \cdot 10^4$	$2,4 \cdot 10^{-6}$	0,25–1,4
3	<i>n</i> -Диметиламино- бензальдегид <i>p</i> -Dimethylamino-benzaldehyde	480	$2,0 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^{-6}$	0,18–2,1
4	<i>n</i> -Диметиламино- коричный альдегид <i>p</i> -Dimethylamino-cinnamaldehyde	500	$1,3 \cdot 10^5$	$3,9 \cdot 10^{-7}$	0,060–0,19
5	<i>n</i> -Нитробензальдегид <i>p</i> -Nitrobenzaldehyde	530	$2,0 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^{-6}$	0,18–1,9
6	<i>m</i> -Нитробензальдегид <i>m</i> -Nitrobenzaldehyde	470	$2,0 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^{-6}$	0,18 – 2,0
7	<i>n</i> -Хлорбензальдегид <i>p</i> -Chlorobenzaldehyde	470	$2,1 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^{-6}$	0,20–2,1
8	2,4-Дисульфо-бензальдегид 2,4-Disulfobenzaldehyde	480	$1,9 \cdot 10^4$	$1,3 \cdot 10^{-6}$	0,28–2,3
9	Стрептомицин Streptomycin	430	$2,9 \cdot 10^4$	$7,0 \cdot 10^{-7}$	2,1– 87



Растворимость гидразона (I) определяли методом изотермического насыщения, которая составила для водной среды  $4 \cdot 10^{-7}$  М ( $7,05 \cdot 10^{-5}$  г/л) и  $2,5 \cdot 10^{-5}$  М ( $4,4 \cdot 10^{-3}$  г/л) для мицеллярной (ЦПХ). Растворимость гидразона при переходе от водной среды к мицеллярной увеличивается примерно в 60 раз, что приводит к стабилизации фотометрируемых растворов в течение более 5 ч.

Эффект, вызываемый мицеллами ЦПХ в реакциях образования гидразонов из АА и ДНФГ, применен для разработки методики определения стрептомицина в фармпрепаратах.

**Количественное определение стрептомицина в фармпрепаратах.** Ввиду того что препараты стрептомицина в ряде случаев содержат биологически неактивные продукты его распада с такими же функциональными группами, а также ряд примесей с подобными группировками, которые могут привести к различным токсическим и аллергическим ре-

акциям, таким как лекарственная лихорадка, дерматит, головокружение, сердцебиение и т.д., специфичность метода анализа, позволяющего определять только стрептомицин в присутствии продуктов его разложения и примесей, приобретает первостепенное значение. В реакции участвует карбонильная группа стрептозной части молекулы.

Нами предложен безэкстракционный фотометрический метод определения стрептомицина, основанный на реакции конденсации ДНФГ в мицеллах катионных ПАВ. Предварительно зарегистрированы спектры поглощения системы стрептомицин – ДНФГ – ЦПХ (рис. 2). Как видно из рис. 2, в спектре наблюдаются интенсивная полоса поглощения с  $\lambda_{\text{макс}} = 430$  нм и менее интенсивная при  $\lambda_{\text{макс}} = 510$  нм, которая соответствует переходу гидразона в аци-форму. Для построения градуировочных характеристик применяли обе рабочие длины волн.

Исследована зависимость  $A_{\text{макс}}$  – время кипячения раствора стрептомицина с ДНФГ (рис. 3). Равновесие в исследуемой системе достигается спустя 40 мин кипячения. Проводить определение стрептомицина в равновесных

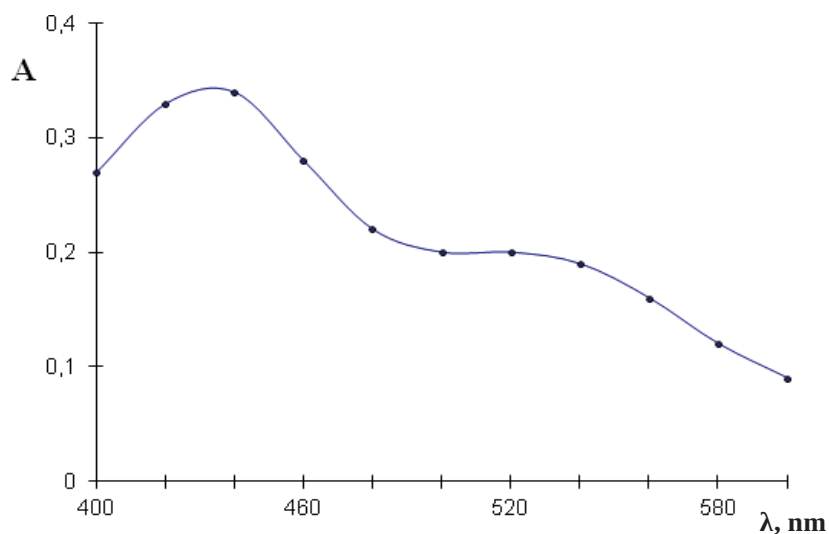


Рис. 2. Спектр поглощения системы стрептомицин – ДНФГ – ЦПХ.  $c_{\text{ДНФГ}} = 4 \cdot 10^{-4}$  М;  $c_{\text{ЦПХ}} = 6 \cdot 10^{-4}$  М;  $l = 1$  см; pH 13

Fig. 2. Absorption spectrum of the streptomycin – DNPH – CPC system.  $c_{\text{DNPH}} = 4 \cdot 10^{-4}$  М;  $c_{\text{CPC}} = 6 \cdot 10^{-4}$  М;  $l = 1$  см; pH 13

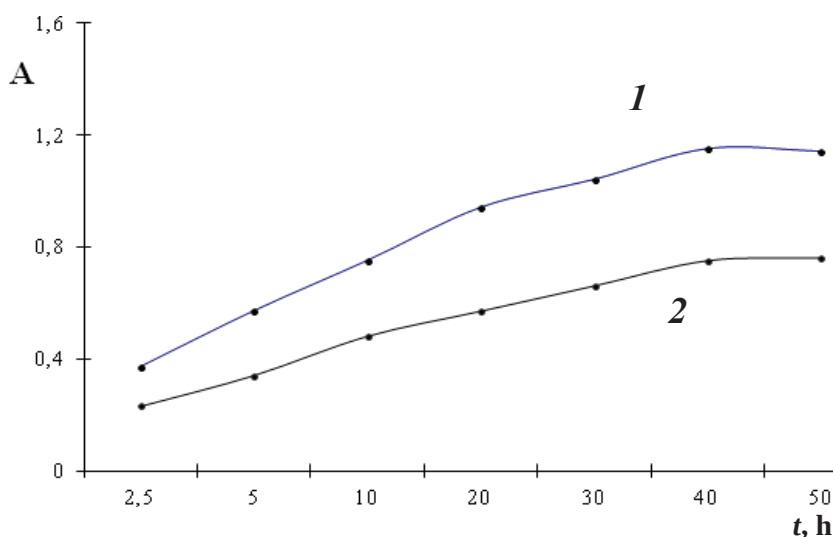


Рис. 3. Зависимость А от  $t_{\text{кипячения}}$  растворов стрептомицина ( $1 \cdot 10^{-5}$  М) и ДНФГ ( $1 \cdot 10^{-4}$  М);  $c_{\text{ЦПХ}} = 5 \cdot 10^{-4}$  М; pH 13: 1 – 430 нм, 2 – 510 нм

Fig. 3. Dependence of a on the boiling point of streptomycin solutions ( $1 \cdot 10^{-5}$  М) and DNPH ( $1 \cdot 10^{-4}$  М);  $c_{\text{CPC}} = 5 \cdot 10^{-4}$  М; pH 13: 1 – 430 nm, 2 – 510 nm

условиях (40 мин кипячения) нецелесообразно. Поэтому нами предложена методика его определения, в неравновесных условиях спустя 10 мин кипячения, так как за это время достигается период полупревращения исходного препарата.

*Построение градуировочной характеристики.*

Из исходного раствора стрептомицина готовили рабочие растворы с концентрациями

$1 \cdot 10^{-6}$ ,  $2 \cdot 10^{-6}$ ,  $4 \cdot 10^{-6}$ ,  $6 \cdot 10^{-6}$ ,  $8 \cdot 10^{-6}$ ,  $2 \cdot 10^{-5}$ ,  $4 \cdot 10^{-5}$ ,  $6 \cdot 10^{-5}$  и  $8 \cdot 10^{-5}$  М, добавляли по 0,4 мл ДНФГ ( $1 \cdot 10^{-2}$  М); 0,6 мл ЦПХ ( $1 \cdot 10^{-2}$  М) и нагревали в кипящей водяной бане 10 мин, в том числе и раствор сравнения, не содержащий стрептомицина. После охлаждения доводили общий объем раствора до 10 мл боратым буферным раствором (pH 13).



Методом наименьших квадратов установлено, что градуировочные характеристики описываются линейными уравнениями вида  $y = 0,045 \pm 2,9 \cdot 10^{-4} \cdot c$  ( $\lambda_{\text{макс}} = 430$  нм) и  $y = 0,056 \pm 1,39 \cdot 10^{-4} \cdot c$  ( $\lambda_{\text{макс}} = 510$  нм). Коэффициенты корреляции составили 0,996 и 0,994 соответственно (рис. 4).

Предел обнаружения для стрептомицина составил  $7,0 \cdot 10^{-7}$  М, что ниже на порядок, чем в

известных в литературе методиках [16], ДОС – (2,1–87,4) мкг/мл.

Правильность результатов анализа контролировали методом «введено-найдено». Для этого из исходного раствора стрептомицина готовили по 3 серии рабочих растворов с концентрациями  $6 \cdot 10^{-6}$  и  $3 \cdot 10^{-5}$  М соответственно и добавляли реактивы, как указано ниже в методике определения стрептомицина (табл. 3).

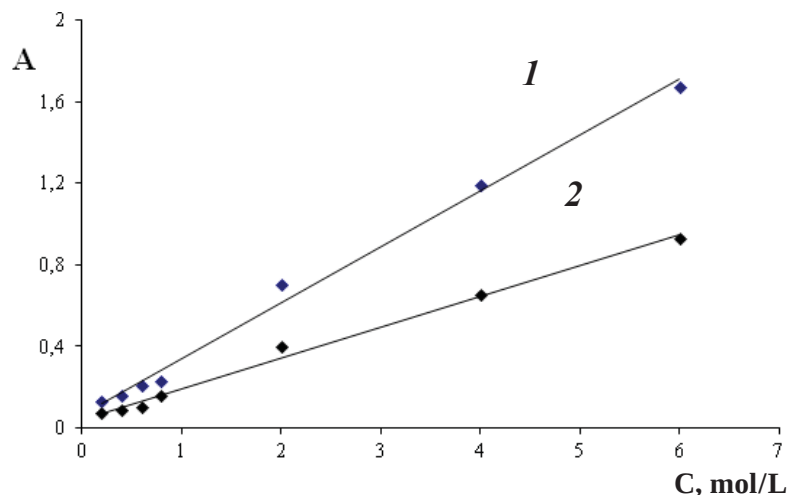


Рис. 4. Зависимость А – с(стрептомицина),  $c_{\text{ДНФГ}} = 4 \cdot 10^{-4}$  М;  $c_{\text{ЦПХ}} = 6 \cdot 10^{-4}$  М; 1 – 430 нм, 2 – 510 нм.  $l = 1$  см

Fig. 4. Dependence A – c(streptomycin),  $c_{\text{ДНФГ}} = 4 \cdot 10^{-4}$  М;  $c_{\text{СРХ}} = 6 \cdot 10^{-4}$  М; 1 – 430 нм, 2 – 510 нм.  $l = 1$  см

Таблица 3 / Table 3

**Результаты оценки правильности определения стрептомицина  
в модельной смеси ( $n = 3$ ,  $P = 0,95$ )**

**Results of the evaluation of the correctness of the determination of streptomycin in the model mixture  
( $n = 3$ ,  $P = 0.95$ )**

Введено, мкг/мл Introduced, $\mu\text{g/ml}$	Найдено, мкг/мл Found, $\mu\text{g/ml}$		S		$X \pm \Delta X$	
	430 нм	510 нм	430 нм	510 нм	430 нм	510 нм
44	44,8 44,4 44,8	46,5 46,4 46,5	0,124	0,34	$44,6 \pm 0,6$	$46,4 \pm 0,9$
8,7	8,73 8,80 8,60	9,00 9,20 9,30	0,070	0,090	$8,7 \pm 0,2$	$9,2 \pm 0,2$

**Методика определения стрептомицина.** К анализируемому образцу, содержащему (2,1–87,4) мкг/мл стрептомицина, добавляют 0,4 мл ДНФГ ( $1 \cdot 10^{-2}$  М); 0,6 мл ЦПХ ( $1 \cdot 10^{-2}$  М), нагревают 10 мин на кипящей водяной бане, в том числе и раствор сравнения. Затем доводят

до 10 мл общий объем боратым буферным раствором (рН 13) и регистрируют оптическую плотность относительно раствора сравнения ( $l = 1$  см;  $\lambda_{\text{макс}} = 430$  нм). Концентрацию стрептомицина определяют по предварительно построенному градуировочному графику.



## Выводы

Таким образом, разработанная методика безэкстракционного фотометрического определения стрептомицина в фармпрепаратах отличается высокой чувствительностью. Проведение реакции в водных растворах ЦПХ позволило исключить токсичные растворители, погрешность определения при этом не превысила 5–9%.

## Список литературы

1. Нейланд О. Я. Органическая химия: учебник для хим. спец. вузов. М.: Высш. шк., 1990. 751 с.
2. Коренман И. М. Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений. М.: Химия, 1970. 343 с.
3. Чернова Р. К., Доронин С. Ю. Определение органических аналитов в растворах ПАВ: ионные и мицеллярные эффекты. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2017. 200 с.
4. Соколова Т. А., Доронин С. Ю. Фотометрическое определение новокаина с предварительным концентрированием мицеллами ПАВ // Журн. аналит. химии. 2022. Т. 77, № 8. С. 714–720. <https://doi.org/10.31857/S0044450222080151>
5. Доронин С. Ю., Чернова Р. К., Гусакова Н. Н. Аналитические возможности реакций первичных ароматических аминов с *p*-диметиламинокоричным альдегидом в присутствии ионов и мицелл ПАВ // Журн. аналит. химии. 2005. Т. 60, № 5. С. 471–478. <https://doi.org/10.1007/s10809-005-0111-0>.
6. Доронин С. Ю., Чернова Р. К., Гусакова Н. Н. *p*-Диметиламинокоричный альдегид как фотометрический реагент на первичные ароматические амины // Журн. аналит. химии. 2004. Т. 59, № 4. С. 377–387. 10.1023/B:JANС.0000022785.47370.4с.
7. Доронин С. Ю., Чернова Р. К., Гусакова Н. Н. Влияние ионов и мицелл ПАВ на физико-химические характеристики систем: первичные ароматические амины – альдегиды // Изв. вузов. Химия и хим. технол. 2004. Т. 47, вып. 2. С. 55–60.
8. Доронин С. Ю., Чернова Р. К., Гусакова Н. Н. Конденсация (диметиламино)коричного альдегида с анилином и его замещенными в мицеллярных средах // Журн. общ. химии. 2005. Т. 75, вып. 2. С. 288–294. <https://doi.org/10.1007/s11176-005-0210-5>
9. Доронин С. Ю., Чернова Р. К., Гусакова Н. Н. Фотометрический анализ парацетамола на содержание примеси *p*-аминофенола // Фармация. 2001. № 3. С. 35–37.
10. Доронин С. Ю., Гусакова Н. Н., Чернова Р. К. Тест-метод определения анилина в воздухе // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2002. Т. 68, № 7. С. 7–10.
11. Чернова Р. К., Гусакова Н. Н., Еременко С. Н., Доронин С. Ю. Фотометрическое определение анилина

и его монокитропроизводных с *p*-диметиламинокоричным альдегидом // Изв. вузов. Химия и хим. технология. 1996. Т. 39, № 6. С. 33–35.

12. Яцимирский А. К., Яцимирская Н. Г., Кривова С. Б. Конденсация *p*-ДМАБА с гидразином в мицеллярной среде // Журн. общ. химии. 1992. Т. 62, вып. 4. С. 916–922.
13. Кривова С. Б., Митякина М. Г., Яцимирская Н. Т., Осипов А. К. Кинетические методы определения бензидаина с *p*-диметиламинобензальдегидом в присутствии мицелл додецилсульфата натрия // Вестн. МГУ, Сер. 2. 1991. Т. 32, № 4. С. 367–372.
14. Yatsimirsky A. K., Yatsimirskaya N. T., Kashina S. Micellar catalysis and product stabilization in hydrazone formation reactions and micellar-modified determination of hydrazine and phenylhydrazine // Anal. Chem. 1994. Vol. 66, № 14. P. 2232–2239.
15. Гордон А., Форд П. Спутник химика. Физико-химические свойства, методики, библиография / пер. с англ. М.: Мир, 1976. 542 с.
16. Vaikosen E. N., Ebeshi B. U., Worlu C. R. Spectroscopic fingerprinting of aminoglycosides and determination of neomycin sulphate through oxidative ion-pair complex formation using ammonium molybdate // Current Pharmaceutical Analysis. 2019. Vol. 15, № 5. P. 487–496. <https://doi.org/10.2174/1573412914666180502124906>

## References

1. Neyland O. Ya. *Organicheskaya khimiya: uchebnik dlya khimicheskikh spetsial'nostei vuzov* [Organic Chemistry: textbook for chemical specialties of universities]. Moscow, Vysshaya shkola, 1990. 751 p.
2. Korenman I. M. *Fotometricheskii analiz. Metody opredeleniya organicheskikh soyedineniy* [Photometric analysis. Methods for the determination of organic compounds]. Moscow, Chemistry, 1970. 343 p. (in Russian).
3. Chernova R. K., Doronin S. Yu. *Opredeleniye organicheskikh analitov v rastvorakh PAV: ionnyye i mitsellyarnyye efekty* [Determination of organic analytes in surfactant solutions: Ionic and micellar effects]. Saratov, Saratov State University Publ., 2017. 200 p. (in Russian).
4. Sokolova T. A., Doronin S. Yu. Photometric determination of novocaine with preliminary concentration of surfactant micelles. *Journal of Analytical Chemistry*, 2022, vol. 77, no. 8, pp. 714–720 (in Russian). <https://doi.org/10.31857/S0044450222080151>
5. Doronin S. Yu., Chernova R. K., Gusakova N. N. Analytical possibilities of reactions of primary aromatic amines with *p*-dimethylaminocorical aldehyde in the presence of surfactant ions and micelles. *Journal of Analytical Chemistry*, 2005, vol. 60, no. 5, pp. 471–478 (in Russian). <https://doi.org/10.1007/s10809-005-0111-0>
6. Doronin S. Yu., Chernova R. K., Gusakova N. N. *p*-Dimethylaminocorical aldehyde as a photometric reagent



- for primary aromatic amines. *Journal of Analytical Chemistry*, 2004, vol. 59, no. 4, pp. 377–387 (in Russian). <https://doi.org/10.1023/B:JANNC.0000022785.47370.4c>
7. Doronin S. Yu., Chernova R. K., Gusakova N. N. The effect of surfactant ions and micelles on the physico-chemical characteristics of systems: Primary aromatic amines – aldehydes. *News of Universities. Chemistry and Chemical Technology*, 2004, vol. 47, iss. 2, pp. 55–60 (in Russian).
  8. Doronin S. Yu., Chernova R. K., Gusakova N. N. Condensation (dimethylamino)cinnamion aldehyde with aniline and its substituted in micellar media. *Journal of General Chemistry*, 2005, vol. 75, iss. 2, pp. 288–294. <https://doi.org/10.1007/s11176-005-0210-5>
  9. Doronin S. Yu., Chernova R. K., Gusakova N. N. Photometric analysis of paracetamol for the impurity content of p-aminophenol. *Pharmacy*, 2001, no. 3, pp. 35–37 (in Russian).
  10. Doronin S. Yu., Gusakova N. N., Chernova R. K. Test-method for determining aniline in air. *Factory Laboratory. Diagnostics of Materials*, 2002, vol. 68, no. 7, pp. 7–10 (in Russian).
  11. Chernova R. K., Gusakova N. N., Eremenko S. N., Doronin S. Yu. Photometric determination of aniline and its mononitro derivatives with p-dimethylaminocorical aldehyde. *News of Universities. Chemistry and Chemical Technology*, 1996, vol. 39, no. 6, pp. 33–35 (in Russian).
  12. Yatsimirsky A. K., Yatsimirskaya N. G., Krivova S. B. Condensation of p-DMAB with hydrazine in a micellar medium. *Journal of General Chemistry*, 1992, vol. 62, iss. 4, pp. 916–922 (in Russian).
  13. Krivova S. B., Mityakina M. G., Yatsimirskaya N. T., Osipov A. K. Kinetic methods for the determination of benzidine with p-dimethylaminobenzaldehyde in the presence of sodium dodecyl sulfate micelles. *Bulletin of Moscow State University, Ser. 2.*, 1991, vol. 32, no. 4, pp. 367–372 (in Russian).
  14. Yatsimirsky A. K., Yatsimirskaya N. T., Kashina S. Micellar catalysis and product stabilization in hydrazone formation reactions and micellar-modified determination of hydrazine and phenylhydrazine. *Anal. Chem.*, 1994, vol. 66, no. 14, pp. 2232–2239.
  15. Gordon A., Ford P. *The chemist's companion: A handbook of practical data, techniques, and references*. John Wiley & Sons, 1972. 537 p. (Russ. ed.: Moscow, Mir, 1976. 542 p. (in Russian).
  16. Vaikosen E. N., Ebeshi B. U., Worlu C. R. Spectroscopic fingerprinting of aminoglycosides and determination of neomycin sulphate through oxidative ion-pair complex formation using ammonium molybdate. *Current Pharmaceutical Analysis*, 2019, vol. 15, no. 5, pp. 487–496. <https://doi.org/10.2174/1573412914666180502124906>

Поступила в редакцию 12.04.2023; одобрена после рецензирования 10.05.2023; принята к публикации 11.05.2023  
The article was submitted 12.04.2023; approved after reviewing 10.05.2023; accepted for publication 11.05.2023





Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 3. С. 272–279

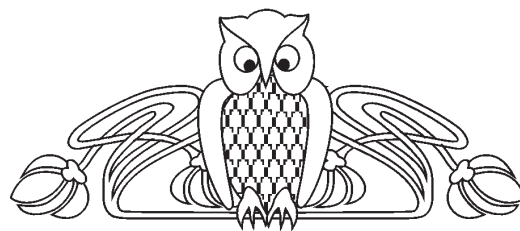
*Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2023, vol. 23, iss. 3, pp. 272–279

<https://ichbe.sgu.ru>

<https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-3-272-279>, EDN: XVTDKC

Научная статья  
УДК 544.478.13

## Исследование активности бифункциональных катализаторов на превращение n-гексана



И. В. Внук, Е. А. Ашихмин, С. Б. Ромаденкина , Т. В. Аниськова

Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Россия, 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, д. 83

Внук Илья Владиславович, магистрант Института химии, [ilia\\_vnukov1999@mail.ru](mailto:ilia_vnukov1999@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0002-8866-6370>

Ашихмин Егор Александрович, магистрант Института химии, [ashikhmin.yegor@mail.ru](mailto:ashikhmin.yegor@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0002-8317-6110>

Ромаденкина Светлана Борисовна, кандидат химических наук, доцент, доцент кафедры нефтехимии и техногенной безопасности, [romadenkina@yandex.ru](mailto:romadenkina@yandex.ru), <https://orcid.org/0000-0001-7035-7193>

Аниськова Татьяна Владимировна, кандидат химических наук, доцент кафедры нефтехимии и техногенной безопасности, [aniskovatv@mail.ru](mailto:aniskovatv@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0003-1988-323X>

**Аннотация.** Получение различных моторных топлив осуществляют посредством переработки светлых фракций нефти, с температурой начала кипения до 350°C. Нынешняя тенденция показывает утяжеление нефти на новых месторождениях. Новые залежи нефти находятся глубже большей долей темных фракций с температурой кипения от 350°C. Данная ситуация ведет к поиску решений по увеличению глубины переработки светлых фракций для получения целевых продуктов. Одним из основных путей решения поставленной задачи является создание новых или модернизация существующих каталитических систем. Моторные топлива должны соответствовать необходимым эксплуатационным и экологическим характеристикам, что определяется их химическим составом. Исследованы бифункциональные катализаторы на превращение n-гексана. В качестве носителя использован высокомолекулярный цеолит ЦВМ (ZSM-5), который обладает бифункциональностью из-за наличия разных активных центров. На носитель была нанесена платина (Pt/ЦВМ), празеодим (Pr/ЦВМ), а также последовательно нанесены празеодим и платина (Pt,Pr/ЦВМ) методом пропитки. В качестве сырья использовался нормальный гексан. Выбор данного сырья связан со способностью к реакции ароматизации, а также присутствием n-гексана в сырье в процессе получения моторных топлив – каталитическом риформинге. В результате превращения сырья получено жидкое топливо многокомпонентного состава с количеством углеродных атомов в цепи от 3 до 14, а также газы, содержащие углеводороды C<sub>1</sub> – C<sub>5</sub>. При превращении n-гексана на исследуемых катализаторах с увеличением температуры растет и октановое число и содержание ароматических углеводородов. Установлено, что при проведении процесса при температуре 450°C наибольший выход катализата составляет (33,8 масс. %) на катализаторе Pt,Pr/ЦВМ. С ростом температуры повышается выход бензола. Минимальный выход бензола (0,6 масс. %) при 450°C отмечается у биметаллического катализатора, что соответствует стандарту автобензина ЕВРО-5. Наибольшая степень наблюдалась в ходе превращения n-гексана на каталитической системе Pt,Pr/ЦВМ при температуре 450 °C (97%).

**Ключевые слова:** n-гексан, превращения, каталитический риформинг, платина, празеодим, биметаллические катализаторы

**Для цитирования:** Внук И. В., Ашихмин Е. А., Ромаденкина С. Б., Аниськова Т. В. Исследование активности бифункциональных катализаторов на превращение n-гексана // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 3. С. 272–279. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-3-272-279>, EDN: XVTDKC

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0)

Article

### Study of the activity of bifunctional catalyzers on the transformation of n-hexane

I. V. Vnukov, E. A. Ashikhmin, S. B. Romadenkina , T. V. Aniskova

Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia

Ilya V. Vnukov, [ilia\\_vnukov1999@mail.ru](mailto:ilia_vnukov1999@mail.ru)

Egor A. Ashikhmin, [ashikhmin.yegor@mail.ru](mailto:ashikhmin.yegor@mail.ru)

Svetlana B. Romadenkina, [romadenkina@yandex.ru](mailto:romadenkina@yandex.ru), <https://orcid.org/0000-0001-7035-7193>

Tatiana V. Aniskova, [aniskovatv@mail.ru](mailto:aniskovatv@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0003-1988-323X>

**Abstract.** The production of various motor fuels is carried out by processing light fractions of oil with an initial temperature of boiling to 350°C. The current trend shows that oil in new fields has more weight than before. New oil reservoirs are deeper with a greater proportion of dark fraction



with a boiling point of 350°C. This situation stimulates to find new ways of increasing the processing depth light fractions for synthesis target product. One of the main solution path for the problem is creation of new catalytic systems or modernization of existing ones. Motor fuels must meet the necessary operational and environmental characteristics, which is determined by their chemical composition. This article is devoted to the study of bifunctional catalyzers for the conversion of n-hexane. High molecular zeolite CVM (ZSM-5) was used as a carrier, which has functionality due to the presence of various active centers. Platinum (Pt/CVM), praseodymium (Pr/CVM) were also applied to the carrier, and praseodymium and platinum (Pt,Pr/CVM) were successively applied by impregnation. Normal hexane was used as a raw material. The choice of this raw material is associated with the ability to aromatization reaction, as well as the presence of n-hexane in the raw materials of the process of obtaining motor fuels-catalytic reforming. As a result of the transformation of raw materials, liquid fuel of multicomponent composition with the number of carbon atoms in the chain from 3 to 14, as well as gases containing C1 – C5 hydrocarbons, was obtained. When n-hexane is converted on the catalyzers under study, both the octane number and the content of aromatic hydrocarbons increase with increasing temperature. It has been found that when the process is carried out at a temperature of 450°C, the highest yield of the catalysate is (33.8% by weight.) on a Pt,Pr/CVM catalyzer. With an increase in temperature, the yield of benzene increases. Minimum benzene yield (0.6 wt. %) is achieved at 450°C marked by a bimetallic catalyzer, which corresponds to the EURO-5 gasoline standard. The highest degree of conversion was observed during the conversion of n-hexane on the Pt,Pr/CMC catalytic system at a temperature of 450° C, which was (97%).

**Keywords:** n-hexane, transformations, catalytic reforming, platinum, praseodymium, bimetallic catalyzers

**For citation:** Vnukov I. V., Ashikhmin E. A., Romadenkina S. B., Aniskova T. V. Study of the activity of bifunctional catalyzers on the transformation of n-hexane. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2023, vol. 23, iss. 3, pp. 272–279 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-3-272-279>, EDN: XVTDKC

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC-BY 4.0)

## Введение

На сегодняшний день большой вклад в производство современных моторных топлив вносит процесс каталитического риформинга. В промышленности используют катализаторы, на носитель которых нанесены благородные металлы, отличающиеся особой чувствительностью к воздействию каталитических ядов и воды, при этом очень дорогие. Поэтому актуальной задачей остается разработка эффективных каталитических систем с отсутствием этой группы или минимальным содержанием благородных металлов [1–3].

Первыми были введены в эксплуатацию монометаллические катализаторы с содержанием платины до 0,8 масс. %, что стало причиной больших экономических затрат. Введение второго металла на носитель приводит к увеличению межрегенерационного периода и уменьшению затрат в связи с уменьшением количества наносимого благородного металла. Основным металлом, также как и в монометаллическом катализаторе, являлась платина, которая увеличивала скорость реакцией гидрирования и дегидрирования. В качестве второго металла были нанесены рений, олово или иридий [4, 5].

В настоящее время в промышленности используются катализаторы различного состава, такие как ПР-81 (содержание платины 0,3 масс. %, рения 0,3 масс. %), R-254 (содержание платины 0,3 масс. %, рения 1,0 масс. %), РФ-1 (содержание платины 0,25 масс. %, рения 0,4 масс. %) и др.

Широкое распространение за счет большой удельной поверхности получили  $\gamma$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$ . По-

средством модификации свойств можно повысить селективность, активность и стабильность катализатора [5–7].

Особенностью цеолитных катализаторов является их бифункциональность. Благодаря этой особенности отдельные стадии одной реакции каталитического риформинга, в присутствии катализатора на основе цеолитов, протекают на металлических и кислотных центрах [8]. Металлические центры увеличивают скорость реакции дегидрирования парафинов в олефины, циклопарафинов – в нафтены и в ароматические углеводороды. На кислотных центрах протекают реакции изомеризации и гидрокрекинга, продукты которых подвергаются реакциям дегидрирования на металлических центрах [9–11].

Необходимость подбора нового состава катализатора определяется не только экономической стороной, но и с экологической. Стандарты «ЕВРО» для моторных топлив с течением времени вводят более жесткие требования, взяв курс на экологизацию бензинов. Для улучшения физико-химических параметров, а также удовлетворения условий экологических стандартов требуется создание новых каталитических систем [12–13].

Для исследования активности бифункциональных катализаторов были проведены опыты на каталитических системах: цеолит высокомолекулярный (ЦВМ), Pt/ЦВМ (содержание платины 0,13 масс. %), Pr/ЦВМ (содержание празеодима 0,7масс. %), Pr,Pt/ЦВМ (содержание празеодима 0,7масс. %, платины 0,13 масс. %). Выбор ЦВМ



связан с особенностью узкого диапазона размера пор (от 0,3 до 0,7 нм), что не позволяет синтезироваться на поверхности носителя поликонденсированным ароматическим углеводородам. Метод пропитки был взят за основу нанесения металлов на носитель, остаточной раствор после пропитки был проанализирован спектрофотометрическим методом анализа.

### Материалы и методы

Исследования активности всех каталитических систем проводились на лабораторной установке проточного типа в инертной среде при атмосферном давлении в интервале температур 400–500°C с интервалом 50°C. Скорость подачи сырья 8 мл/ч, объем загруженного катализатора 8 см<sup>3</sup>. В результате превращения сырья получено жидкое топливо многокомпонентного состава с количеством углеродных

атомов в цепи от 3 до 14, а также газы, содержащие углеводороды C<sub>1</sub> – C<sub>5</sub>.

Расчет был осуществлен с помощью программы «Хроматэк Аналитик», которая позволяет установить детальный состав полученных смесей, относительную плотность, фракционный состав и октановое число продукта по исследовательскому и моторному методу. В качестве сырья использовался н-гексан, выбор обоснован наличием достаточного количества атомов углерода для реакций ароматизации с получением бензола, а также тем, что н-гексан входит в состав сырья каталитического реформинга.

### Результаты и их обсуждение

В табл. 1 и 2 представлены материальные балансы превращений н-гексана на четырех каталитических системах.

Таблица 1 / Table 1

**Материальные балансы превращения н-гексана на каталитических системах ЦВМ, Pt/ЦВМ**  
**Material balances for the transformation of the n-hexane on Pt/CVM and CVM catalytic systems**

Приход Before			Расход After	ЦВМ / CVM						Pt/ЦВМ / Pt/CVM					
				400° C		450° C		500° C		400° C		450° C		500° C	
Масса Mass	г g	%	Масса Mass	г g	%	г g	%	г g	%	г g	%	г g	%	г g	%
н-гексан n-hexane	6,5	100,0	Жидкие продукты Liquidproduct	2,3	35,4	2,1	32,3	2,0	30,8	3,2	49,2	2,3	35,4	1,9	29,2
			Газовые продукты Gaseousproduct	4,2	64,6	4,4	67,7	4,5	69,2	3,3	50,8	4,2	64,6	4,6	70,8
Сумма Sum	6,5	100,0	Сумма Sum	6,5	100,0	6,5	100,0	6,5	100,0	6,5	100	6,5	100	6,5	100

Таблица 2 / Table 2

**Материальные балансы превращения н-гексана на каталитических системах Pr/ЦВМ, Pt, Pr/ЦВМ**  
**Material balances for the transformation of the n-hexane on Pt/CVM and Pt, Pr/CVM catalytic systems**

Приход Before			Расход After	Pr/ЦВМ / Pr/CVM						Pt, Pr/ЦВМ / Pt, Pr/CVM					
				400° C		450° C		500° C		400° C		450° C		500° C	
Масса Mass	г g	%	Масса Mass	г g	%	г g	%	г g	%	г g	%	г g	%	г g	%
н-гексан n-hexane	6,5	100,0	Жидкие продукты Liquidproduct	2,1	32,3	1,9	29,2	1,6	24,6	2,6	40,0	2,3	35,4	1,9	29,2
			Газовые продукты Gaseousproduct	4,4	67,7	4,6	70,8	4,9	75,4	3,9	60,0	4,2	64,6	4,6	70,8
Сумма Sum	6,5	100,0	Сумма Sum	6,5	100,0	6,5	100,0	6,5	100,0	6,5	100	6,5	100	6,5	100

Потери составляли менее 3%.

Основным показателем при проведении процесса является конверсия сырья. На рис. 1

представлена диаграмма степени превращения н-гексана на каталитических системах в ряде температур.

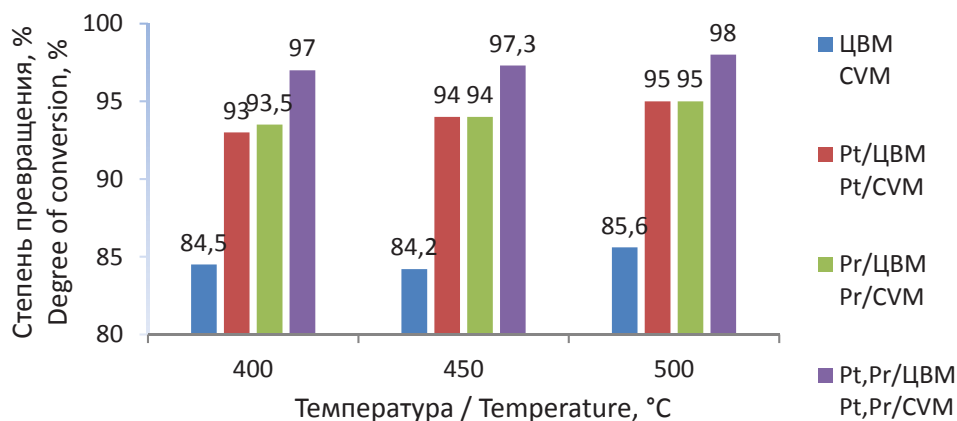


Рис. 1. Степень превращения н-гексана на катализаторах ЦВМ, Pt/ЦВМ, Pr/ЦВМ, Pt,Pr/ЦВМ  
 Fig. 1. The degree of transformation of n-hexane on the catalysts of CVM, Pt/CVM, Pr/CVM, Pt, Pr/CVM

На рис. 1 видно, что увеличение степени превращения в ряде температур наблюдается у всех каталитических систем. На биметаллическом катализаторе Pt,Pr/ЦВМ при 500°C была установлена наибольшая степень превращения н-гексана.

В табл. 3 представлены составы газообразных продуктов превращения стабильного гидрогенизата на катализаторах ЦВМ, Pt/ЦВМ, Pr/ЦВМ, Pt,Pr/ЦВМ.

В результате превращения н-гексана с увеличением температуры наблюдается уве-

личение выхода газообразных продуктов (на ЦВМ – с 64,6 до 69,2 масс. %; на Pt/ЦВМ – с 50,8 до 70,8 масс. %; на Pr/ЦВМ – с 67,7 до 75,4 масс.%; на Pt,Pr/ЦВМ – с 60,0 до 70,8 масс. %), также достигается наибольшее выделение H<sub>2</sub> при 450°C на всех каталитических системах и выход CH<sub>4</sub> при 500°C, что свидетельствует об увеличении вклада реакций ароматизации и циклизации н-гексана при 450°C и вклада реакций гидрокрекинга при 500°C.

Таблица 3 / Table 3

Состав газообразных продуктов превращения н-гексана на четырех каталитических системах  
 Composition of gaseous products of transformation of n-hexane on four catalytic systems

Компонент Component	Выход продуктов, % масс. / Product yield, wt. %											
	ЦВМ / CVM			Pt/ЦВМ / Pt/CVM			Pr/ЦВМ / Pr/CVM			Pt,Pr/ЦВМ / Pt,Pr/CVM		
	400°C	450°C	500°C	400°C	450°C	500°C	400°C	450°C	500°C	400°C	450°C	500°C
H <sub>2</sub>	–	–	1.3	0.3	4.2	0.2	–	7.6	5.5	0.1	2.7	1.6
CH <sub>4</sub>	1.0	0.6	5.3	1.0	4.3	7.4	0.5	8.3	15.8	0.5	26	45.9
CO <sub>2</sub>	9.6	–	0.3	0.1	0.3	0.2	8.5	0.8	–	0.1	0.2	0.5
C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	–	0.7	6.4	0.9	1.5	3.0	5.0	2.4	10.8	1.7	2.7	3.4
C <sub>2</sub> H <sub>6</sub>	–	2.6	35.3	5.9	16.0	25.4	0.7	17.5	24.6	4.1	7.0	8.9
C <sub>3</sub> H <sub>6</sub>	64.5	76.4	29.0	66.6	56.0	47.8	60.5	58.1	39.3	74.1	27.6	34.0
C <sub>3</sub> H <sub>8</sub>	–	–	19.3	–	–	–	3.1	–	–	0.8	0.5	0.3
C <sub>4</sub> H <sub>10</sub>	22.3	19.1	2.5	16.6	16.1	7.5	19.6	5.2	3.8	15.6	6.2	3.4
C <sub>5</sub> H <sub>12</sub>	1.6	–	–	1.1	0.7	0.4	0.8	–	–	0.5	0.4	0.2
Итого	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

В табл. 4 представлен основной групповой состав продуктов превращения н-гексана.

С повышением температуры селективность по реакциям изомеризации уменьшается, при

росте доли реакций ароматизации, что свидетельствует о росте массовой доли ароматических углеводородов в продуктах с повышением температуры проведения процесса (см. табл. 4).



Таблица 4 / Table 4

**Основной групповой состав продуктов превращения n-гексана на различных каталитических системах, % масс.**

**The main group composition of n-hexane conversion products on various catalytic systems, wt. %**

Компонент Component	ЦВМ / CVM			Pt/ЦВМ / Pt/CVM			Pr/ЦВМ / Pr/CVM			Pt,Pr/ЦВМ / Pt,Pr/CVM		
	400°C	450°C	500°C	400°C	450°C	500°C	400°C	450°C	500°C	400°C	450°C	500°C
Ароматические углеводороды Benzenehydrocarbons	14,8	18,6	20,7	21,2	23,5	28,2	19,3	20,8	24,1	16,4	26,0	32,4
Бензол Benzene	0,2	0,3	0,4	2,4	2,8	3,6	2,2	2,3	2,4	0,4	0,6	1,5
i-парафины C <sub>4</sub> -C <sub>6</sub> i-paraffine C <sub>4</sub> -C <sub>5</sub>	18,9	14,2	6,3	23,4	15,1	10,1	17,8	15,1	7,4	27,6	17,6	14,2

В табл. 5 представлены показатели октанового числа (ОЧ) по исследовательскому и мотор-

ному методу продуктов превращения n-гексана на разных каталитических системах.

Таблица 5 / Table 5

**Показатели октанового числа по исследовательскому и моторному методу продуктов превращения n-гексана на ЦВМ, Pt/ЦВМ, Pr/ЦВМ, Pt, Pr/ЦВМ**

**Octane number indicators according to the research and motor method of n-hexane conversion products on CVM, Pt/CVM, Pr/CVM, Pt, Pr/CVM**

Катализатор Catalyst	Температура, °C Temperature, °C	Показатель ОЧ	
		Исследовательский метод (ИОЧ) Rated Octane Number	Моторный метод (МОЧ) Motor Octane Number
ЦВМ CVM	400	80,8	72,5
	450	85,6	93,4
	500	90,2	96,5
Pt/ЦВМ Pt/CVM	400	91,0	107,9
	450	90,1	107,6
	500	94,0	112
Pr/ЦВМ Pr/CVM	400	84,6	95,1
	450	90,1	102,3
	500	96,6	105,6
Pt,Pr/ЦВМ Pt,Pr/CVM	400	91,0	108,6
	450	93,5	112,4
	500	96,6	119,1

Исходя из информации табл. 4 и 5, уменьшение доли реакций изомеризации при проведении процесса (с 18,9 до 6,3 масс. % на катализаторе ЦВМ; с 23,4 до 10,1 масс. % на катализаторе Pt/ЦВМ; с 17,8 до 7,4 масс. % на катализаторе Pr/ЦВМ; с 27,6 до 14,2 масс. % на катализаторе Pt,Pr/ЦВМ) не влияет на значение октанового числа, так как компенсируется повышающимся выходом углеводородов ароматического строения. Несмотря на это, сохраняется высокий уро-

вень изопарафинов, что благотворно сказывается в условиях экологизации моторных топлив.

При превращении сырья на исследуемых катализаторах с увеличением температуры растет величина ОЧ и содержание ароматики. Максимальные значения октановых чисел наблюдаются при 500°C, это объясняется содержанием в реформате ароматических углеводородов и изоалканов, обладающих самой большой детонационной стойкостью.



В результате сгорания бензола образуется канцероген первого класса опасности – бензоперен. Вследствие этого в настоящее время по стандарту ЕВРО-5 вводится ограничение на содержание бензола в моторных топливах до 1,0 масс.%. Наб-

людается тенденция на понижение концентрации бензола в новых стандартах моторных топлив.

На рис. 2 представлена зависимость выхода бензола от температуры на разных каталитических системах.

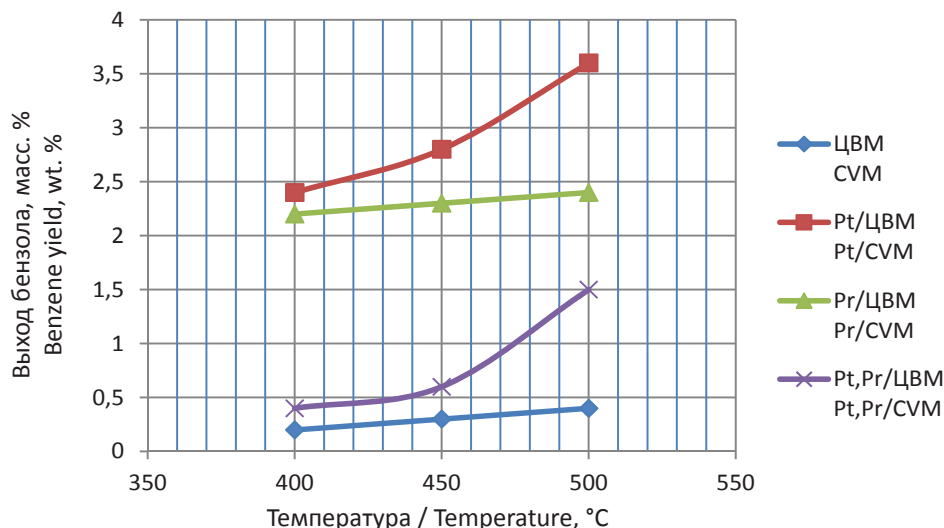


Рис. 2. Выход бензола при превращении н-гексана на катализаторах ЦВМ, Pt/ЦВМ, Pr/ЦВМ, Pt,Pr/ЦВМ

Fig. 2. Benzene yield during the conversion of n-hexane on the catalyzers CVM, Pt/CVM, Pr/CVM, Pt, Pr/CVM

С ростом температуры происходит увеличение количества бензола в реформате, что объясняется вкладом реакции ароматизации н-гексана. Минимальное количество бензола (0,6 масс. %) с учетом физико-химических параметров реформата наблюдается у биметаллического катализатора Pt,Pr/ЦВМ при 450°C.

Важными продуктами при превращении н-гексана на бифункциональных катализаторах являются ароматические соединения,

которые повышают октановые числа моторных топлив, но при сгорании образуют канцерогены, что негативно влияют на окружающую среду. По этой причине вводят ограничения по содержанию ароматических соединений в автомобильных топливах – не более 35 масс.%. На рис. 3 представлен график зависимости выхода ароматических углеводородов в ряде температур процесса превращения н-гексана на исследуемых катализаторах.

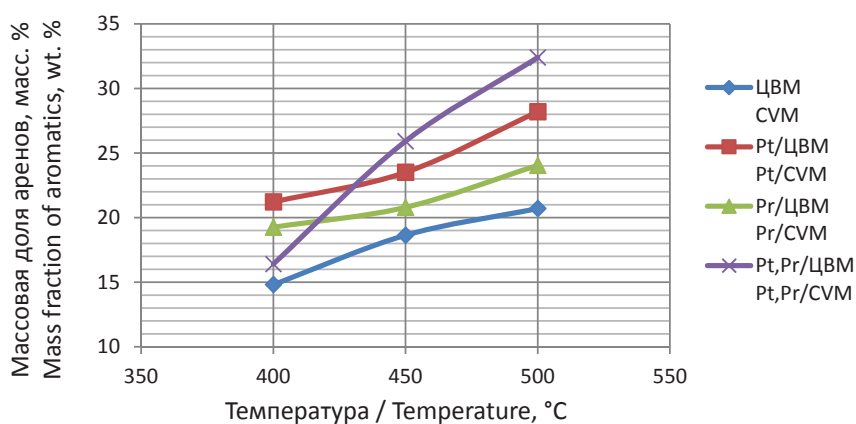


Рис. 3. Массовая доля ароматических соединений в продукте превращения н-гексана на исследуемых каталитических системах

Fig. 3. Mass fraction of aromatic compounds in the n-hexane conversion product on the studied catalytic systems



Наибольшее количество ароматических соединений было получено при превращении *n*-гексана на биметаллическом катализаторе Pt,Pr/ЦВМ при 500°C (32,40 ± 0,03 масс.%), меньше всего ароматических соединений из исследуемых каталитических систем было отмечено у ЦВМ.

### Список литературы

1. Иванов В. А., Ромаденкина С. Б. Превращение *n*-гексана в условиях каталитического риформинга // *Modern Science*. 2021. № 11-3. С. 30–36. ID: 47275556
2. Аниськова Т. В., Ромаденкина С. Б., Кузьмина Р. И. Превращение стабильного катализата установки каталитического риформинга на катализаторе R-98 // *Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология*. 2017. Т. 17, вып. 4. С. 394–396. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2017-17-4-394-396>
3. Белый А. С. Современное состояние, перспективы развития процесса и катализаторов риформинга бензиновых фракций нефти // *Катализ в промышленности*. 2014. № 5. С. 23–28. ID: 21997499
4. Пат. 2727887 РФ. Установка каталитического риформинга с непрерывной регенерацией катализатора / Лебедской-Тамбиев М. А., Калабин Д. А., Ермоленко А. Д., Шишкин С. Н., Яблоков А. С., Александров Д. С., Дьяченко К. В., Воронина Ю. В., Чулков К. С., Черненко А. А., Завьялова Н. Н., Ханова Н. Г. Оpubл. 24.07.2020. Бюл. № 21.
5. Пат. 2677283 РФ. Способ получения биметаллических катализаторов с градиентной структурой на основе платины/Алексенко А. А., Гутерман В. Е., Беленов С. В., Новомлинский И. Н., Меньщиков В. С. Оpubл. 16.01.2019. Бюл. № 2.
6. Трегубенко В. Ю., Веретельников К. В., Белый А. С. Триметаллические катализаторы риформинга Pt-Sn-Zr/ $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> // *Кинетика и катализ*. 2019. Т. 60, № 5. С. 618–623. <https://doi.org/10.1134/S0453881119040233>
7. Романовский Б. В. Основы катализа : учебное пособие. М : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015. 172 с.
8. Георгиева Э. Ю., Михайлова М. Д., Мартынова А. В. Анализ эксплуатационных характеристик катализаторов риформинга // *Инновационные научные исследования: теория, методология, практика : сборник статей XVII Международной научно-практической конференции*. Пенза : Наука и Просвещение, 2019. С. 189–191. ID: 37629159
9. Алиев А. М., Шабанова З. А., Керимов А. И. Синтез и исследование цеолитов, модифицированных катионами металлов, в качестве катализаторов в реакции окислительного дегидрирования нафтеновых углеводородов // *Журнал прикладной химии*. 2017. Т. 90, № 5. С. 591–597. ID: 29429588
10. Бушуев Ю. Г. Цеолиты. Компьютерное моделирование цеолитных материалов. Иваново : Иван. гос. хим.-технол. ун-т, 2011. 104 с.
11. Пат. 2712077 РФ. Способ получения катализатора и сам катализатор / Бауэр Ю., Дотцель Р., Мюнх Й. В. Оpubл. 27.01.2020. Бюл. № 3.
12. Агабеков В. Е., Косяков В. К. Нефть и газ: технологии и продукты переработки. Ростов н/Д : Феникс, 2014. 455 с.
13. Бакулина В. И., Воробьева Е. В. Пути оптимизации каталитического риформинга // *Новые технологии в учебном процессе и производстве : материалы XVII Международной научно-технической конференции*. Рязань : Рязаньпроект, 2019. С. 397–399. ID: 42472992

### References

1. Ivanov V. A., Romadenkina S. B. Transformation of *n*-hexane under conditions of catalytic reforming. *Modern Science*, 2021, no. 11-3, pp. 30–36 (in Russian). ID: 47275556
2. Aniskova T. V., Romadenkina S. B., Kuzmina R. I. Transformation of a stable catalyzate of a catalytic reforming unit on an R-98 catalyst. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2017, vol. 17, iss. 4, pp. 394–396 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2017-17-4-394-396>
3. Belyi A. S. Current state, prospects for the development of the process and catalysts for reforming gasoline fractions of oil. *Catalysis in Industry*, 2014, no. 5, pp. 23–28 (in Russian). ID: 21997499
4. Pat. 2727887 of the Russian Federation. Installation of catalytic reforming with continuous regeneration of the catalyst / Lebedskoy-Tambiev M. A., Kalabin D. A., Ermolenko A. D., Shishkin S. N., Yablokov A. S., Alexandrov D. S., Dyachenko K. V., Voronina Yu. V., Chulkov K. S., Chernenko A. A., Zavyalova N. N., Khanova N. G. Publ. July 24, 2020. Byul. no. 21 (in Russian).
5. Pat. 2677283 of the Russian Federation. A method for obtaining bimetallic catalysts with a gradient structure based on platinum / Aleksenko A. A., Guterma V. E., Belenov S. V., Novomlinsky I. N., Menshchikov V. S. Publ. January 16, 2019. Byul. no. 2 (in Russian).
6. Tregubenko V. Y., Veretelnikov K. V., Belyi A. S. Trimetallic catalysts for Pt-Sn-Zr/ $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> reforming. *Kinetics and Catalysis*, 2019, vol. 60, no. 5, pp. 618–623 (in Russian). <https://doi.org/10.1134/S0453881119040233>
7. Romanovsky B. V. *Osnovy kataliza* [Fundamentals of Catalysis: textbook]. Moscow, BINOM. Knowledge Lab., 2015. 172 p. (in Russian).
8. Georgieva E. Y., Mikhailova M. D., Martynova A. V. Analysis of the Performance Characteristics of Reforming Catalysts. *Innovative Scientific Research: Theory, Methodology, Practice: Collection of articles*



- of the XVII International scientific and practical conference. Penza, Nauka i Prosvyashchenie, 2019, pp. 189–191 (in Russian). ID: 37629159
9. Aliev A. M., Shabanova Z. A., Kerimov A. I. Synthesis and study of zeolites modified with metal cations as catalysts in the reaction of oxidative dehydrogenation of naphthenic hydrocarbons. *Journal of Applied Chemistry*, 2017, vol. 90, no. 5, pp. 591–597 (in Russian). ID: 29429588
  10. Bushuev Y. G. *Ceolity. Komp'yuternoe modelirovanie ceolitnykh materialov* [Zeolites. Computer Modeling of Zeolite Materials]. Ivanovo, Ivanovo State University of Chemistry and Technology Publ., 2011. 104 p. (in Russian).
  11. Pat. 2712077 of the Russian Federation. The method of obtaining the catalyst and the catalyst itself / Bauer Yu., Dotzel R., Munch Y. V. Publ. January 27, 2020. Byul. no. 3.
  12. Agabekov V. E., Kosyakov V. K. *Neft' i gaz: tekhnologii i produkty pererabotki* [Oil and Gas: Technologies and Products of Processing]. Rostov-on-Don, Feniks, 2014. 455 p. (in Russian).
  13. Bakulina V. I., Vorobyeva E. V. Ways of optimizing catalytic reforming. *New Technologies in the Educational Process and Production: Materials of the XVII International Scientific and Technical Conference*. Ryazan, Ryazanproekt, 2019, pp. 397–399 (in Russian). ID: 42472992

Поступила в редакцию 06.03.20223; одобрена после рецензирования 27.03.2023; принята к публикации 28.03.2023  
The article was submitted 06.03.20223; approved after reviewing 27.03.2023; accepted for publication 28.03.2023

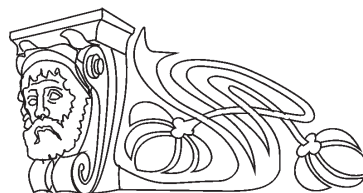




Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 3. С. 280–288  
*Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2023, vol. 23, iss. 3, pp. 280–288  
<https://ichbe.sgu.ru> <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-3-280-288>, EDN: SSQDFM

Научная статья  
УДК 544.3.03

## Исследование свойств твердого остатка пиролиза осадков сточных вод



Р. И. Кузьмина<sup>1</sup>, Р. Н. Кубашева<sup>1</sup>✉, З. Х. Кунашева<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Россия, 410012 г. Саратов, ул. Астраханская, д. 83

<sup>2</sup>Западно-Казахстанский университет имени М. Утемисова, Казахстан, 090000 г. Уральск, пр. Н. Назарбаева, д. 162

Кузьмина Раиса Ивановна, доктор химических наук, профессор кафедры нефтехимии и техногенной безопасности Института химии, [kuzminaraisa@mail.ru](mailto:kuzminaraisa@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0001-6850-4510>

Кубашева Раушан Нуртаевна, аспирант Института химии, [r\\_kubasheva@mail.ru](mailto:r_kubasheva@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0002-2999-0998>

Кунашева Зарипа Хайроллиевна, кандидат химических наук, доцент, заведующий исследовательской лабораторией экологии и биогеохимии, [kunasheva@mail.ru](mailto:kunasheva@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0002-1614-5939>

**Аннотация.** Приведены результаты термической переработки илового осадка хозяйственно-бытовых сточных вод в лабораторных условиях. Описан процесс пиролиза, проведенный на установке с реактором периодического действия, при атмосферном давлении в интервале температур от 20 до 700–800°C, до прекращения образования продуктов реакции. В результате переработки илового осадка на пиролизической установке получены углеводородные соединения в газообразном, жидком виде, а также твердый углистый остаток. Установлено, что при пиролизе иловых осадков сточных вод, выход продуктов процесса зависит от скорости нагрева сырья. Показаны результаты хроматографических, рентгенофазовых, спектроскопических исследований состава, свойств и структуры продуктов пиролиза. В качестве исходных материалов в данной работе использовались образцы иловых осадков сточных вод из разных точек чека нефтегазового месторождения Западно-Казахстанской области. Представлены результаты химического анализа исходного илового осадка (рН водной вытяжки, катионно-анионный состав, определение органического вещества в пробе), отобранного из нескольких точек иловой площадки. Проведен дифференциально-термический анализ иловых осадков. При пиролизе илового осадка происходит термическая стерилизация и образуются производные продукты (газ, жидкость, твердый углистый остаток), которые могут быть использованы как топливо или в качестве сырья нефтехимического синтеза. Кроме того, в процессе пиролиза тяжелые металлы (например, ртуть и кадмий) могут быть отделены вместе с углистым остатком. Предложено использовать твердый остаток пиролиза в качестве сорбента для сбора нефти и нефтепродуктов, так как это экономически и экологически выгодно.

**Ключевые слова:** иловый осадок, пиролиз, пиролизный остаток, водопоглощение, сорбционная способность, дифференциально-термический анализ

**Для цитирования:** Кузьмина Р. И., Кубашева Р. Н., Кунашева З. Х. Исследование свойств твердого остатка пиролиза осадков сточных вод // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 3. С. 280–288. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-3-280-288>, EDN: SSQDFM

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0)

Article

### Investigation of the properties of the solid residue of the pyrolysis of sewage sludge

R. I. Kuzmina<sup>1</sup>, R. N. Kubasheva<sup>1</sup>✉, Z. Kh. Kunasheva<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia

<sup>2</sup>West Kazakhstan University named after M. Utemisov, 162 Prospect N. Nazarbayev, Uralsk 090000, Kazakhstan

Raisa I. Kuzmina, [kuzminaraisa@mail.ru](mailto:kuzminaraisa@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0001-6850-4510>

Raushan N. Kubasheva, [r\\_kubasheva@mail.ru](mailto:r_kubasheva@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0002-2999-0998>

Zaripa Kh. Kunasheva, [kunasheva@mail.ru](mailto:kunasheva@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0002-1614-5939>

**Abstract.** This article presents the results of the thermal processing of sludge from domestic wastewater under laboratory conditions. The pyrolysis process is carried out in a batch reactor with an original design. Gaseous and liquid forms of hydrocarbon compounds, as well as solid carbonaceous residue, were obtained after processing the sludge in a pyrolytic plant. It is established that during pyrolysis of sludge sewage sludge, the output of the process products depends on the heating rate of the raw material. The results of chromatographic, X-ray diffraction, spectroscopic studies of the composition, properties, and structure of pyrolysis products are presented in the following sections. This research



project involved the analysis of sludge sediment samples obtained from different locations within the oil and gas field of the West Kazakhstan region. The results of the chemical analysis of the initial sludge (pH of the water extract, cationic-anionic composition, determination of organic matter in the sample) selected from several points of the sludge site are presented. Differential thermal analysis of silt sediments has been carried out. The results of this study demonstrate that the pyrolysis of sludge leads to thermal sterilization and the production of gaseous, liquid, and solid carbonaceous residue, which exhibit potential as fuel sources or raw materials for petrochemical synthesis. In addition, heavy metals (such as mercury and cadmium) can be separated from the carbonaceous residue during pyrolysis. It is proposed to use the solid pyrolysis sludge as a sorbent for the collection of oil and petroleum products, as it is economically and environmentally beneficial.

**Keywords:** sewage sludge, pyrolysis, pyrolysis of sludge, water absorption, sorption capacity, differential thermal analysis

**For citation:** Kuzmina R. I., Kubasheva R. N., Kunasheva Z. Kh. Investigation of the properties of the solid residue of the pyrolysis of sewage sludge. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2023, vol. 23, iss. 3, pp. 280–288 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-3-280-288>, EDN: SSQDFM

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC-BY 4.0)

### Введение

Процесс пиролиза иловых осадков хозяйственно-бытовых сточных вод является на сегодняшний день одним из перспективных направлений в решении многих вопросов, связанных с утилизацией данного вида отходов. Из многих литературных источников известно, что именно

процесс пиролиза является весьма актуальным, так как продукты переработки илового осадка могут быть использованы в качестве вторичного сырья.

В представленной ниже табл. 1 приведены методы переработки твердых бытовых отходов и их характерные особенности [1].

Таблица 1 / Table 1

#### Методы переработки твердых бытовых отходов Methods of solid household waste processing

Метод / Method	Характерная особенность / Characteristic feature
Захоронение на специально подготовленных полигонах / Burial at specially prepared landfills	Сложные инженерные сооружения, оснащенные системами борьбы с загрязнением подземных вод и атмосферного воздуха / Complex engineering structures equipped with systems for combating pollution of groundwater and atmospheric air
Компостинг / Compostin	В процессе компостирования из-за повышения температуры примерно до 50–60 градусов естественным, промышленным способом до 85 градусов погибают личинки вредителей и семена сорняков, а также все возбудители. Экологически чистое и бесплатное удобрение / In the process of composting, due to an increase in temperature to about 50–60 degrees, pest larvae and weed seeds, as well as all pathogens, die naturally, industrially up to 85 degrees. Environmentally friendly and free fertilizer
Термическая обработка твердых бытовых отходов / Heat treatment of solid household waste	Позволит сократить общий объем твердых бытовых отходов более чем в 10 раз, получать дополнительную энергию от их сжигания / It will reduce the total volume of solid household waste by more than 10 times, and receive additional energy from their combustion
Плазменная обработка / Plasma treatment	Конечный продукт переработки является абсолютно безвредным, позволяя перерабатывать все виды отходов без предварительной подготовки / The final product of processing is absolutely harmless, it allows processing all types of waste without preliminary preparation

Иловые осадки в зависимости от происхождения содержат в себе большое количество компонентов разного происхождения, следовательно, в зависимости от наличия в них тех или иных химических соединений и элементов, к их переработке должны применяться разные методы [2].

Химический состав осадков оказывает большое влияние на их водоотдачу. Соединения железа, алюминия, хрома, меди, а также

кислоты, щелочи и некоторые другие вещества, содержащиеся в производственных сточных водах, способствуют интенсификации процесса обезвоживания осадков и снижают расход химических реагентов на их коагуляцию перед обезвоживанием. Масла, жиры, азотные соединения, волокнистые вещества, наоборот, являются неблагоприятными компонентами. Окружая частицы осадка, они нарушают процессы уплотнения и коагуляции, а также увеличивают содержание



органических веществ в осадке, что сказывается на ухудшении его водоотдачи. По химическому составу осадки подразделяются на три группы: 1) преимущественно минерального состава; 2) преимущественно органического состава, имеющие зольность менее 10%; 3) имеющие в своем составе вещества органического и минерального происхождения, зольность таких осадков может изменяться от 10 до 60%.

В качестве исходных материалов в данной работе использовались разные образцы иловых

осадков сточных вод Карачаганакского нефтегазоконденсатного месторождения.

### Материалы и методы

В лабораторных условиях изучен один из химических способов переработки илистых осадков процесса очистки сточных вод – пиролиз. Процесс пиролиза проводили на установке с реактором периодического действия [3].

Схема установки, на которой проводился пиролиз, представлена на рис. 1.

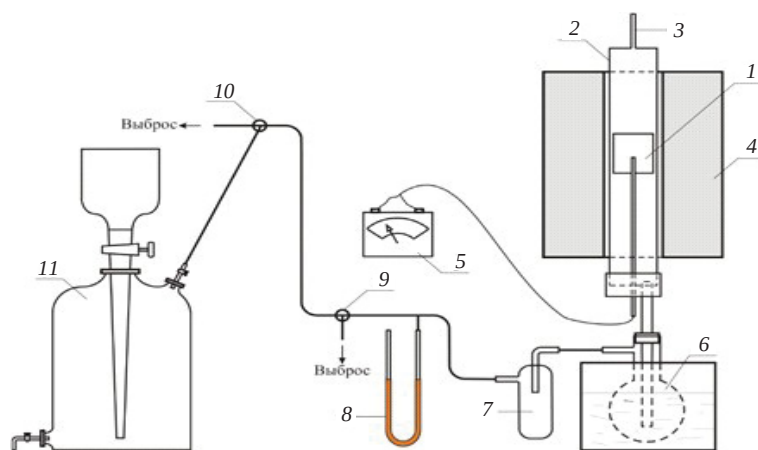


Рис. 1. Схема установки пиролиза: 1 – контейнер для сырья; 2 – реактор; 3 – трубка продувки; 4 – терморегулируемая печь; 5 – датчик температуры; 6 – охлаждаемый приемник жидких продуктов; 7 – ловушка; 8 – манометр; 9, 10 – краны, 11 – газометр

Fig. 1. Pyrolysis installation scheme: 1 – container for raw materials; 2 – reactor; 3 – purge tube; 4 – temperature-controlled furnace; 5 – temperature sensor; 6 – cooled receiver of liquid products; 7 – trap; 8 – manometer; 9, 10 – taps, 11 – gasometer

Объект исследования предварительно высушивали до постоянной массы при 100–140°C.

Подготовленную навеску в количестве 100 г помещали в реактор периодического действия 2. Перед началом работы установку проверяли на герметичность и продували инертным газом (гелием) в течение 30 мин для удаления воздуха из системы. Процесс проводили при атмосферном давлении. Нагрев реактора с сырьем осуществляли с помощью терморегулируемой печи 4 в интервале температур от комнатной (20–21° С) до 700–800°C до прекращения образования продуктов реакции. Контроль за температурой в реакционной зоне осуществлялся датчиком 5. Жидкие продукты конденсировались в охлаждаемом приемнике 6, а несконденсированные газы, проходя ловушку 7 и манометр 8, собирались в газометре 11 (см. рис. 1).

Пиролиз илового осадка вели при скорости нагрева сырья в реакторе, которая составила 10, 20 и 30 град/мин. Исследование сорбционной способности твердого остатка после пиролиза осадочного ила проводилось по нефти плотностью 0,846 г/см<sup>3</sup>. Для определения показателя нефтепоглощения пробы осадочного ила отбирались в интервале температур пиролиза 600–800°C. Исследование сорбционной способности проводилось по нефти и моторному маслу. Количество сорбента в эксперименте определялось количеством нефти и нефтепродукта, т.е. толщиной слоя нефтепродукта.

### Результаты и их обсуждение

На основании полученных лабораторных исследований выявлено, что иловый осадок представляет собой сложнейшую многокомпонентную систему. Несмотря на то что в со-



ставе иловых осадков сточных вод содержатся патогенные бактерии, изменение разнообразия таких микробных сообществ зависит от продолжительности естественного высыхания. При данном процессе под влиянием неблагоприятных факторов внешней среды, таких как перепады температуры воздуха, воздействия ультрафио-

летового излучения, формируется микробная структура близкая допустимой с преобладанием представителей естественной микрофлоры [4, 5].

В табл. 2 представлены результаты химического анализа илового осадка, отобранного из восьми точек иловой площадки Карачаганакского нефтегазоконденсатного месторождения.

Таблица 2 / Table 2

**Результаты химического анализа илового осадка**  
**Results of chemical analysis of sludge sediment**

Место отбора проб Sampling location	рН водной вытяжки pH of the aqueous extract	Катионно-анионный состав, мг в 100 г осадке Cation-anion composition, mg per 100 g sediment					Органическое вещество, % Organic matter, %
		Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	K <sup>+</sup>	HCO <sup>3-</sup>	Cl <sup>-</sup>	
1	7,07	585	84	8,1	23,18	103,87	2,36
2	7,37	135	30	16,4	29,28	45,44	2,41
3	7,41	145	21	3,4	38,43	54,24	2,36
4	7,34	940	0	56,2	167,75	542,39	2,44
5	7,23	655	30	3,1	47,58	67,71	2,52
6	6,95	715	54	8,5	32,33	117,69	2,41
7	7,14	660	45	29,4	51,85	126,56	2,36
8	7,11	480	36	22,4	29,28	99,61	2,36

Как видно из табл. 2 значения рН колеблются в пределах 6,95–7,41, т. е. среда нейтральная. В иловых осадках отсутствуют карбонат-ионы. По определению органического вещества в пробах наблюдаются равномерные значения от 2,36% до 2,52%, что не характерно для других обнаруженных ионов: кальция, магния, калия, хлоридов и гидрокарбонатов. Из табл. 2 видно, что содержание хлорид-ионов превышает предельно допустимую концентрацию. По-видимому, для обеззараживания и обработки бытовых сточных вод предварительно были использованы растворы хлора. В пробе из

четвертой точки по всем показателям получены высокие концентрации анионов и катионов. Это связано с тем, что данный образец илового осадка хранится с наименьшей продолжительностью естественного высыхания.

Осадок сточных вод, согласно проведенным исследованиям (рентгенофазовому, термогравиметрическому, ИК-спектроскопическому анализам), представляет собой сложнейшую многокомпонентную систему. Результаты лабораторного исследования органических веществ исследуемых образцов илового осадка приведены в табл. 3.

Таблица 3 / Table 3

**Органические составляющие иловых осадков промышленных и коммунальных сточных вод**  
**Organic constituents of sludge from industrial and municipal wastewater**

№	Наименование вещества Name of the substance	Количество, мг/кг Quantity, mg/kg
1	Синтетические поверхностно-активные вещества (ПАВ) Synthetic surface-activesubstances	1850–1900
2	Эфириозвлекаемые соединения (жиры, масла ит.п.) Ether-recoverable compounds (fats, oils and the like)	140–180
3	Нефтепродукты / Petroleum products	4,20–7,88
4	Фенолы / Phenols	Отсутствуют / No
5	Формальдегид / Formaldehyde	Не обнаружен / Not detected



Органическая составляющая (25–30 масс. %) включает синтетические поверхностно-активные вещества, эфиры, извлекаемые компоненты (жиры, масла и т.п.), нефтепродукты (легкие и средние фракции смолистых веществ), азот-, кислород- и фосфорсодержащие органические соединения.

Комплексный термографический анализ

осадка сточных вод показал его термическую устойчивость в области температур от 105 до 180°C, после чего начался процесс термоокислительной деструкции органической составляющей.

На рис. 2 показан иловый осадок, отобранный из нескольких точек иловой площадки и иловый остаток после процесса пиролиза.



а/а



б/б

Рис. 2. Иловый осадок сточных вод: а – до процесса пиролиза; б – после процесса пиролиза  
Fig. 2. Sludge sediment of wastewater: a – before the pyrolysis process; b – after the pyrolysis process

При пиролизе происходит термическая стерилизация и образуются производные продукты (газ, жидкость, твёрдый углистый остаток), которые могут служить топливом или использоваться как сырьё для нефтехимического производства. Кроме того, в процессе пиролиза тяжёлые металлы (например, ртуть и кадмий) могут отделяться вместе с углистым остатком.

Экономическая эффективность процесса пиролиза может быть повышена путём про-

изводства товарных продуктов из твёрдых (например, адсорбентов), жидких (удобрения) или газообразных (синтез-газ) продуктов процесса.

Выход продуктов зависит от скорости нагрева сырья, что видно из табл. 4.

Соотношение получаемых продуктов зависит главным образом от температуры процесса, а также от содержания в исходном продукте органических веществ и влажности.

Таблица 4 / Table 4

**Материальный баланс пиролиза илового осадка**  
**Material balance of sludge pyrolysis**

Продукт пиролиза Pyrolysis product	Скорость нагрева, град/мин Heating rate, deg/min		
	10	20	30
<i>m</i> (сырья), г / <i>m</i> (raw materials), g	100,0	100,0	100,0
<i>V</i> (газа), мл / <i>V</i> (gas), ml	13000	12600	12500
<i>m</i> (газа), г / <i>m</i> (gas), g	12,6	14,9	13,5
<i>m</i> (жидкости), г / <i>m</i> (liquid), g	25,6	24,4	20,6
<i>m</i> (тв. остатка), г / <i>m</i> (solid residue), g	61,1	58,1	59,1
Время процесса, мин / Process time, min	115	90	85
Потери, % / Loss, %	0,7	2,6	6,8



Сравнивая полученные результаты, можно сделать вывод о том, что соотношение полученных продуктов по агрегатному состоянию зависит от скорости нагрева сырья, что видно из диаграммы на рис. 3.

При пиролизе осадков в обычных условиях можно выделить в основном два типа реакций:

1) термический распад исходного вещества и дальнейшее разложение получающихся промежуточных соединений;

2) конденсация и полимеризация молекул, образовавшихся в результате первичных реакций деструкции исходного сырья [6, 7].

Выходящий из пиролизного аппарата продукт является сложной смесью газообразных, жидких и твердых веществ, состав которых зависит от химической природы сырья и физических параметров нагревания.

В настоящее время из продуктов пиролитического превращения наиболее интересен твердый остаток, представленный техническим углеродом [8, 9].

В научных работах предлагается использовать твердый остаток после специальных методов очистки для производства брикетированного топлива [10].

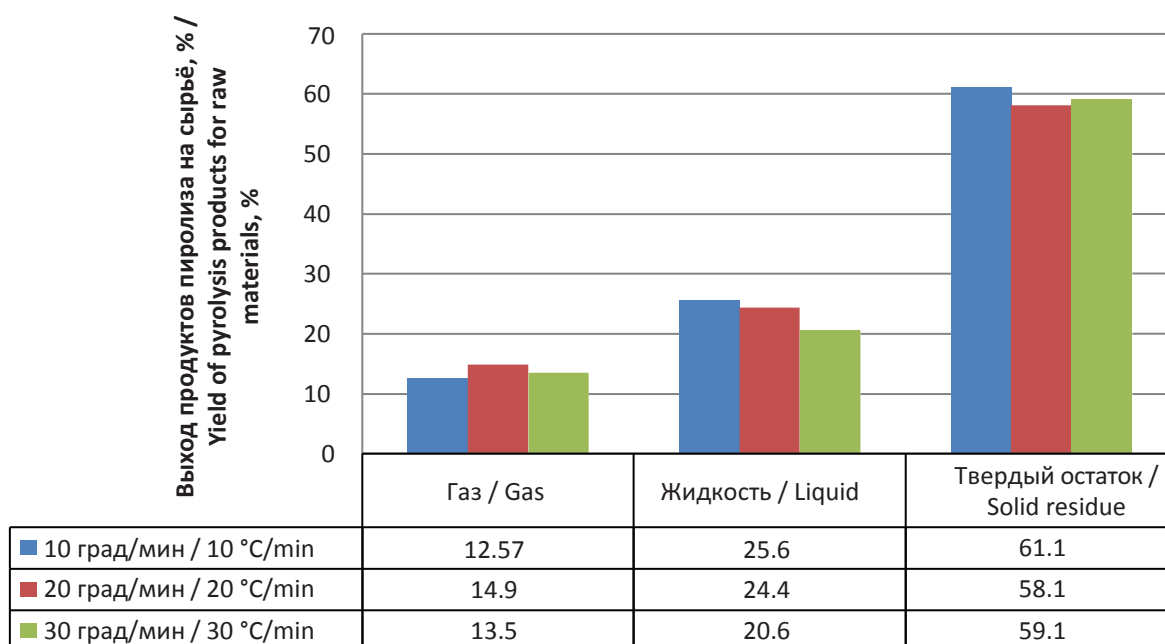


Рис. 3. Соотношение получаемых продуктов по агрегатному состоянию

Fig. 3. The ratio of the products obtained by aggregate state

Одним из направлений применения илового осадка в промышленности является создание сорбента на основе твердых остатков после пиролиза илового осадка хозяйственно-бытовых сточных вод.

Важнейшими характеристиками для сорбента являются плавучесть, водопоглощение и сорбционная способность. На рис. 4 представлены зависимости водопоглощения неизмельченного и измельченного образцов от времени насыщения.

Неизмельченные образцы имеют большую способность к водопоглощению, чем образцы с меньшим размером частиц. С увеличением температуры термообработки данная характеристика твердого остатка незначительно

снижается в последние сутки исследований. Запаса плавучести должно хватать до завершения операции сбора отработанного сорбента. Исследования показали, что после сбора нефти и моторного масла сорбент сохранял свою плавучесть более 10 суток, кроме измельченного образца, полученного при температуре пиролиза 800° С.

Нефтепоглощение твердого остатка после пиролиза осадочного ила показало, что наибольшей сорбционной способностью по нефти обладает измельченный иловый остаток, подвергшийся пиролизу при температуре 700° С, более высокая температура ведет к резкому увеличению зольности, обгару угля и падению его сорбционной способности.

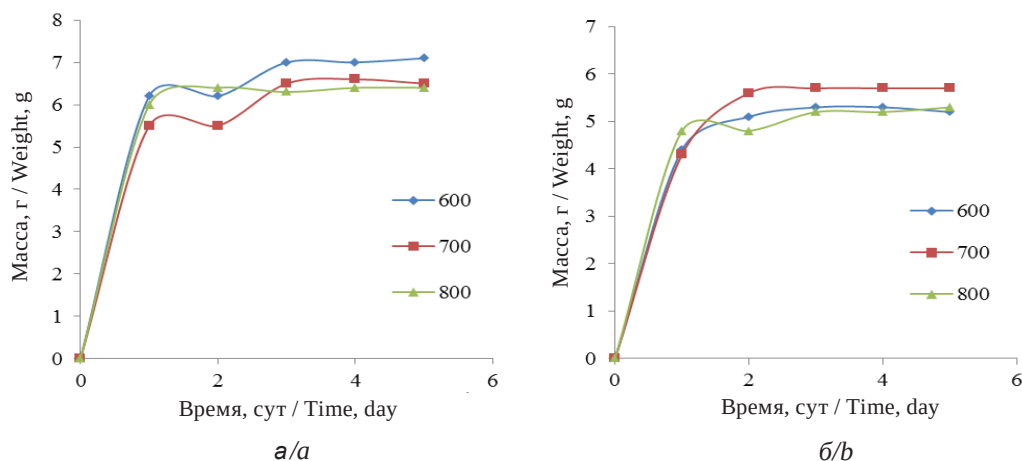


Рис. 4. Водопоглощение неизмельченного и измельченного образцов от времени насыщения: а – неизмельченный образец; б – измельченный образец  
 Fig. 4. Water absorption of non-crushed and crushed samples from the saturation time: a – non-crushed sample; b – crushed sample

При увеличении зольности может достигаться критический размер частиц сорбента, когда процесс смачивания нефтью прекращается и сорбция не происходит.

Наибольшей сорбционной способностью по моторному маслу обладает неизмельченный сорбент. Результаты экспериментов представлены в табл. 5.

Таблица 5 / Table 5

**Нефтепоглощение остатком после пиролиза осадочного ила**  
**Oil absorption by residue after pyrolysis of sedimentary sludge**

Температура процесса пиролиза, °С Pyrolysis process temperature, °C	Поглощение нефти сорбентом, % Absorption of oil by sorbent, %		Поглощение моторного масла сорбентом, % Absorption of motor oil by sorbent, %	
	1	2	1	2
600	50,0	56,7	73,3	36,6
700	53,3	<u>66,7</u>	66,7	33,3
800	56,7	60,0	<u>80,0</u>	40,0

Примечание. 1 – неизмельченный сорбент; 2 – измельченный сорбент.  
 Note. 1 – non-crushed sorbent; 2 – crushed sorbent.

На рис. 5 представлена дифрактограмма илового осадка очистки сточных вод.

По результатам дифференциально-термического анализа установлено, что нагревание образца приводит к удалению из него воды, что находит отражение на кривой в виде размытого эндотермического эффекта в интервале 60–180° С с максимумом при 120° С. Убыль массы, которая соответствует этому процессу, составляет около 12%. Дальнейшее нагревание приводит к окислению органической составляющей илового остатка. Этот процесс сопровождается размытым экзотермическим эффектом (на ДТА) с несколькими подмаксимумами при 340, 480,

580° С, интервал температур 210–630° С. Эти эффекты соответствуют окислению органических продуктов разной природы, экзоэффект при 580°С, вероятно, соответствует окислению свободного углерода, получившегося в результате разложения органических веществ или высокоуглеродных продуктов разложения. Убыль массы составляет 53%. Конечный продукт представляет собой твердое вещество оранжевого (светло-коричневого) цвета.

**Заключение**

Пиролитическая переработка илового осадка очистных сооружений носит безотходный

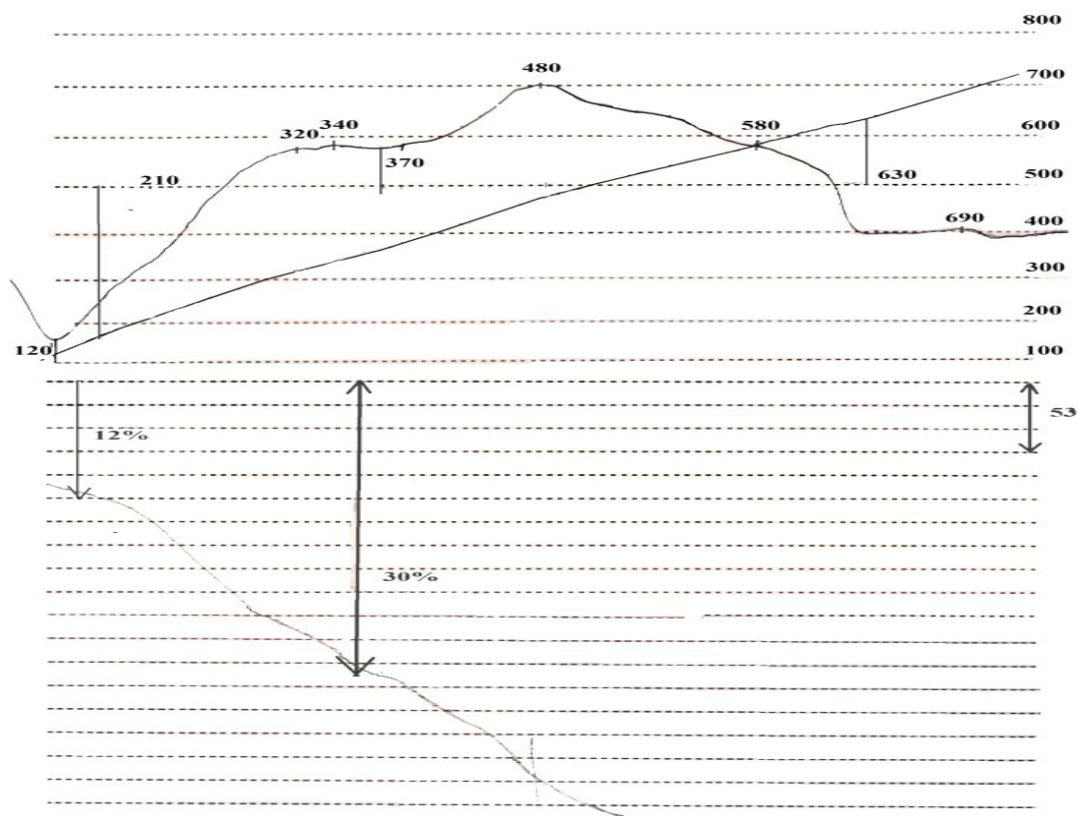


Рис. 5. Дифрактограмма илового осадка очистки сточных вод

Fig. 5. Diffractogram of sludge sediment of wastewater treatment

характер. При пиролизе происходит термическая стерилизация и образуются производные продукты (газ, жидкость, твёрдый углистый остаток), которые могут быть использованы как топливо или в качестве сырья для нефтехимического производства.

Угlistое вещество, образующееся в процессе пиролиза, не спекается, имеет рыхлый характер, как и исходный ил, и может быть использовано в качестве восстановителя в металлургических производствах или сорбента для сбора нефтепродуктов. Утилизация отработанного сорбента после отжима из него нефти и нефтепродуктов возможна в качестве наполнителя в асфальто-битумные смеси.

Следует вывод, что крупномасштабное использование различных сорбентов в целях охраны окружающей среды (очистка сточных вод, газовых выбросов, загрязненных почв) требует расширения производства пористых углеродных материалов из дешевых видов органического сырья: ископаемых твердых топлив, различных природных и техногенных органических отходов, материалов.

В связи с этим исследование процесса термической переработки иловых осадков сточных вод методом пиролиза является весьма перспективным направлением.

#### Список литературы

1. Ветошкин А. Г. Технологии защиты окружающей среды от отходов производства и потребления: учебное пособие. СПб. : Лань, 2016. 304 с.
2. Уланова О. В., Салхофер С. П., Вюни К. Комплексное устойчивое управление отходами. Жилищно-коммунальное хозяйство: учебное пособие. М. : Издательский дом Академии Естествознания, 2016. 520 с. <https://doi.org/10.17513/np.231>
3. Кузьмина Р. И., Ромаденкина С. Б., Михель А. А., Игнатьев С. В. Переработка резиновых отходов методом высокотемпературного пиролиза // Химия твердого топлива. 2016. № 4. С. 56–60.
4. Biswas K., Turner S. J. Microbial community composition and dynamics of moving bed biofilm reactor systems treating municipal sewage // Appl. Environ. Microbiol. 2012. Vol. 78. P. 855–864. <https://doi.org/10.1128/AEM.06570-11>
5. Seviour R., Nielsen P. H. Microbial Ecology of Activated Sludge. London : IWA Publishing Company, 2010. 688 p.





- Kim Y., Parker W. A technical and economic evaluation of the pyrolysis of sewage sludge for the production of bio-oil // *Bioresource Technology*. 2008. Vol. 99, iss. 5. P. 1409–1416. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.056>
- Яцун А. В., Коновалов Н. П., Ефименко И. С. Жидкие продукты пиролиза отработанных автомобильных шин под воздействием СВЧ // *Химия твердого топлива*. 2013. № 4. С. 60–63.
- Шиканова К. А. Технология переработки твердого углеродсодержащего остатка, являющегося отходом пиролиза автошин // *Вестник РУДН*. 2015. № 4. С. 80–83.
- Попов В. С., Папин А. В., Игнатова А. Ю. Анализ возможности получения брикетированного топлива из отходов пиролиза автошин с использованием связующего – вторичного полимера // *Вестник КузГТУ*. 2016. № 1. С. 172–177.
- Папин А. В., Игнатова А. Ю., Макаревич Е. А., Неведров А. В. Получение композиционного топлива на основе технического углерода пиролиза автошин // *Вестник КузГТУ*. 2015. № 2. С. 107–113.
- ing House of the Academy of Natural Sciences, 2016. 520 p. (in Russian). <https://doi.org/10.17513/np.231>
- Kuzmina R. I., Romadenkina S. B., Mikhel A. A., Ignatiev S. V. Processing of rubber waste by high-temperature pyrolysis. *Chemistry of Solid Fuels*, 2016, no. 4, pp. 56–60 (in Russian).
- Biswas K., Turner S. J. Microbial community composition and dynamics of moving bed biofilm reactor systems treating municipal sewage. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012, vol. 78, pp. 855–864. <https://doi.org/10.1128/AEM.06570-11>
- Seviour R., Nielsen P. H. *Microbial Ecology of Activated Sludge*. London, IWA Publishing Company, 2010. 688 p.
- Kim Y., Parker W. A Technical and economic evaluation of pyrolysis of sewage sludge for the production of biooil. *Bioresource Technology*, 2008, vol. 99, iss. 5, pp. 1409–1416. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.056>
- Yatsun A. V., Konovalov N. P., Efimenko I. S. Liquid pyrolysis products of used car tires under microwave exposure. *Solid Fuel Chemistry*, 2013, no. 4, pp. 60–63 (in Russian).
- Shikanova K. A. Technology of processing of solid carbon-containing residue, which is a waste of tire pyrolysis. *Bulletin of RUDN University*, 2015, no. 4, pp. 80–83 (in Russian).
- Popov V. S., Papin A. V., Ignatova A. Yu. Analysis of the possibility of obtaining briquetted fuel from tire pyrolysis waste using a binder – a secondary polymer. *Bulletin of KuzGTU*, 2016, no. 1, pp. 172–177 (in Russian).
- Papin A. V., Ignatova A. Yu., Makarevich E. A., Nevedrov A. V. Obtaining composite fuel based on carbon black by tire pyrolysis. *Bulletin of KuzGTU*, 2015, no. 2, pp. 107–113 (in Russian).

## References

- Vetoshkin A. G. *Tekhnologii zashchity okruzhayushchey sredy ot otkhodov proizvodstva i potrebleniya: uchebnoye posobiye* [Technologies for protecting the environment from production and consumption waste: a study guide]. St. Petersburg, Lan', 2016. 304 p. (in Russian).
- Ulanova O. V., Salhofer S. P., Vyunsh K. *Kompleksnoye ustoychivoye upravleniye otkhodami. Zhilishchno-kommunal'noye khozyaystvo: uchebnoye posobiye* [Integrated sustainable waste management. Housing and communal services: textbook]. Moscow, Publishing House of the Academy of Natural Sciences, 2016. 520 p. (in Russian).

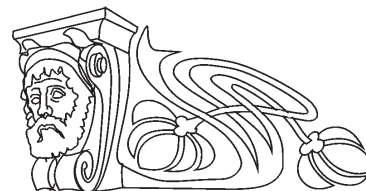
Поступила в редакцию 29.03.2023; одобрена после рецензирования 18.04.2023; принята к публикации 25.04.2023  
The article was submitted 29.03.2023; approved after reviewing 18.04.2023; accepted for publication 25.04.2023



Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 3. С. 289–298  
*Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2023, vol. 23, iss. 3, pp. 289–298  
<https://ichbe.sgu.ru> <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-3-289-298>, EDN: UPNXYX

Научная статья  
УДК 543.05:547.3

## Микроэкстракционное концентрирование неионными ПАВ и цветометрическое определение фенола



Е. А. Чеботарева<sup>1</sup>, Э. И. Цыгулёва<sup>2</sup>, С. Ю. Доронин<sup>1</sup>✉

<sup>1</sup>Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Россия, 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, д. 83

<sup>2</sup>Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н. И. Вавилова, Россия, 410012, г. Саратов, пр. им. Петра Столыпина, зд. 4, стр. 3

Чеботарева Елена Алексеевна, магистр кафедры аналитической химии и химической экологии Института химии, [lampydusa@mail.ru](mailto:lampydusa@mail.ru), <https://orcid.org/0009-0004-5994-0993>

Цыгулёва Эльмира Иршатовна, старший преподаватель кафедры общеобразовательных дисциплин, [musja2525@mail.ru](mailto:musja2525@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0003-4407-520X>

Доронин Сергей Юрьевич, доктор химических наук, профессор, профессор кафедры аналитической химии и химической экологии Института химии, [doroninsu@mail.ru](mailto:doroninsu@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0002-1115-1360>

**Аннотация.** Впервые исследована экстракция комплекса вольфрамовой сини, образованного по реакции фенола с реактивом Фолина – Чокальтеу (ФЧ) в присутствии неионного поверхностно-активного вещества (ПАВ) Тритона X-100 в щелочной среде с применением методологии мицеллярной экстракции на основе «точки помутнения». Для создания pH и в качестве высаливающего агента применяли водные растворы карбоната и сульфата натрия. Последний, оказывая высаливающий эффект, способствует фазовому разделению в исследуемой системе на мицеллярную фазу, насыщенную ПАВ (Тритоном X-100), и водную фазу, обедненную ПАВ, без дополнительного нагревания при комнатной температуре. Установлены оптимальные условия мицеллярной экстракции фенола: ФЧ (0,2 н.) – Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (6%-ный) – Тритон X-100 (2%-ный) – Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3,2%-ный). Показано, что мицеллярно-насыщенные фазы Тритона X-100 эффективно экстрагируют аналитическую форму (комплекс вольфрамовой сини), могут быть предложены для экстракционно-спектрофотометрического и цветометрического определения фенола. Так, для спектрофотометрического определения фенола ( $\lambda_{\text{макс}} = 760 \text{ нм}$ ) закон Бугера – Ламберта – Бера подчиняется уравнению вида:  $y = 0,0007x - 0,0079$ ,  $R^2 = 0,997$ . Диапазон определяемых содержаний (ДОС) находится в интервале  $7 \cdot 10^{-7} - 6 \cdot 10^{-5} \text{ М}$ . Разработана методика цветометрического определения фенола в водных средах (канал R). Интенсивность канала цветности R ( $I_R$ ) линейно зависит от  $\rho(\text{фенола})$  в соответствии с уравнением:  $y = 95,0x - 455$ ;  $R^2 = 0,997$ . ДОС =  $7 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ М}$ . Построены профили лепестковых диаграмм в цветовых координатах модели RGB CMYK, получены зависимости их площади (S) и периметра (P) от  $-lgc$ : (периметр (P))  $y = 150x - 284$ ;  $R^2 = 0,994$ ; площадь (S)  $y = 17710x - 66930$ ;  $R^2 = 0,994$ .

**Ключевые слова:** фенол, концентрирование, поверхностно-активные вещества (ПАВ), мицеллярная экстракция, цветометрия, реактив Фолина – Чокальтеу

**Для цитирования:** Чеботарева Е. А., Цыгулёва Э. И., Доронин С. Ю. Микроэкстракционное концентрирование неионными ПАВ и цветометрическое определение фенола // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 3. С. 289–298. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-3-289-298>, EDN: UPNXYX

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0)

Article

### Microextraction preconcentration with nonionic surfactants and colorimetric determination of phenol

Е. А. Chebotareva<sup>1</sup>, Е. I. Tsygulyova<sup>2</sup>, S. Yu. Doronin<sup>1</sup>✉

<sup>1</sup>Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia

<sup>2</sup>Saratov State University of Genetics, Biotechnology and Engineering named after N. I. Vavilov, 4, str. 3 Peter Stolypin Prospekt, Saratov 410012, Russia

Elena A. Chebotareva, [lampydusa@mail.ru](mailto:lampydusa@mail.ru), <https://orcid.org/0009-0004-5994-0993>

Elmira I. Tsygulyova, [musja2525@mail.ru](mailto:musja2525@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0003-4407-520X>

Sergei Yu. Doronin, [doroninsu@mail.ru](mailto:doroninsu@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0002-1115-1360>

**Abstract.** The extraction of the tungsten blue complex formed by the reaction of phenol with Folin-Ciocalteu reagent (FCR) in the presence of a nonionic surfactant Triton X-100 in alkaline medium using the methodology of micellar extraction based on «clouding point» has been studied



for the first time. Aqueous solutions of sodium carbonate and sodium sulfate were used to create pH and as a desalting agent. The latter, having a desalting effect, promotes phase separation in the system under study into a micellar phase saturated with surfactant (Triton X-100) and an aqueous phase depleted in surfactant without additional heating at room temperature. Optimal conditions for micellar phenol extraction were determined: FCR (0,2 n.) – Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (6%) – Triton X-100 (2%) – Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3,2%). It is shown that micellar-saturated phases of Triton X-100 effectively extract the analytical form (tungsten blue complex), can be proposed for extraction-spectrophotometric and colorimetric determination of phenol. So, for the spectrophotometric determination of phenol ( $\lambda_{\max} = 760$  nm), the Beer-Bouguer-Lambert law obeys an equation of the form:  $y = 0,0007x - 0,0079$ ,  $R^2 = 0,997$ . The range of defined contents is in the interval  $7 \cdot 10^{-7} - 6 \cdot 10^{-5}$  M. A technique for the colorimetric determination of phenol in aqueous media (channel R) has been developed. The intensity of the chromaticity channel R ( $I_R$ ) linearly depends on  $p_c(\text{phenol})$  in accordance with the equation:  $y = 95,0x - 455$ ;  $R^2 = 0,997$ . The range of defined contents is in the interval  $7 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5}$  M. The profiles of the petal diagrams in the RGB CMYK color coordinates are constructed, the dependences of their area are obtained ( $S$ ) and perimeter ( $P$ ) from  $-lgc$ : (perimeter ( $P$ ))  $y = 150x - 284$ ;  $R^2 = 0,994$ ; area ( $S$ )  $y = 17710x - 66930$ ;  $R^2 = 0,994$ ).

**Keywords:** phenol, preconcentration, surfactants, micellar extraction, colorometry, Folin – Ciocalteu reagent

**For citation:** Chebotareva E. A., Tsygulyova E. I., Doronin S. Yu. Microextraction preconcentration with nonionic surfactants and colorimetric determination of phenol. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2023, vol. 23, iss. 3, pp. 289–298 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-3-289-298>, EDN: UPNXX

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC-BY 4.0)

## Введение

Многие фенольные соединения опасны из-за своей токсичности, бионакопляемости, стойкости в окружающей среде и их канцерогенных свойств [1]. Поэтому необходимо своевременное определение фенола и его производных в объектах окружающей среды, в которых превышена его предельно допустимая концентрация (ПДК). Так, ПДК в воздухе рабочей зоны составляет 0,1–5,0 мг/м<sup>3</sup>, а в питьевой воде и воде рыбохозяйственных водоемов составляет 0,001 мг/дм<sup>3</sup> [2].

Наряду с фенольными токсикантами, существуют биологически активные фенолы. К таким фенольным соединениям относят полифенолы, проявляющие антиоксидантную активность (АОА). Они входят в состав пищевых продуктов, лекарственных препаратов и биологически активных добавок [3]. Фенольные антиоксиданты, как правило, не токсичны, но их суммарное содержание также необходимо контролировать. Повышенное содержание фенольных антиоксидантов может оказывать существенное влияние на профилактику и прогрессирование различных заболеваний.

Реактив Фолина – Чокальтеу (ФЧ) применяют в качестве стандартного реагента для спектрофотометрического суммарного определения фенольных соединений, как полифенолов и их производных, так и простых фенолов [4, 5]. Некоторые способы спектрофотометрического определения фенольных соединений с реагентом ФЧ приведены в табл. 1. Метод определения фенолов обладает рядом преимуществ: он быстр, прост в исполнении и не требует сложных инструментальных устройств [6].

Однако этот метод подвергался многим неконтролируемым модификациям, часто без какой-либо систематической оптимизации или процедур стандартизации и валидации. Поэтому разработка новых и усовершенствование уже имеющихся вариантов, с целью снижения предела обнаружения фенолов или улучшения метрологических характеристик методик, является актуальной задачей.

Цель настоящей работы – разработка цветометрического способа определения фенола в водных средах, который основан на применении методологии экстракции «в точке помутнения» (*cloud-point extraction*, CP-экстракция), с использованием неионного поверхностно-активного вещества и реактива ФЧ.

## Материалы и методы

**Аппаратура.** Весы аналитические общего типа WP-11 второго класса точности с наибольшим пределом взвешивания 100 г по ГОСТ 24104-88Е. Сушильный шкаф СНОЛ (T = 0–300°C). Цифровой фотоаппарат Iphone 11. Двухлучевой сканирующий спектрофотометр Shimadzu UV-1800 (Япония). Программа обработки цифровых данных Adobe PhotoShop CC 2019. Центрифуга 800-1 Centrifugal Machine.

**Реагенты.** Неионный ПАВ – Triton X-100 (C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>O(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>, где n = 9–10), массовая доля основного вещества 99%, натрий углекислый (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, х.ч., ГОСТ 83-79), натрий хлорид (NaCl, ч.д.а., ГОСТ 4233-77), натрий сернокислый (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, х.ч., ГОСТ 4166-76), аммоний сернокислый ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ч.д.а., ГОСТ 3769-78), реактив Фолина – Чокальтеу (синтезировали в соответствии с ГОСТ Р 55488-2013), фенол (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O, ч.д.а., ТУ 6-09-40-3245-90).



Таблица 1 / Table 1

**Спектрофотометрическое определение фенольных соединений с реактивом Фолина – Чокальтеу**  
**Spectrophotometric determination of phenolic compounds with reagent Folina – Chocalteu**

№	Объект Object	$\lambda_{\text{макс, нм}}$ $\lambda_{\text{max, nm}}$	Метрологические характеристики Metrological characteristics	Лит-ра / Source
1	Молоко (козье, коровье, овечье, человеческое) Milk (goat, cow, sheep, human)	750	ПрО = 6,03 мг ГАЕ/Л (mg GAE/L), $S_r \leq 2\%$	[7]
2	Яблочный сок Apple juice	765	ДОС = 25–500 мг/л (mg/l), ПрО = 0,2 мг/л (mg/l)	[8]
3	Этанольные экстракты пшеницы, гречихи, калусной ткани чая Ethanol extracts of wheat, buckwheat, callus tissue of tea	725	ДОС = 10–100 мкг/мл ( $\mu\text{g/ml}$ )	[9]
4	Кверцетин, рутин, пирокатехин, резорцин, галловая кислота, аскорбиновая кислота Quercetin, rutin, pyrogatechin, resorcinol, gallic acid, ascorbic acid	765	ДОС = $10^{-5} - 10^{-4}$ моль/л (mol/l), ПрО = 0,1–1 мкМ ( $\mu\text{M}$ )	[10]
5	Кофе Coffee	750	ДОС = 1,0–6,0 мкмоль ГК/дм <sup>3</sup> ( $\mu\text{mol GA/l}$ )	[11]
6	Кукуруза и соя Corn and soybeans	725	ПрО = 0,03 мкг/мкл ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), ДОС = 2–10 мкг/мкл ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	[12]

Примечание. ПрО – предел обнаружения; ДОС – диапазон определяемых содержаний;  $S_r$  – относительное стандартное отклонение; ГАЕ – эквивалент галловой кислоты; ГК – галловая кислота.

Note. List of abbreviations used in Table: LOD – limits of detection; The range of concentrations to be determined;  $S_r$  – relative standard deviation; GAE – Gallic Acid Equivalents; GA – Gallic Acid.

Исходные растворы соединений готовили растворением точных навесок реактивов в дистиллированной воде. Рабочие растворы готовили разбавлением исходных растворов.

*Способы СР-концентрирования фенола*

Для концентрирования фенола по методологии на основе «точки помутнения» применяли реакцию его с реактивом Фолина – Чокальтеу и  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  для получения мицеллярно-насыщенных фаз нПАВ на основе Тритона X-100. Для осуществления СР-экстракции применяли три типа высаливателей:  $\text{NaCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Растворы готовили общим объемом 5 мл.

*Способ 1:* в пробирку вносили водный раствор фенола 0,05 мл  $1 \cdot 10^{-3}$  М, реактив Фолина – Чокальтеу 0,5 мл 2 н.; тщательно перемешивали и оставляли пробирки на 5–8 мин; после добавляли 1,5 мл 20%-ного  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , разбавляли дистиллированной водой, тщательно все перемешивали и оставляли на 20–30 мин. Вводили 0,5 мл 20%-ного Тритона X-100 и от 0,02 до 2,3 мл 20%-ного  $\text{NaCl}$ , вновь перемешивали. Наблюдали за полученными растворами в течение 90 мин. Центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин. После отделяли мицеллярные фазы и измеряли их объемы.

*Способ 2 и способ 3* отличались от способа 1 заменой  $\text{NaCl}$  на 10%-ный  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и 40%-ный  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , в концентрационном интервале 0,04–4,6% и 0,16–18,4% соответственно.

*Спектрофотометрическое определение количественных характеристик экстракции фенола.* Распределение реагентов в водно-мицеллярной системе контролировали с помощью двухлучевого сканирующего спектрофотометра Shimadzu UV-1800 в спектральном диапазоне 200 – 1000 нм,  $l = 1$  см, при комнатной температуре. Для построения градуировочной зависимости готовили растворы с молярной концентрацией фенола в интервале  $7 \cdot 10^{-7} - 6 \cdot 10^{-5}$  М. В пробирки вносили водные растворы фенолов с концентрациями  $1 \cdot 10^{-3}$  и  $1 \cdot 10^{-4}$  М, реактив ФЧ 0,5 мл 2 н., 1,5 мл 20%-ного  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ; разбавляли дистиллированной водой, вносили 0,5 мл 20%-ного Тритона X-100 и 1,6 мл 10%-ного  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин. После разделения фаз отбирали мицеллярно-насыщенные фазы нПАВ и разбавляли их 2%-ным  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  и фотометрировали.

Для количественного определения эффективности извлечения фенола из разбавленных



мицеллярных фаз нПАВ Тритона X-100 рассчитывали степень извлечения ( $R$ , %):

$$R = \frac{D \cdot 100}{D + \frac{V_B}{V_0}}, \quad (1)$$

где  $D$  – коэффициент распределения;  $V_B$  – объем водной фазы;  $V_0$  – объем органической (мицеллярной фазы).

*Цветометрическое определение фенола и построение лепестковых диаграмм*

Для цветометрического определения фенола использовали графический редактор Adobe PhotoShop CC 2019. Необходимую окрашенную часть мицеллярно-насыщенной фазы нПАВ выделяли и с помощью функции усреднения определяли яркость цветовых каналов  $R$ ,  $G$ ,  $B$ . По полученным значениям строили градуировочные зависимости яркости цветового канала от логарифмов концентрации фенола.

Для качественного определения фенола полученные цветометрические данные представляли в виде лепестковых диаграмм с 7 осями, на которых откладывали цветовые координаты параметров  $RGBCMYK$ .

Для количественной оценки содержания фенола применяли геометрические параметры площадь ( $S$ ) и периметр ( $P$ ), которые рассчитывали по следующим формулам:

$$P = \sum \sqrt{a^2 + b^2 - 2ab \cdot \cos(ab)}, \quad (2)$$

$$S = \sum \left( \frac{1}{2} a \cdot b \cdot \sin(ab) \right), \quad (3)$$

где  $a$ ,  $b$  – стороны треугольника,  $\cos(ab)$  –  $\cos$  угла между сторонами  $a$ ,  $b$ ,  $\sin(ab)$  –  $\sin$  угла между сторонами  $a$ ,  $b$ .

### Результаты и их обсуждение

Реактив ФЧ широко используется в клинических исследованиях и для контроля питания при определении общего содержания полифенолов в продуктах растительного происхождения и биологических образцах. Первоначально этот способ был разработан для анализа белков, но позже усовершенствован Синглтоном, Ортофером и Ламуэлой – Равентос [13] для анализа фенольных компонентов в вине, после чего он стал обычным тестом для оценки антиоксидантности пищевых продуктов и растительных экстрактов [14].

В настоящее время реактив ФЧ широко используется для количественного определения полифенолов в экстрактах растительного происхождения, а также в пищевых продуктах и напитках [15].

Реактив ФЧ является основой колориметрического способа определения фенольных соединений, который основан на том, что содержащиеся в нём фосфовольфрамовые и фосфомолибденовые кислоты при восстановлении фенолами в щелочной среде образуют комплекс синего цвета (вольфрамовая синь), интенсивность окраски которого пропорциональна количеству фенолов (рис. 1) [16].

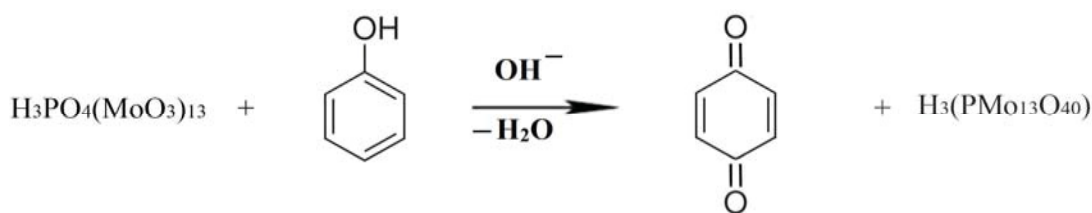


Рис. 1. Схема реакции взаимодействия реактива Фолина – Чокальтеу с фенолом

Fig. 1. Diagram of the interaction of the Folin – Chocalteu reagent with phenol

Нами предложена тест-система, которая позволяет концентрировать продукт взаимодействия полифенолов с реактивом ФЧ в мицеллярно-насыщенные фазы нПАВ с учетом методологии *cloud-point extraction*.

Классическая процедура СР-экстракции основана на способности нПАВ образовывать

мицеллярную фазу в водной среде при нагревании выше температуры помутнения или путем добавления соли (явление высаливания). Происходит разделение на две фазы: водную фазу (обедненная ПАВ) и обогащенную ПАВ фазу [17] (рис. 2).

Для определения оптимальных условий СР-экстракции фенола рассматривали три вида

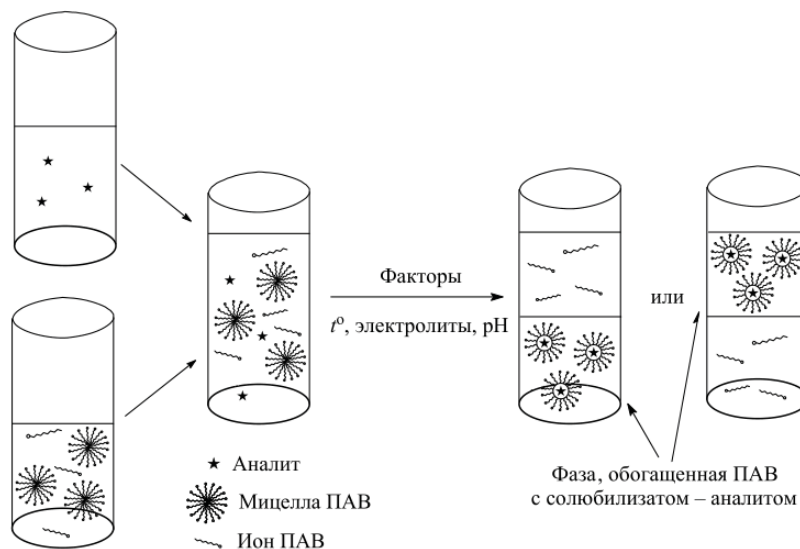


Рис. 2. Схема формирования мицеллярной фазы, насыщенной ПАВ и концентрирования в ней аналита в водных растворах [17]

Fig. 2. Scheme of formation of micellar phase saturated with surfactant and concentration of analyte in it in aqueous solutions [17]

высаливателей с разными исходными концентрациями: 20%-ный NaCl, 10%-ный  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 40%-ный  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Изучено влияния этих высаливателей на формирование мицеллярных фаз водных растворов Тритона X-100. Характер поведения систем изучали во времени (0–90 мин). Из полученных результатов (рис. 3) видно, что интенсивность яркости канала R повышается с увеличением кон-

центрации солей в первоначальный момент (0–5 мин), затем постепенно уменьшается во времени, что связано с образованием и укрупнением мицеллярных фаз нПАВ. Образование последних наблюдалось в интервалах концентраций высаливателей: NaCl (0,08–9,2%) и  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (0,04–4,6%). Для  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  образование фаз затруднено и отмечалось при концентрациях 0,16–7,2%.

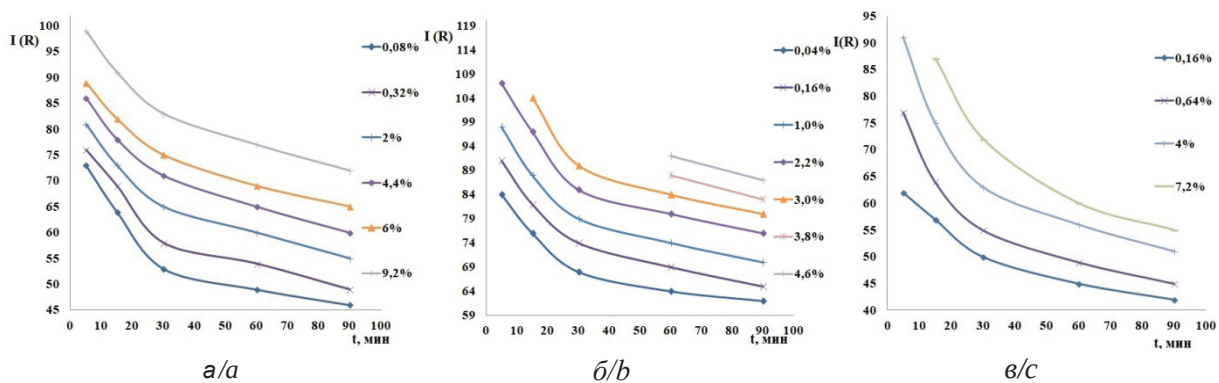


Рис. 3. Зависимость яркости канала R от времени (5–90 мин).  $C(\text{фенола}) = 1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ,  $C(\text{ФЧ}) = 0,2 \text{ н.}$ ,  $C(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 6\%$ ,  $C(\text{Тритон X-100}) = 2\%$ ; а –  $C(\text{NaCl}) = 0,08\text{--}9,2\%$ , б –  $C(\text{Na}_2\text{SO}_4) = 0,04\text{--}4,6\%$ , в –  $C((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4) = 0,16\text{--}7,2\%$  (цвет онлайн)

Fig. 3. The dependence on the brightness of channel R on time (5–90 minutes).  $C(\text{phenol}) = 1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ,  $C(\text{FCR}) = 0,2 \text{ n.}$ ,  $C(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 6\%$ ,  $C(\text{Triton X-100}) = 2\%$ ; а –  $C(\text{NaCl}) = 0,08\text{--}9,2\%$ , б –  $C(\text{Na}_2\text{SO}_4) = 0,04\text{--}4,6\%$ , в –  $C((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4) = 0,16\text{--}7,2\%$  (color online)

Для ускорения формирования мицеллярно-насыщенных фаз полученные растворы центрифугировали. После центрифугирования

отделяли мицеллярные фазы и строили зависимость объемов фаз от концентрации солей (рис. 4).

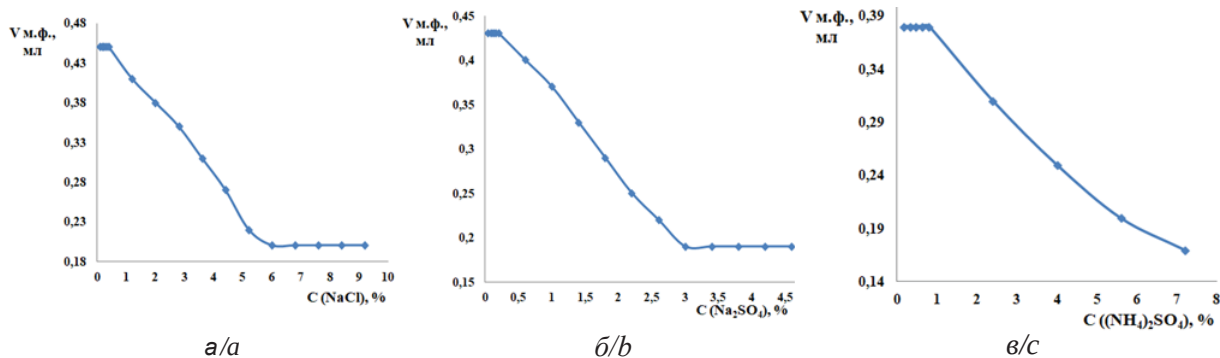


Рис. 4. Зависимость объема мицеллярных фаз от концентрации высаливателей.  $c(\text{фенола}) = 1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ,  $c(\text{ФЧ}) = 0,2 \text{ н.}$ ,  $c(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 6 \%$ ,  $c(\text{Тритон X-100}) = 2\%$ ; а –  $c(\text{NaCl}) = 0,08\text{--}9,2\%$ , б –  $c(\text{Na}_2\text{SO}_4) = 0,04\text{--}4,6\%$ , в –  $c((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4) = 0,16\text{--}7,2\%$   
 Fig. 4. Dependence of the volume of micellar phases on the concentration of salting agents.  $c(\text{phenol}) = 1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ,  $c(\text{FCR}) = 0,2 \text{ n.}$ ,  $c(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 6\%$ ,  $c(\text{Triton X-100}) = 2\%$ ; а –  $c(\text{NaCl}) = 0,08\text{--}9,2\%$ , б –  $c(\text{Na}_2\text{SO}_4) = 0,04\text{--}4,6\%$ , в –  $c((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4) = 0,16\text{--}7,2\%$

Добавление  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  не позволило в системе достичь фазового равновесия (см. рис. 4, в). С  $\text{NaCl}$  и  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (см. рис. 4, а, б) фазовое равновесие достигается при концентрациях 6 и 3% соответственно, о чем свидетельствует постоянный объем мицеллярной фазы при дальнейшем росте концентрации солей.

Поскольку добавка высаливателей не увеличивала скорость формирования мицелляр-

ных фаз, для дальнейших исследований выбран  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , в связи с его минимальными затратами (масса навески) по сравнению с  $\text{NaCl}$ . Оптимальная концентрация  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  составила 3,2%.

Полученные спектры поглощения системы фенол – реактив Фолина – Чокальтеу –  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  – Тритон X-100 –  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  представлены на рис. 5.

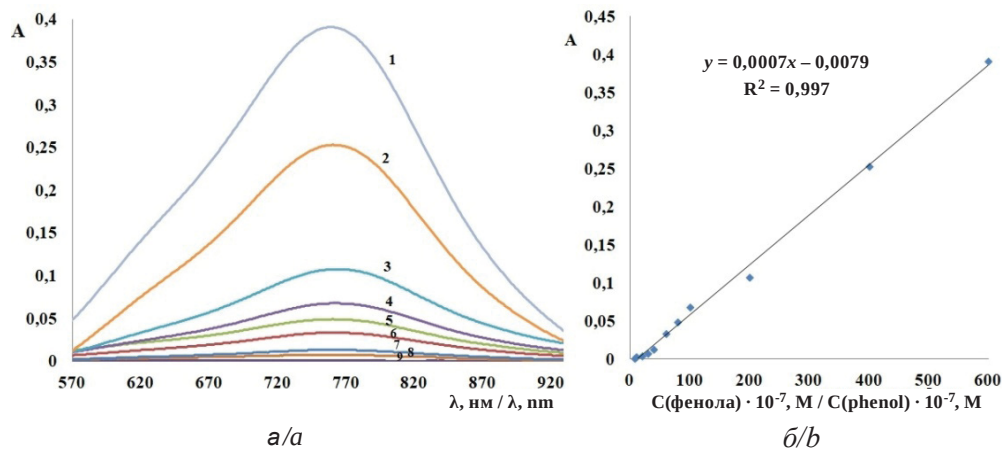


Рис. 5. Спектры поглощения системы фенол – реактив Фолина – Чокальтеу –  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  – Тритон X-100 –  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (относительно контрольного раствора).  $c(\text{ФЧ}) = 0,2 \text{ н.}$ ;  $c(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 6\%$ ;  $c(\text{Тритон X-100}) = 2\%$ ;  $c(\text{Na}_2\text{SO}_4) = 3,2\%$ ;  $c(\text{фенола}) = 1 - 6 \cdot 10^{-5}$ ;  $2 - 4 \cdot 10^{-5}$ ;  $3 - 2 \cdot 10^{-5}$ ;  $4 - 1 \cdot 10^{-5}$ ;  $5 - 8 \cdot 10^{-6}$ ;  $6 - 6 \cdot 10^{-6}$ ;  $7 - 4 \cdot 10^{-6}$ ;  $8 - 3 \cdot 10^{-6}$ ;  $9 - 7 \cdot 10^{-7} \text{ M}$  (а); б – зависимость  $A - c(\text{фенола})$

Fig. 5. Absorption spectra of the phenol – reagent Folin – Chocalteu –  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  – Triton X-100 –  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  system (relative to the control solution).  $c(\text{FCR}) = 0,2 \text{ n.}$ ;  $c(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 6\%$ ;  $c(\text{Triton X-100}) = 2\%$ ;  $c(\text{Na}_2\text{SO}_4) = 3,2\%$ ;  $c(\text{phenol}) = 1 - 6 \cdot 10^{-5}$ ;  $2 - 4 \cdot 10^{-5}$ ;  $3 - 2 \cdot 10^{-5}$ ;  $4 - 1 \cdot 10^{-5}$ ;  $5 - 8 \cdot 10^{-6}$ ;  $6 - 6 \cdot 10^{-6}$ ;  $7 - 4 \cdot 10^{-6}$ ;  $8 - 3 \cdot 10^{-6}$ ;  $9 - 7 \cdot 10^{-7} \text{ M}$  (a); б – dependence of  $A - c(\text{phenol})$

Спектры поглощения этой системы имеют один максимум при 760 нм (см. рис. 5, а), оптическая плотность которого возрастает с

увеличением концентрации фенола. Концентрацию экстрагированного фенола определяли по градуировочному графику, представленному на



рис. 5, б. Исходя из рис. 5, б установлен диапазон определяемых содержаний фенола, который составил  $7 \cdot 10^{-7} - 6 \cdot 10^{-5}$  М. Рассчитанные степени извлечения аналита достигает 99% (рис. 6).

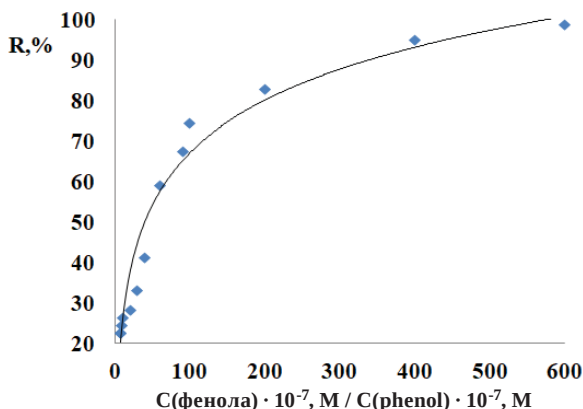


Рис. 6. Зависимость степени извлечения от концентрации фенола.  $c(\text{ФЧ}) = 0,2 \text{ н.}; c(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 6\%; c(\text{Тритон X-100}) = 2\%; c(\text{Na}_2\text{SO}_4) = 3,2\%; c(\text{фенола}) = 7 \cdot 10^{-7} - 6 \cdot 10^{-5} \text{ М}$

Fig. 6. Dependence of the degrees extracted on the concentrations phenol.  $c(\text{FCR}) = 0,2 \text{ n.}; c(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 6\%; c(\text{Triton X-100}) = 2\%; c(\text{Na}_2\text{SO}_4) = 3,2\%; c(\text{phenol}) = 7 \cdot 10^{-7} - 6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

Предложен цветометрический способ регистрации аналитического сигнала в исследуемой системе, который не требует разбавления мицеллярной фазы. Так, на рис. 7 представлена зависимость интенсивности канала R (оптимальный параметр цвета) от логарифма

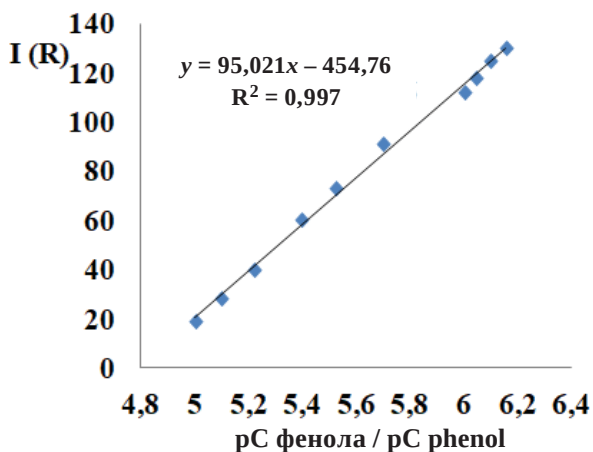


Рис. 7. Зависимость яркости канала R от логарифма концентрации фенола фенол – ФЧ –  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  – Тритон X-100 –  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .  $c(\text{ФЧ}) = 0,2 \text{ н.}; c(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 6\%; c(\text{Тритон X-100}) = 2\%; c(\text{Na}_2\text{SO}_4) = 3,2\%; c(\text{фенола}) = 7 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ М}$

концентрации фенола. Уравнение регрессии имеет вид  $y = 95,0x - 455$ , коэффициент корреляции  $R^2$  графической зависимости – 0,997. Диапазон определяемых содержаний фенола составил  $7 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5}$  М.

Оценку правильности результатов определения фенола с предварительным СР-концентрированием осуществляли методом «введено-найдено» по цветометрическому параметру R (табл. 2).

Таблица 2 / Table 2

**Результаты цветометрического определения фенола в модельном растворе ( $n = 3, P = 0,95$ )**  
**Results of colorometric determination of phenol in a model solution ( $n = 3, P = 0,95$ )**

№	Введено (М) / Introduced (M)	Найдено (М) / Found (M)	$X \pm \Delta X$ (М)	$S_p$ %
1	$8 \cdot 10^{-7}$	$8,37 \cdot 10^{-7}$	$(8,5 \pm 0,3) \cdot 10^{-7}$	1,4
2		$8,58 \cdot 10^{-7}$		
3		$8,58 \cdot 10^{-7}$		
1	$3 \cdot 10^{-6}$	$2,65 \cdot 10^{-6}$	$(2,7 \pm 0,1) \cdot 10^{-6}$	1,4
2		$2,65 \cdot 10^{-6}$		
3		$2,71 \cdot 10^{-6}$		
1	$8 \cdot 10^{-6}$	$7,26 \cdot 10^{-6}$	$(7,3 \pm 0,4) \cdot 10^{-6}$	2,4
2		$7,09 \cdot 10^{-6}$		
3		$7,43 \cdot 10^{-6}$		

Для качественного определения фенола полученные цветометрические данные представляли в виде лепестковых диаграмм (ЛД) с 7 и 3 осями, на которых отложены цветные координаты параметров RGBСМУК (рис. 8).

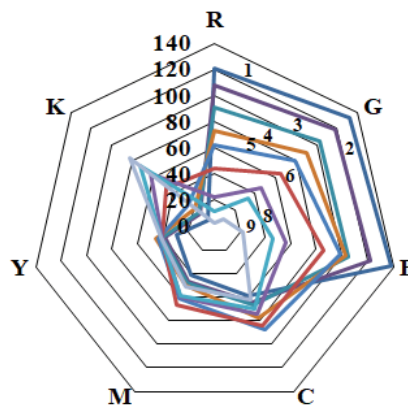


Рис. 8. Профили лепестковых диаграмм системы фенол – ФЧ –  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  – Тритон X-100 –  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .  $c(\text{фенола})$ : 1 –  $7 \cdot 10^{-7}$ ; 2 –  $1 \cdot 10^{-6}$ ; 3 –  $2 \cdot 10^{-6}$ ; 4 –  $3 \cdot 10^{-6}$ ; 5 –  $4 \cdot 10^{-6}$ ; 6 –  $6 \cdot 10^{-6}$ ; 7 –  $1 \cdot 10^{-5}$ ; 8 –  $2 \cdot 10^{-5}$ ; 9 –  $6 \cdot 10^{-5}$  М





Из рис. 8 видно, что профиль ЛД не изменяется при увеличении концентрации фенола, при этом возрастает его периметр и площадь.

На рис. 9 представлены зависимости площади ( $S$ ) и периметра ( $P$ ) ЛД от логарифма концентрации фенола. Линейность градуиро-

вочных зависимостей наблюдалась в пределах  $7 \cdot 10^{-7} - 6 \cdot 10^{-5}$  М, уравнение регрессии и величины достоверностей аппроксимации, представленные на рис. 9, имеют вид: периметр ( $P$ )  $y = 150x - 284$ ;  $R^2 = 0,994$ ; площадь ( $S$ )  $y = 17700x - 66930$ ;  $R^2 = 0,994$ .

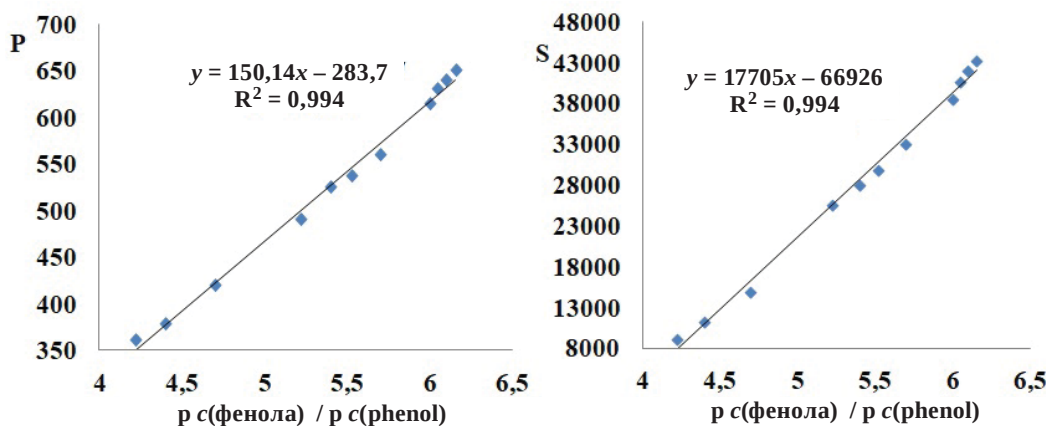


Рис. 9. Зависимость периметра ( $P$ ) и площади ( $S$ ) лепестковых диаграмм от  $pc(\text{фенола})$

Fig. 9. Dependence of the perimeter ( $P$ ) and area ( $S$ ) of the petal diagrams on  $pc(\text{phenol})$

Таким образом, методология СР-концентрирования вольфрамовой сини с использованием систем на основе неионного ПАВ (Тритон Х-100) позволяет проводить цветометрическое определение фенола с пониженным пределом обнаружения в интервале концентраций  $1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5}$  М с погрешностью определения не более 3%.

### Выводы

1. Впервые исследована микроэкстракция комплекса вольфрамовой сини, образованного по реакции фенола с реактивом Фолина – Чокальтеу (ФЧ) в присутствии неионного ПАВ Тритона Х-100 в щелочной среде с применением методологии экстракции на основе «точки помутнения». Установлены оптимальные условия мицеллярной экстракции фенола в системе: ФЧ (0,2 н.) –  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (6%) – Тритон Х-100 (2%) –  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (3,2%).

2. Показано, что мицеллярно-насыщенные фазы Тритона Х-100 эффективно экстрагируют аналитическую форму (комплекс вольфрамовой сини) и могут быть предложены для экстракционно-спектрофотометрического определения фенола ( $\lambda_{\text{макс}} = 760$  нм;  $y = 0,0007x - 0,0079$ ,  $R^2 = 0,997$ , ДОС =  $7 \cdot 10^{-7} - 6 \cdot 10^{-5}$  М).

3. Разработана оригинальная тест-методика цветометрического определения фенола

(канал R):  $y = 95,021x - 454,76$ ;  $R^2 = 0,997$ . ДОС =  $7 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5}$  М. Для количественной оценки содержания фенола наряду с цветометрическими R, G, B, применяли также геометрические параметры полученных лепестковых диаграмм: площадь ( $S$ ) и периметр ( $P$ ): (периметр ( $P$ )  $y = 150,14x - 283,7$ ;  $R^2 = 0,994$ ; площадь ( $S$ )  $y = 17705x - 66926$ ;  $R^2 = 0,994$ ).

### Список литературы

1. Потенко Е. И., Жукова Н. И., Арефьева О. Д. Фенольные соединения в поверхностных и питьевых водах Приморского края // Вестник ДВО РАН. 2018. № 5 (201). С. 120–123. <https://doi.org/10.25808/08697698.2018.201.5.017>
2. Семенова Т. С., Соловей В. Н. Определение фенолов в воде и методы их удаления // Традиции и инновации: материалы науч. конф., посвящ. 189-й годовщине образования СПбГТИ, СПб., 30 ноября – 1 декабря 2017 г. СПб.: СПбГТИ, 2017. С. 234.
3. Бельтюкова С. В., Бычкова А. А. Биологически активные полифенолы и методы их определения. // Пищевая наука и технология. 2013. № 3. С. 18–25.
4. Аджиахметова С. Л., Червоная Н. М., Поздняков Д. И., Оганесян Э. Т. Содержание фенолов (в том числе флавоноидов) и антиоксидантов в листьях *Viscum album* L. и *Pyrus communis* L. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2021. Т. 24, № 2. С. 15–22. <https://doi.org/10.29296/25877313-2021-02-03>



5. Коваленко С. А., Файзиев А. В., Сысоева М. А. Практическое применение экстракта *Empetrum nigrum* в пивоварении // Индустрия питания. 2022. Т. 7, № 3. С. 59–64. <https://doi.org/10.29141/2500-1922-2022-7-3-7>
6. Денисенко Т. А., Вишник А. Б., Цыганок Л. П. Особенности взаимодействия 18-молибдодифосфата и реактива Фолина – Чокальтеу с фенольными соединениями // Аналитика и контроль. 2015. Т. 19, № 3. С. 242–251. <https://doi.org/10.15826/analitika.2015.19.3.001>
7. Vázquez C. V., Rojas M. G., Ramírez C. A., Chávez-Servín J. L., García-Gasca T., Ferriz Martínez R. A., García O. P., Rosado J. L., López-Sabater C. M., Castellote A. I., Montemayor H. M., de la Torre Carbot K. Total phenolic compounds in milk from different species. Design of an extraction technique for quantification using the Folin Ciocalteu method // Food Chemistry. 2015. Vol. 176. P. 480–486. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.050>
8. Pavun L., Durdevic P., Jelikic-Stankov M., Dikanivic D., Uskokovic-Markovic S. Determination of flavonoids and total polyphenol contents in commercial apple juices // Czech Journal of Food Sciences. 2018. Vol. 36, № 3. P. 233–238. <https://doi.org/10.17221/211/2017-CJFS>
9. Николаева Т. Н., Лапшин П. В., Загоскина Н. В. Метод определения суммарного содержания фенольных соединений в растительных экстрактах с реактивом Фолина – Дениса и реактивом Фолина – Чокальтеу: модификация и сравнение // Химия растительного сырья. 2021. № 2. С. 291–299. <https://doi.org/10.14258/jcrim.2021028250>
10. Вершинин В. И., Белова Е. В. Определение суммарного содержания фенольных антиоксидантов в модельных смесях по методу Фолина – Чокальтеу и по методу FRAP // Аналитика и контроль. 2019. Т. 23, № 3. С. 314–322. <https://doi.org/10.15826/analitika.2019.23.3.008>
11. Цюпко Т. Г., Тищенко Е. А., Воронова О. Б. Спектрофотометрическая оценка железовосстанавливающей способности растворимого кофе // Аналитика и контроль. 2016. Т. 20, № 4. С. 320–329. <https://doi.org/10.15826/analitika.2016.20.4.003>
12. Adegbusi H. S., Ismail A., Mohd Esa N., Azuan Mat Daud Z. Application of Folin-Ciocalteu colorimetric method in the determination of total tannin in maize and soybean food products // International Food Research Journal. 2022. Vol. 29, iss. 5. P. 1110–1119. <https://doi.org/10.47836/ifrj.29.5.13>
13. Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent // Methods Enzymol. 1999. Vol. 299. P. 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
14. Munteanu I. G., Apetrei C. Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review // Int. J. Mol. Sci. 2021. Vol. 22, № 7. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
15. Apak R., Capanoglu E., Shahidi F. Measurement of Antioxidant Activity and Capacity: Recent Trends and Applications. John Wiley & Sons Ltd. : Hoboken, NJ, USA, 2018. 337 p. <http://doi.org/10.1002/9781119135388>
16. Sánchez-Rangel, Juan Carlos and Benavides, Jorge and Heredia, J. Basilio and Cisneros-Zevallos, Luis and Jacobo-Velázquez, Daniel A. The Folin – Ciocalteu assay revisited: Improvement of its specificity for total phenolic content determination // Analytical Methods. 2013. Vol. 5, iss. 21. P. 5990–5999. <https://doi.org/10.1039/C3AY41125G>
17. Чернова П. К., Доронин С. Ю. Определение органических аналитов в растворах ПАВ : ионные и мицеллярные эффекты. Саратов : Изд-во Саратовского университета, 2017. 200 с.

## References

1. Potenko E. I., Zhukova N. I., Arefyeva O. D. Phenolic compounds in surface and drinking waters of Primorsky Krai. *Bulletin of the DVO RAN*, 2018, no. 5 (201), pp. 120–123 (in Russian). <https://doi.org/10.25808/08697698.2018.201.5.017>
2. Semenova T. S., Solovey V. N. Determination of phenols in water and methods of their removal. In: *Traditions and Innovations: Proceeding of the Scientific Conference Dedicated to the 189<sup>th</sup> Anniversary of the St. Petersburg State Institute of Technology (St. Petersburg, November 30 – December 1, 2017)*. St. Petersburg, 2017, pp. 234 (in Russian).
3. Belyukova S. V., Bychkova A. A. Biologically active polyphenols and methods of their determination. *Food Science and Technology*, 2013, no. 3, pp. 18–25 (in Russian).
4. Adjakhmetova S. L., Chervonnaya N. M., Pozdnyakov D. I., Oganeyan E. T. The content of phenols (including flavonoids) and antioxidants in the leaves of *Viscum album* L. and *Pyrus communis* L. *Questions of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry*, 2021, vol. 24, no. 2, pp. 15–22 (in Russian). <https://doi.org/10.29296/25877313-2021-02-03>
5. Kovalenko S. A., Fayziev A. S., Sysoeva M. A. Practical application of *Empetrum nigrum* extract in brewing. *Industrialization of Nutrition*, 2022, vol. 7, no. 3, pp. 59–64 (in Russian). <https://doi.org/10.29141/2500-1922-2022-7-3-7>
6. Denisenko T. A., Vishnikin A. B., Tsyganok L. P. Features of interaction of 18-molybdenum diphosphate and Folin – Chokalteu reagent with phenolic compounds. *Analytica and Control*, 2015, vol. 19, no. 3, pp. 242–251 (in Russian). <https://doi.org/10.15826/analitika.2015.19.3.001>
7. Vázquez C. V., Rojas M. G., Ramírez C. A., Chávez-Servín J. L., García-Gasca T., Ferriz Martínez R. A., García O. P., Rosado J. L., López-Sabater C. M., Castellote A. I., Montemayor H. M., de la Torre Carbot K. Total phenolic compounds in milk from different species. Design of an extraction technique for quantification



- using the Folin Ciocalteu method. *Food Chemistry*, 2015, vol. 176, pp. 480–486. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.050>
8. Pavun L., Durdevic P., Jelkic-Stankov M., Dikanivic D., Uskokovic-Markovic S. Determination of flavonoids and total polyphenol contents in commercial apple juices. *Czech Journal of Food Sciences*, 2018, vol. 36, no. 3, pp. 233–238. <https://doi.org/10.17221/211/2017-CJFS>
  9. Nikolaeva T. N., Lapshin P. V., Zagorskina N. V. Method for determining the total content of phenolic compounds in plant extracts with Folin-Denis reagent and Folin – Chokalteu reagent: modification and comparison. *Chemistry of Plant Raw Materials*, 2021, no. 2, pp. 291–299 (in Russian). <https://doi.org/10.14258/jcpim.2021028250>
  10. Vershinin V. I., Belova E. V. Determination of the total content of phenolic antioxidants in model mixtures by the Folin-Chocalteu method and by the FRAP method. *Analytics and Control*, 2019, vol. 23, no. 3, pp. 314–322 (in Russian). <https://doi.org/10.15826/analitika.2019.23.3.008>
  11. Tsyupko T. G., Tishchenko E. A., Voronova O. B. Spectrophotometric assessment of the iron–reducing ability of instant coffee. *Analytics and Control*, 2016, vol. 20, no. 4, pp. 320–329 (in Russian). <https://doi.org/10.15826/analitika.2016.20.4.003>
  12. Adegbusi H. S., Ismail A., Mohd Esa N., Azuan Mat Daud Z. Application of Folin – Ciocalteu colorimetric method in the determination of total tannin in maize and soybean food products. *International Food Research Journal*, 2022, vol. 29, iss. 5, pp. 1110–1119. 10p. <https://doi.org/10.47836/ifrj.29.5.13>
  13. Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.*, 1999, vol. 299, pp. 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
  14. Munteanu I. G., Apetrei C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, vol. 22, no. 7. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
  15. Apak R., Capanoglu E., Shahidi F. *Measurement of Antioxidant Activity and Capacity: Recent Trends and Applications*. John Wiley & Sons Ltd. Hoboken, NJ, USA, 2018. 337 p. <http://doi.org/10.1002/9781119135388>
  16. Sánchez-Rangel, Juan Carlos and Benavides, Jorge and Heredia, J. Basilio and Cisneros-Zevallos, Luis and Jacobo-Velázquez, Daniel A. The Folin – Ciocalteu assay revisited: Improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods*, 2013, vol. 5, iss. 21, pp. 5990–5999. <https://doi.org/10.1039/C3AY41125G>
  17. Chernova R. K., Doronin S. Yu. *Opređenje organičeskih analitov v rastvorakh PAV: ionnye i mitseľnyarne efekty* [Determination of Organic Analytes in Surfactant Solutions: Ionic and Micellar Effects]. Saratov, Saratov State University Publ., 2017. 200 p. (in Russian).

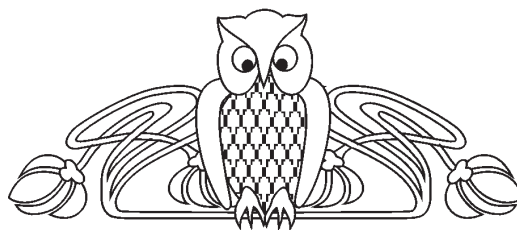
Поступила в редакцию 22.05.2023; одобрена после рецензирования 02.06.2023; принята к публикации 05.06.2023  
The article was submitted 22.05.2023; approved after reviewing 02.06.2023; accepted for publication 05.06.2023



Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 3. С. 299–307  
*Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2023, vol. 23, iss. 3, pp. 299–307  
<https://ichbe.sgu.ru> <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-3-299-307>, EDN: UTDGYI

Научная статья  
УДК 547.875

## Превращения замещенных цианоиминооктагидрохиназолинов в условиях окисления



Д. А. Пузанов , А. Е. Скляр, М. В. Коненкова, А. П. Кривенько

Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Россия, 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, д. 83

Пузанов Даниил Александрович, магистрант кафедры органической и биоорганической химии Института химии, [daniilpuzanov27@gmail.com](mailto:daniilpuzanov27@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0003-34017970>

Скляр Анна Евгеньевна, аспирант кафедры органической и биоорганической химии Института химии, [annasklyar2502@gmail.com](mailto:annasklyar2502@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0001-7272-4575>

Коненкова Марина Вячеславовна, студент кафедры органической и биоорганической химии Института химии, [konenkova01@mail.ru](mailto:konenkova01@mail.ru)

Кривенько Адел Павловна, доктор химических наук, профессор, профессор кафедры органической и биоорганической химии Института химии, [krivenko@info.sgu.ru](mailto:krivenko@info.sgu.ru), <https://orcid.org/0000-0003-3277-4556>

**Аннотация.** Замещенные хинолины различной степени насыщенности и функционализации обладают широким спектром биологической активности, в частности, противораковой активностью, что предопределяет значимость получения новых представителей этого типа соединений и изучение их практически полезных свойств. В литературе описано мало способов получения 2-цианоиминохиназолинов, в то время как их свойства и реакции окисления не изучены вовсе. Была проанализирована устойчивость таутомерных форм 2-цианоиминохиназолинов, определена истинная энергия активации их образования с использованием квантово-химических расчетов, изучено их превращение под действием сильных окислителей ( $\text{CrO}_3/\text{AcOH}$ ,  $\text{NaNO}_2/\text{AcOH}$ ). При окислении протекает избирательная ароматизация азогетероцикла и гидролиз  $-\text{CN}$ -группы с образованием 2-аминокарбамоилхиназолина. Увеличение температуры с 120 до 160° С (при использовании  $\text{CrO}_3$ ) привело к формированию 2-нитрозохиназолина. Строение новых полученных нами веществ установлено спектральными методами (ИК-, ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC, NOESY), предложена схема их образования.

**Ключевые слова:** цианоиминохиназолины, окисление, 2-аминокарбамоилхиназолин, 2-нитрозохиназолин, таутомерные формы, энергия активации, спектры, квантово-химический расчет

**Для цитирования:** Пузанов Д. А., Скляр А. Е., Коненкова М. В., Кривенько А. П. Превращения замещенных цианоиминооктагидрохиназолинов в условиях окисления // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 3. С. 299–307. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-3-299-307>, EDN: UTDGYI

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0)

Article

### Transformations of substituted cyanoiminoctahydroquinazolines under oxidation conditions

Д. А. Пузанов , А. Е. Sklyar, М. V. Konenkova, А. P. Krivenko

Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia

Daniil A. Puzanov, [daniilpuzanov27@gmail.com](mailto:daniilpuzanov27@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0003-3401-7970>

Anna E. Sklyar, [annasklyar2502@gmail.com](mailto:annasklyar2502@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0001-7272-4575>

Marina V. Konenkova, [konenkova01@mail.ru](mailto:konenkova01@mail.ru)

Adel P. Krivenko, [krivenko@info.sgu.ru](mailto:krivenko@info.sgu.ru), <https://orcid.org/0000-0003-3277-4556>

**Abstract.** Substituted quinazolines of various degrees of saturation and functionalization possess a wide spectrum of biological activity, in particular, anticancer activity, which predetermines the importance of obtaining new representatives of this type of compounds and studying their practically useful properties. Methods for the preparation of 2-cyanoiminoquinazolines are poorly described in the literature, while their properties and oxidation reactions have not been studied at all. We have analyzed the stability of tautomeric forms of 2-cyanoiminoquinazolines, determined the activation energy of their formation using quantum-chemical calculations, studied their transformation under the action of strong oxidants ( $\text{CrO}_3/\text{AcOH}$ ,  $\text{NaNO}_2/\text{AcOH}$ ). Selective aromatization of the azoheterocycle and hydrolysis of the  $-\text{CN}$ -group to form 2-aminocarbamoylquina-



zoline occurred during oxidation. An increase in temperature from 120 to 160° C (using CrO<sub>3</sub>) resulted in the formation of 2-nitrosoquinazoline. The structure of our new obtained substances was established by spectral methods (IR, <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR, HSQC, NOESY), a scheme of their formation has been proposed.

**Keywords:** cyanoiminoquinazolines, oxidation, 2-aminocarbamoylquinazoline, 2-nitrosoquinazoline, tautomeric forms, activation energy, spectra, quantum chemical calculation

**For citation:** Puzanov D. A., Sklyar A. E., Konenkova M. V., Krivenko A. P. Transformations of substituted cyanoiminooctahydroquinazolines under oxidation conditions. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2023, vol. 23, iss. 3, pp. 299–307 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-3-299-307>, EDN: UTDGYI

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC-BY 4.0)

## Введение

2-Цианоиминохиназолины являются структурными аналогами природных алкалоидов, используемых ранее в Китае для лечения рака органов пищеварительного тракта [1], а также синтетических веществ, имеющих схожие фармакофорные фрагменты, проявляющих широкий спектр противоопухолевой активности, в частности против рака молочной железы и легких [2–5].

Превращения 2-цианоиминооктахиназолинов в условиях окисления не были изучены, а единственный пример окисления родственно-построенных 2-цианоимино-1,3-Н-дигидропиримидинов [6, 7] основан на действии MnO<sub>2</sub> в нейтральной среде (E<sub>0</sub> = –0.050 V). Реакция приводит к ароматизации дигидропиримидинового цикла с трансформацией цианоиминогруппы, приводящей к образованию 2-аминокарбамоил пиримидина (при 80° C) и 2-аминопиримидина (при 144° C).

Нами впервые осуществлено окисление 2-цианоиминохиназолинов под действием более сильных окислителей (CrO<sub>3</sub>/AcOH, NaNO<sub>2</sub>/AcOH), что привело к образованию 2-аминокарбамоил- или 2-нитрозохиназолинов, строение которых установлено спектральными методами.

С помощью квантово-химических расчетных методов установлена наиболее стабильная таутомерная форма цианоиминохиназолинов, предложена энергетическая диаграмма их образования и определена вероятная биологическая активность субстратов и продуктов окисления при использовании предикт программы PASS.

## Материалы и методы

Элементный анализ выполнен на CHNS-анализаторе Elementar Vario Micro cube (Elementar Analysensystem GmbH, Германия). Спектры ЯМР <sup>1</sup>H (400 МГц) и <sup>13</sup>C (100 МГц) регистрировались на спектрометре Varian 400 (Varian, США) внутренний стандарт – ТМС. Контроль за

ходом реакций осуществлялся методом ТСХ на пластинках Alugram® Sul G UV254 (Marcherey-Nagel GmbH & Co. KG, Германия), элюент гексан-этилацетат-хлороформ (5:1:1).

ИК-спектры сняты на ИК-фурье-спектрометре ФСМ-1201 в таблетках KBr.

Квантово-химический расчет проводился на основе программного пакета GAMESS Firefly на базе 6-31G\*\* [DFT/B3LYP].

## 8-бензилиден-4-фенил-2-аминокарбамоил-5,6,7,8-тетрагидрохиназолин (8)

**Метод А:** 0.51 г (1,5 ммоль) 8-бензилиден-4-фенил-2-цианоимино-1,2,3,4,5,6,7,8-октагидрохиназолина (**1**), 0.15 г (0.75 ммоль) хромового ангидрида, 7 мл AcOH глас смешивают и кипятят при 120 °C 1.5 ч. Окончание реакции фиксируется по окрашиванию раствора в зелёный цвет (выделение Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). При добавлении к образующейся массе 25 мл воды, выпадает осадок, который промывают водой до нейтральной реакции и сушат на воздухе.

Выход 0.21 г (63%). Кристаллы желтого цвета, T<sub>пл</sub> 114–116 °C. Rf (5:1:1) 0.67.

ЯМР <sup>1</sup>H, δ, м.д.: 1.78–2.10 (m, 2H<sup>6</sup>, CH<sub>алицикл</sub>), 1.87–2.84 (m, 2H<sup>7</sup>, CH<sub>алицикл</sub>), 2.93–3.00 (m, 2H<sup>5</sup>, CH<sub>алицикл</sub>), 5.40 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 8.03 (s, 1H, CH<sub>олефин</sub>), 7.32–7.60 (m, 10H, CH<sub>Аг</sub>), 9.12 (s, 1H, NH).

Найдено, %: C 73,87; H 5.09; N 15.61. C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O. Вычислено, %: C 74.14; H 5.66; N 15.72.

**Метод Б:** 0.10 г (0,29 ммоль) 8-бензилиден-4-фенил-2-цианоимино-1,2,3,4,5,6,7,8-октагидрохиназолин (**1**), 0.80 г (1.16 ммоль) нитрита натрия, 3.5 мл AcOH глас. смешивают и выдерживают при постоянном перемешивании и температуре 20° C 24 ч. Контроль реакции осуществляют по окончанию выделения бурого газа NO<sub>2</sub>. При добавлении к образующейся массе 25 мл воды выпадает осадок, который промывают водой до нейтральной реакции и сушат на воздухе.



Выход 0.27 г (75 %). Кристаллы желтого цвета,  $T_{пл}$  114–116 °С. Rf (5:1:1) 0.67.

**8-(4-метоксифенилметилден)-4-(4-метоксифенил)-2-нитрозо-5,6,7,8-тетрагидрохиназолин (9)**

Получен аналогично методу А при 160 °С.

Выход 0.27 г (90%). Кристаллы жёлтого цвета,  $T_{пл}$  149–150 °С. Rf (5:1:1) 0.80.

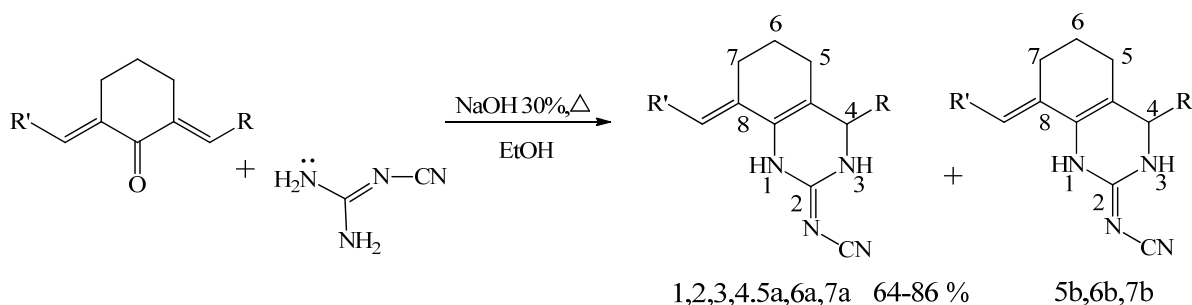
ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м.д.: 1.20–1.25 (м, 2H<sup>6</sup>, CH<sub>алицикл</sub>), 1.77–1.84 (м, 2H<sup>7</sup>, CH<sub>алицикл</sub>), 2.91–2.93 (м, 2H<sup>5</sup>, CH<sub>алицикл</sub>), 6.95 (с, 1H, CH<sub>олефин</sub>), 7.26–7.76 (м, 8H, CH<sub>Ar</sub>).

ЯМР  $^{13}\text{C}$ ,  $\delta$ , м.д.: 22.03 (C<sup>7</sup>), 25.37 (C<sup>6</sup>), 28.53 (C<sup>5</sup>), 55.33 (C<sup>4</sup>), 113.88 (C<sup>2</sup>), 128.73 (=C-H), 132.25–136.54 (Ar).

Найдено, %: С 70.98; Н 5.84; N 11.02. C<sub>23</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>. Вычислено, %: С 71.30; Н 5.46; N 10.85.

**Результаты и их обсуждение**

Ранее нами осуществлен синтез 2-цианоиминооктогидрохиназолинов 1–7 при взаимодействии цианоганидина и диенонов циклогексанового ряда в условиях основного катализа (рис. 1) [8]:



R,R' = Ph (**1**), 4-CH<sub>3</sub>O-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**2**), 3,4-CH<sub>3</sub>O-C<sub>6</sub>H<sub>3</sub> (**3**), 2-furil (**4**), R = Ph, R' = 4-CH<sub>3</sub>O-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**5a**), R = 4-CH<sub>3</sub>O-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, R' = Ph (**5b**), R = 4-CH<sub>3</sub>O-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, R' = 2-furil (**6a**), R = 2-furil, R' = 4-CH<sub>3</sub>O-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**6b**), R = 4-Cl-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, R' = 5-CH<sub>3</sub>-furil (**7a**), R = 5-CH<sub>3</sub>-furil, R' = 4-Cl-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**7b**),

Рис. 1. Схема образования 2-цианоиминооктогидрохиназолинов (1–7)

Fig. 1. Scheme of formation of 2-cyanoiminoquinazolines (1–7)

Существование полученных соединений 1–7 возможно в 4-таутомерных формах А–D

(рис. 2), аналогично родственно-построенным 2-цианоиминодигидропиримидинам [9, 10]:

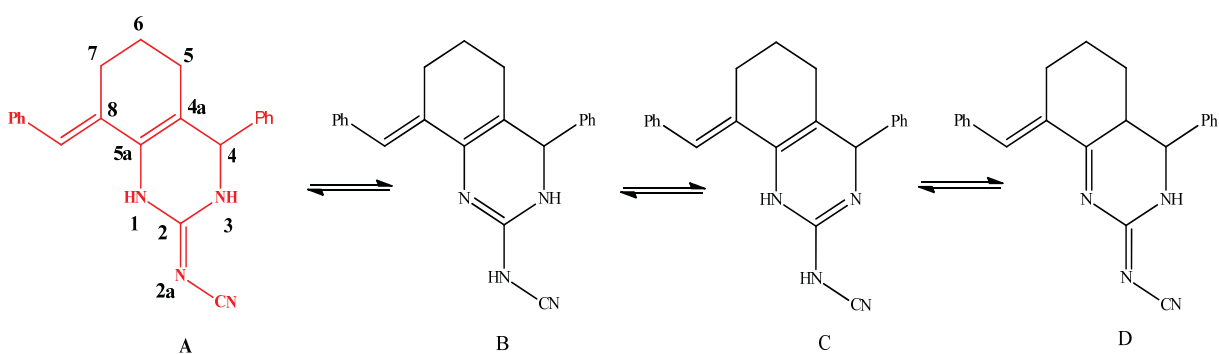


Рис. 2. Таутомерные формы А–D 8-бензалиден-4-фенил-2-цианоиминохиназолина (1)

Fig. 2. Tautomeric forms A–D 8-benzalidene-4-phenyl-2-cyanoiminoquinazolinone (1)

Рассчитанные нами (6-31G\*\*/B3LYP) потенциальные относительные энергии:  $E_{отн.} = 0.000$  ккал/моль для формы (A), 20.707 ккал/моль для формы (B), 23.845 ккал/моль для формы (C), 7.530 ккал/моль для формы (D) указы-

вают на наибольшую стабильность таутомера А, возможно, из-за кросс-сопряжения в гетероциклическом фрагменте и наиболее равномерной делокализации электронной плотности.



Строение таутомера **A** подтверждено корреляциями  $H^3/H^4$  и  $H^1/H^3$  протонов в NOESY-спектре (рис. 3):

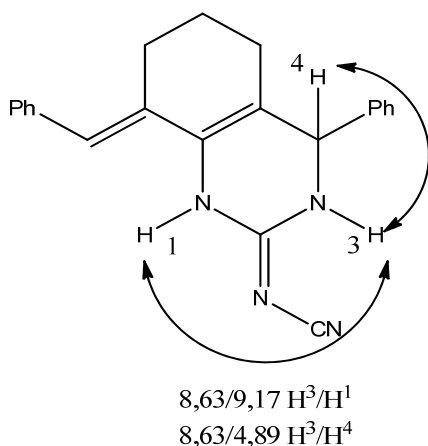


Рис. 3. Корреляции  $H^3/H^4$  и  $H^1/H^3$  протонов в NOESY-спектре 8-бензалиден-4-фенил-2-цианоиминохиназолина (**1**)  
Fig. 3. Correlations of  $H^3/H^4$  and  $H^1/H^3$  protons in the NOESY-spectrum of 8-benzalidene-4-phenyl-2-cyanoiminoquinazoline (**1**)

Вероятная схема образования (рис. 4) 2-цианоиминохиназолинов, включающая первоначальную конденсацию Михаэля, последующую N-циклизацию с формированием активированного комплекса **C**, была проанализирована с использованием метода линейного синхронного транзита (TS) с целью определения истинной энергии активации (рис. 5).

В соответствии с расчетными данными, в ходе реакции образуются два активированных комплекса **A** и **C** с энергиями образования – 566.75 и 562.23 кДж/моль соответственно, а соединение **B** – переходное состояние. Изменение энтальпии реакции  $\Delta H = 171,97$  кДж/моль свидетельствует об эндотермичности процесса.

2-Цианоиминохиназолины **1**, **2** были введены в реакцию окисления с использованием различных реагентов ( $CrO_3/AcOH_{glac.}$ ,  $NaNO_2/AcOH_{glac.}$ ) (рис. 6), которые ранее хорошо зарекомендовали себя в реакциях родственно-построенных азолцикланохиназолинов [11].

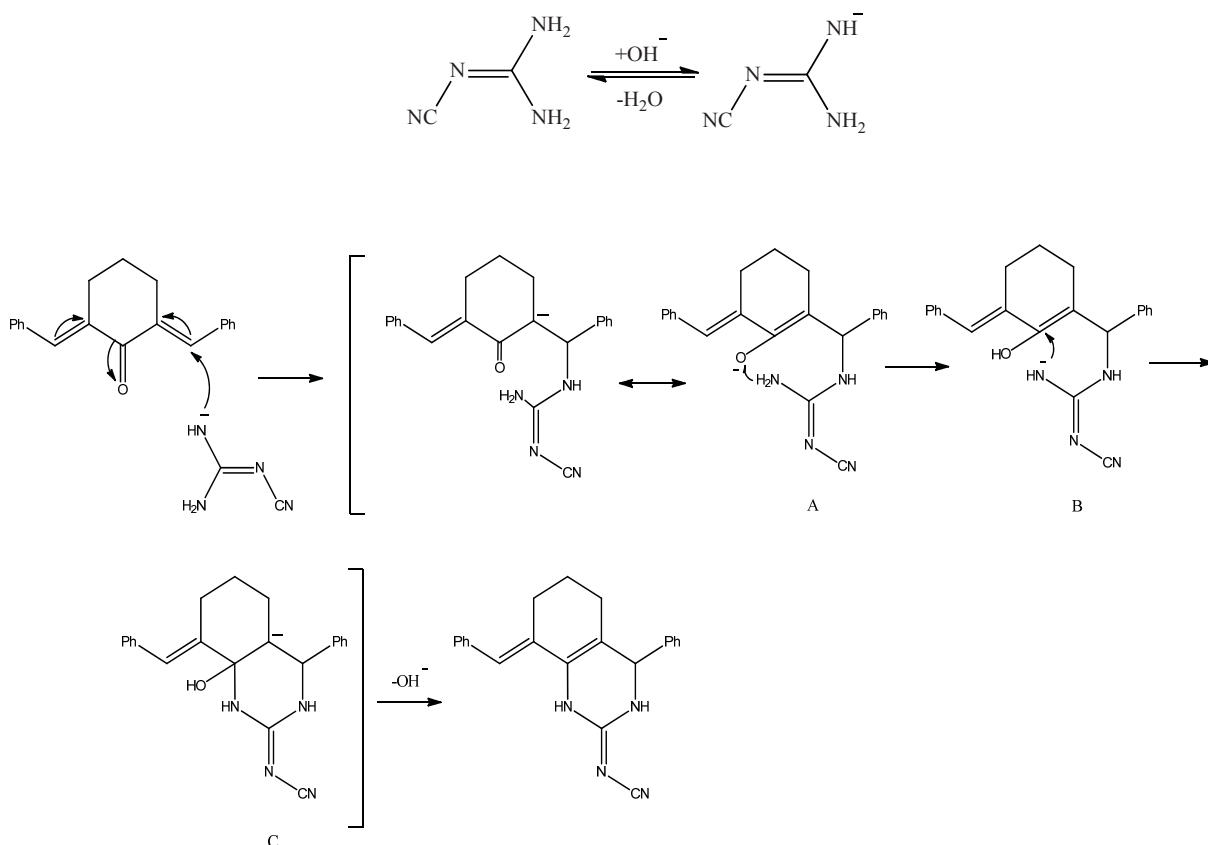


Рис. 4. Предположительный механизм образования 2-цианоиминохиназолинов на примере 8-бензалиден-4-фенил-2-цианоиминохиназолина (**1**)

Fig. 4. Probable mechanism of formation of 2-cyanoiminoquinazolines by the example of 8-benzalidene-4-phenyl-2-cyanoiminoquinazoline (**1**)

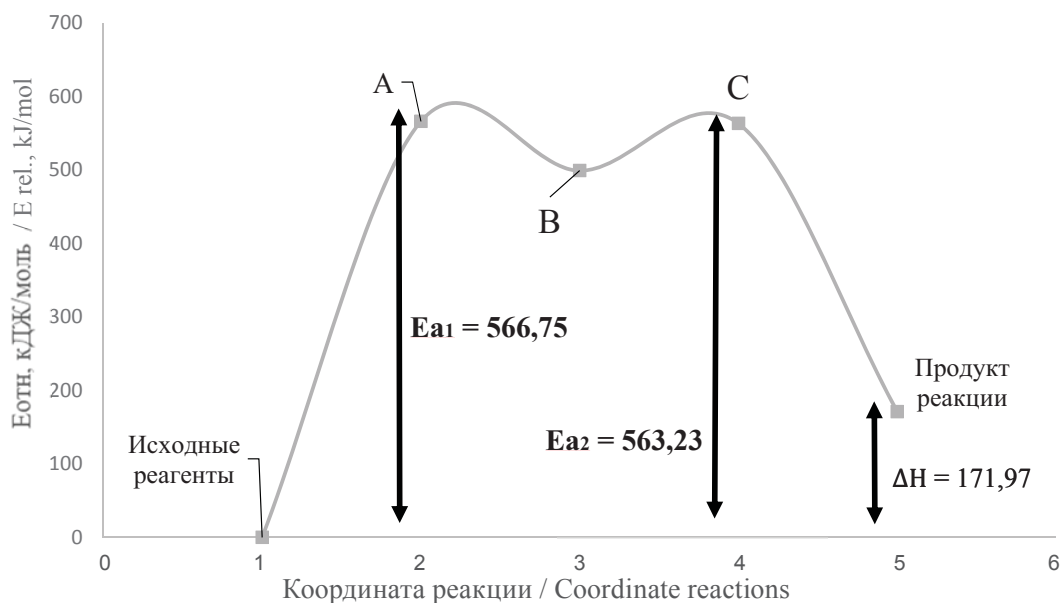
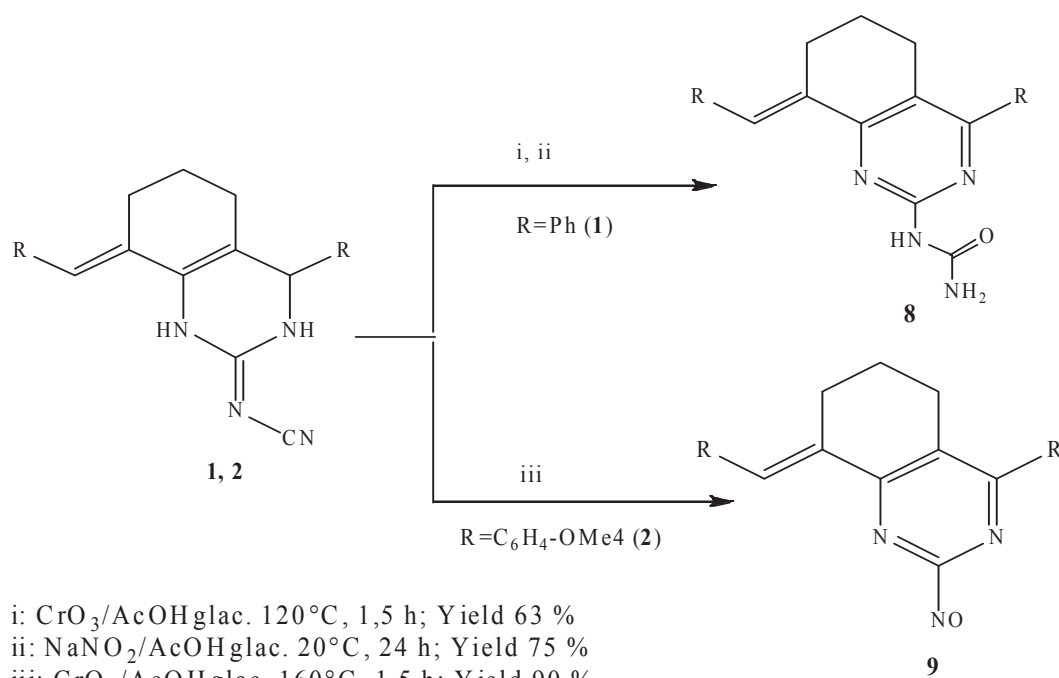


Рис. 5. Энергетический профиль реакции образования 2-цианоиминооктагидрохиназолинов на примере 8-бензалиден-4-фенил-2-цианоиминохиназолина (1)

Fig. 5. Energy profile of the reaction of the formation of 2-cyanoimino-octahydroquinazolines by the example of 8-benzalidene-4-phenyl-2-cyanoiminoquinazoline (1)



i: CrO<sub>3</sub>/AcOH<sub>glac</sub>. 120 °C, 1,5 h; Yield 63 %  
 ii: NaNO<sub>2</sub>/AcOH<sub>glac</sub>. 20 °C, 24 h; Yield 75 %  
 iii: CrO<sub>3</sub>/AcOH<sub>glac</sub>. 160 °C, 1,5 h; Yield 90 %

Рис. 6. Схема образования 8-бензалиден-4-фенил-2-аминокарбамоилхиназолина (8) и 8-(4-метокси-фенил)метилен-4-(4-метоксифенил)-2-нитрозохиназолина (9)

Fig. 6. Scheme of formation of 8-benzalidene-4-phenyl-2-aminocarbonylquinazoline (8) and 8-(4-methoxyphenyl)methylidene-4-(4-methoxyphenyl)-2-nitrosoquinazoline (9)

При применении CrO<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>COOH (120 °C) и NaNO<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>COOH (20 °C) был получен 2-аминокарбамоилхиназолин **8**. Использование NaNO<sub>2</sub>/AcOH<sub>glac</sub>. (E<sub>0</sub> = 1.004 V) более предпо-

читительно из-за мягких условий реакции и более высокого выхода продукта **8**. Повышение температуры с 120 до 160 °C в случае сильно-го окислителя CrO<sub>3</sub>/AcOH<sub>glac</sub>. (E<sub>0</sub> = 1.333 V)





приводит к более глубокой трансформации замещающей группы с формированием 2-нитрозотетрагидрохиназолина **9** с высоким выходом 90%.

На рис. 7 приведены ИК-спектры исходного 8-бензилиден-4-фенил-2-цианоиминохиназолина **1** (зеленая полоса) и продукта его окисления 8-бензилиден-4-фенил-2-аминокарбамоилхиназолина **8** (красная полоса), которые указывают на наличие в последнем

полос валентных колебаний амид I ( $1696\text{ см}^{-1}$ ), амид II ( $1557\text{ см}^{-1}$ ), свободной ( $3397\text{ см}^{-1}$ ) и связанной ( $3203\text{ см}^{-1}$ ) первичной  $\text{NH}_2$ -группы, при исчезновении полосы валентных колебаний  $\text{-CN}$  ( $2174\text{ см}^{-1}$ ) и сохранении  $\text{CH}_{2\text{алиц}}$  ( $3063\text{--}2819\text{ см}^{-1}$ ).

Уменьшение частоты и уширение полосы  $\text{NH}_2$ -группы в соед. **8** указывают на вероятное образование ВВС с эндоциклическим атомом азота.

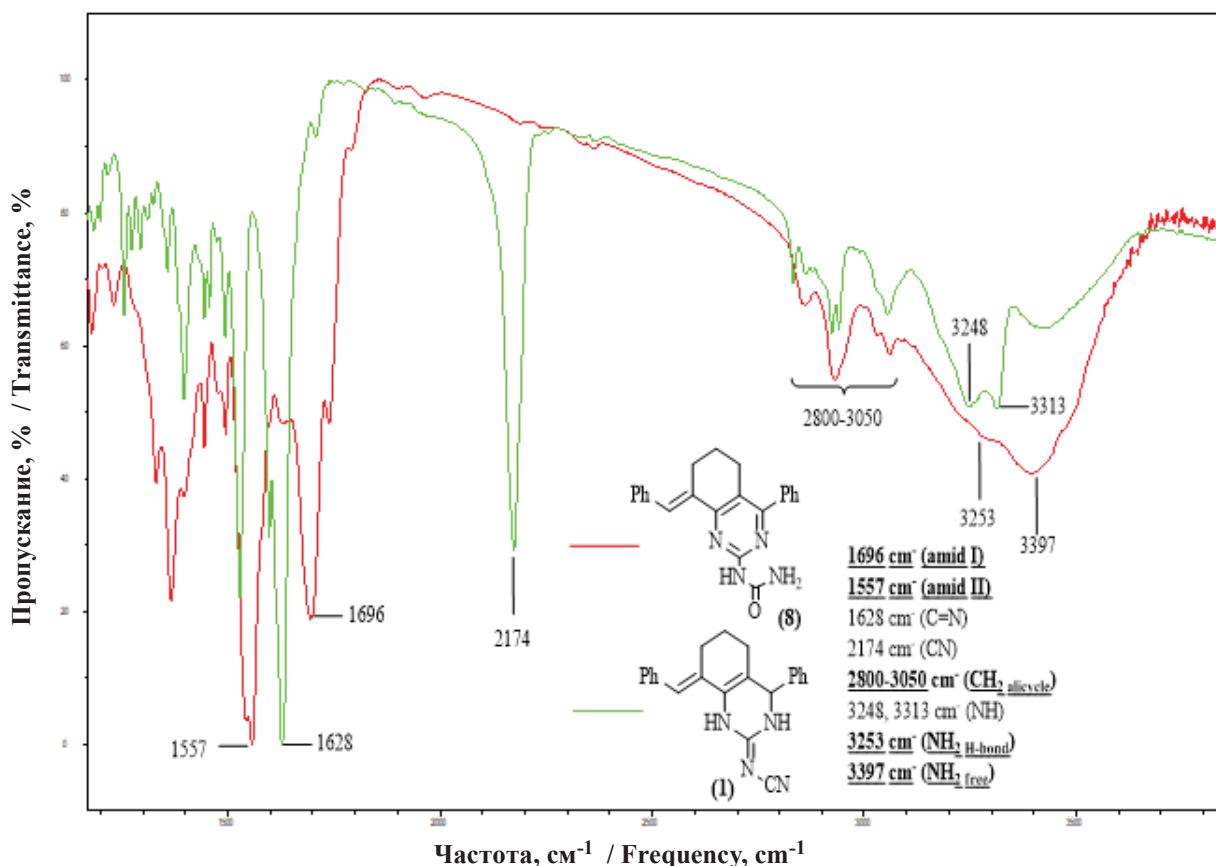


Рис. 7. ИК-спектр 8-бензилиден-4-фенил-2-цианоимино-1,2,3,4,5,6,7,8-октагидрохиназолина (**1**) и 8-бензилиден-4-фенил-2-аминокарбамоил-5,6,7,8-тетрагидрохиназолина (**8**) (цвет онлайн)

Fig. 7. IR spectrum of 8-benzylidene-4-phenyl-2-cyanoimino-1,2,3,4,5,6,7,8-octahydroquinazoline (**1**) and 8-benzylidene-4-phenyl-2-aminocarbamoyl-5,6,7,8-tetrahydroquinazoline (**8**) (color online)

В ЯМР  $^1\text{H}$  спектре (рис. 8) соединения **8** отмечены синглеты протонов NH (с. 9.12 м.д.) и  $\text{NH}_2$  (с. 5.40 м.д.) при сохранении мультиплетов протонов алицикла (м., 1.78–3.00 м.д.), что является подтверждением селективной ароматизации дигидропиримидинового цикла.

В HSQC-спектре отсутствуют корреляции синглетов протонов при 9.12 и 5.40 м.д. с атомами углерода, что указывает на их связь с гетероатомом.

В ИК-спектре 8-(4-метоксибензилиден)-4-(4-метоксифенил)-2-нитрозохиназолина (**9**) отмечены полосы валентных колебаний связи  $\text{N=O}$  ( $1507\text{ см}^{-1}$ ),  $\text{C=N}$  ( $1657\text{ см}^{-1}$ ),  $\text{C}_{\text{ar}}=\text{C}_{\text{ar}}$  ( $1557\text{--}1567\text{ см}^{-1}$ ),  $\text{C}_{\text{ar}}=\text{C}_{\text{ar}}$  пиримидин ( $1595\text{ см}^{-1}$ ).

Вероятная схема окисления цианоиминохиназолинов на примере соединения **1** (рис. 9) включает действие окислителя на наиболее окисленный атом  $\text{C}^4$  дигидропиримидинового цикла и предполагает ионный механизм (при

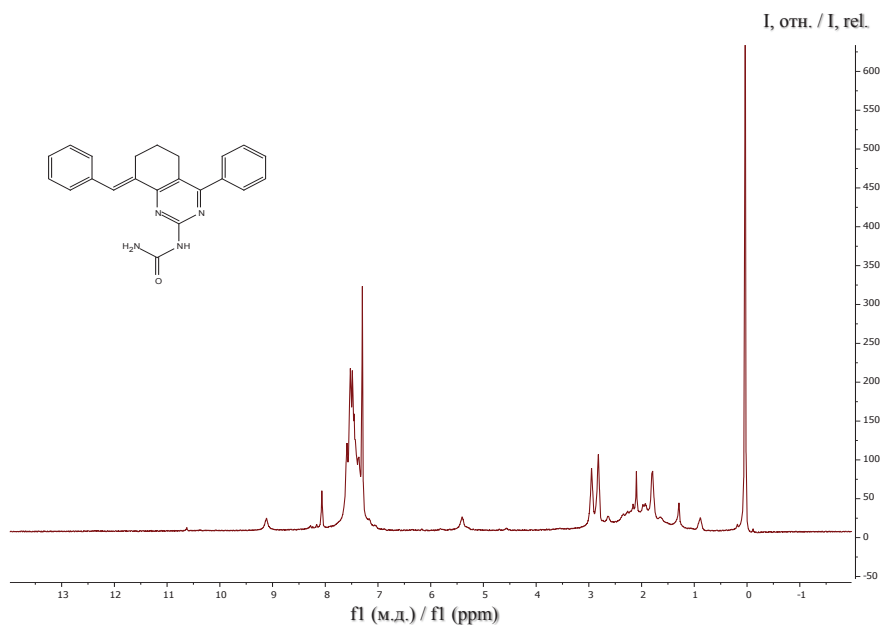


Рис. 8. ЯМР  $^1\text{H}$ -спектр 8-бензилиден-2-аминокарбамоил-4-фенил-5,6,7,8-тетрагидрохиназолина (**8**)

Fig. 8.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 8-benzylidene-2-aminocarbamoyl-4-phenyl-5,6,7,8-tetrahydroquinazoline (**8**)

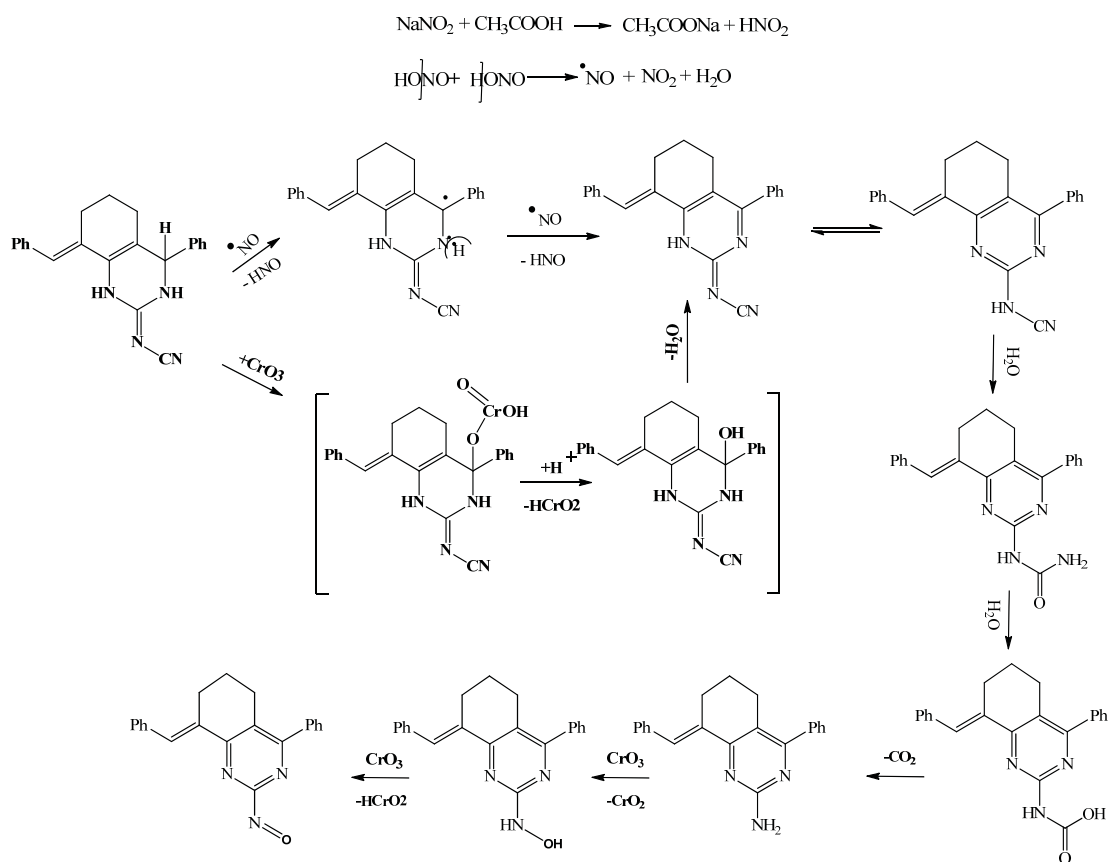


Рис. 9. Предположительный механизм окисления 2-цианоиминохиназолинов на примере 8-бензилиден-4-фенил-2-цианоиминохиназолина (**1**)

Fig. 9. Presumptive mechanism of oxidation of 2-cyanoiminoquinazolines by the example of 8-benzylidene-4-phenyl-2-cyanoiminoquinazoline (**1**)



применении  $\text{CrO}_3$ ) и радикальный механизм (при применении  $\text{NaNO}_2$ ).

Обобщая литературные и полученные нами данные, можно заключить, что варьирование природы окислителя и температурного режима может целенаправленно привести к трансформации 2-цианоиминодигидропиримидина в соответствующие 2-аминокарбамоил-, 2-амино- или 2-нитрозопиримидины (хиназолины).

На базе программного пакета PASS установлено, что полученные нами 2-цианоиминохиназолины **1–7** имеют умеренную вероятность к проявлению противораковой активности за счет наличия в своем составе цианоиминодигидропиримидинового фармакофорного фрагмента. Модификация их структуры (соединения **8** и **9**) приводит к потере противоракового потенциала.

### Список литературы

1. Li S.-G., Wang K.-B., Gong C., Bao Y., Qin N.-B. Cytotoxic quinazoline alkaloids from the seeds of *Peganum harmala* // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2018. Vol. 28, № 2. P. 103–106. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.12.003>
2. Olesen U. H., Christensen M. K., Björkling F., Jäätelä M., Jensen P. B., Sehested M., Nielsen S. J. Anticancer agent CHS-828 inhibits cellular synthesis of NAD // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008. Vol. 367, № 4. P. 799–804. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.01.019>
3. Chern J.-H., Shia K.-S., Chang C.-M., Lee C.-C., Lee Y.-C., Tai C.-L., Tseng H.-Y. Synthesis and in vitro cytotoxicity of 5-substituted 2-cyanoimino-4-imidazodinone and 2-cyanoimino-4-pyrimidinone derivatives // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2004. Vol. 14, № 5. P. 1169–1172. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2003.12.073>
4. Amr A., Elsayed E., Al-Omar M., Badr Eldin H., Nossier E., Abdallah M. Design, Synthesis, Anticancer Evaluation and Molecular Modeling of Novel Estrogen Derivatives // *Molecules*. 2019. Vol. 24, № 3. P. 416. <https://doi.org/10.3390/molecules24030416>
5. Swaminathan Sivagami, Rengarajan Kavitha, Sasikurba Satanathan, Jegathalaprathaban Rajesh. Multicomponent one-pot synthesis, characterization and antimicrobial screening of 2 cyanoimino-6-aryl-4-(6-methoxynaphthalen-2-yl)-3,4-dihydro-1H-pyrimidines // *Process Biochemistry*. 2022. Vol. 123. P. 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.10.032>
6. Solovyev P. A., Shutalev A. D. Synthesis and oxidative aromatization of 5-acetyl-2-cyanoimino-6-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 4-tetrahydropyrimidine with manganese dioxide // *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. 2009. Vol. 45, iss. 7. P. 809–814. <https://doi.org/10.1007/s10593-009-0357-9>
7. Moustafa A. H., Shestakov A. S., Shikhaliev Kh. S. One-pot synthesis of 4-aryl-2-cyanoimino-3, 4-dihydro-1H-pyrimidines and their reactions // *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. 2012. Vol. 48, № 4. P. 613–619. <https://doi.org/10.1007/s10593-012-1034-y>
8. Скляр А. Е., Пузанов Д. А. Синтез и строение 2-цианоиминогидрохиназолинов на основе N-цианогуанидина и карбонильных соединений // Ломоносов-2022: материалы Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных. Секция «Химия». М.: Перо, 2022. С. 593.
9. Prakash N., Elamaram M., Ingarsal N. A new approach to the synthesis of cyanamide: 2-cyanoimino-4-aryl-6-(naphthalen-2-yl)-3, 4-dihydro-1H-pyrimidines and their antimicrobial screening // *Chemical Science Transactions*. 2015. Vol. 4 (4). P. 947–954.
10. Moustafa A. H., Shestakov A. S., Shikhaliev K. S. One-pot synthesis of 4-aryl-2-cyanoimino-3,4-dihydro-1H-pyrimidines and their reactions // *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. 2012. Vol. 48, № 4. P. 613–619. <https://doi.org/10.1007/s10593-012-1034-y>
11. Матикенова А. А., Кривенько А. П. Превращения азолоцикланопиримидинов под действием окислителей // *Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология*. 2014. Т. 14, вып. 1. С. 29–32.

### References

1. Li S.-G., Wang K.-B., Gong C., Bao Y., Qin N.-B. Cytotoxic quinazoline alkaloids from the seeds of *Peganum harmala*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2018, vol. 28, no. 2, pp. 103–106. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.12.003>
2. Olesen U. H., Christensen M. K., Björkling F., Jäätelä M., Jensen P. B., Sehested M., Nielsen S. J. Anticancer agent CHS-828 inhibits cellular synthesis of NAD. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, vol. 367, no. 4, pp. 799–804. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.01.019>
3. Chern J.-H., Shia K.-S., Chang C.-M., Lee C.-C., Lee Y.-C., Tai C.-L., Tseng H.-Y. Synthesis and in vitro cytotoxicity of 5-substituted 2-cyanoimino-4-imidazodinone and 2-cyanoimino-4-pyrimidinone derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2004, vol. 14, no. 5, pp. 1169–1172. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2003.12.073>
4. Amr A., Elsayed E., Al-Omar M., Badr Eldin H., Nossier E., Abdallah M. Design, Synthesis, Anticancer Evaluation and Molecular Modeling of Novel Estrogen Derivatives. *Molecules*, 2019, vol. 24, no. 3, pp. 416. <https://doi.org/10.3390/molecules24030416>
5. Swaminathan Sivagami, Rengarajan Kavitha, Sasikurba Satanathan, Jegathalaprathaban Rajesh. Multicomponent one-pot synthesis, characterization and antimicrobial screening of 2 cyanoimino-6-aryl-4-(6-methoxynaphthalen-2-yl)-3,4-dihydro-1H-pyrimidines.

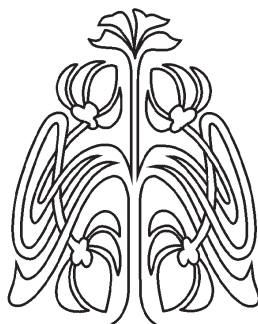


- Process Biochemistry*, 2022, vol. 123, pp. 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.10.032>
6. Solovyev P. A., Shutalev A. D. Synthesis and oxidative aromatization of 5-acetyl-2-cyanoimino-6-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 4-tetrahydropyrimidine with manganese dioxide. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 2009, vol. 45, no. 7, pp. 809–814. <https://doi.org/10.1007/s10593-009-0357-9>
  7. Moustafa A. H., Shestakov A. S., Shikhaliev Kh. S. One-pot synthesis of 4-aryl-2-cyanoimino-3, 4-dihydro-1H-pyrimidines and their reactions. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 2012, vol. 48, no. 4, pp. 613–619. <https://doi.org/10.1007/s10593-012-1034-y>
  8. Sklyar A. E., Puzanov D. A. Synthesis and structure of 2-cyanoiminohydroquinazolines based on N-cyano-guanidine and carbonyl compounds. *Lomonosov-2022: Proceedings of the International Scientific Conference of Students, Graduate Students and Young Scientists. Section "Chemistry"*. Moscow, Pero, 2022. 593 p. (in Russian).
  9. Prakash N., Elamaram M., Ingarsal N. A New Approach to the Synthesis of Cyanamide: 2-Cyanoimino-4-aryl-6-(naphthalen-2-yl)-3, 4-dihydro-1H-pyrimidines and their antimicrobial screening. *Chemical Science Transactions*, 2015, vol. 4 (4), pp. 947–954.
  10. Moustafa A. H., Shestakov A. S., Shikhaliev K. S. One-pot synthesis of 4-aryl-2-cyanoimino-3,4-dihydro-1H-pyrimidines and their reactions. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 2012, vol. 48, no. 4, pp. 613–619. <https://doi.org/10.1007/s10593-012-1034-y>
  11. Matikenova A. A., Krivenko A. P. Transformations of azolocyclanopyrimidines under the action of oxidants. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2014, vol. 14, iss. 1, pp. 29–32 (in Russian).

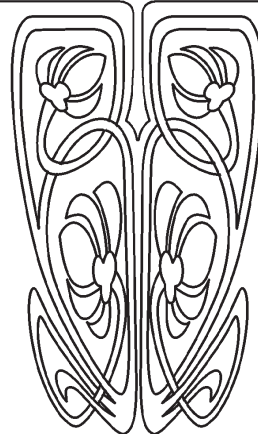
Поступила в редакцию 19.05.2023; одобрена после рецензирования 23.05.2023; принята к публикации 31.05.2023  
The article was submitted 19.05.2023; approved after reviewing 23.05.2023; accepted for publication 31.05.2023



## БИОЛОГИЯ



НАУЧНЫЙ  
ОТДЕЛ



Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 3. С. 308–317  
*Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2023, vol. 23, iss. 3, pp. 308–317  
<https://ichbe.sgu.ru> <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-3-308-317>  
EDN: FVXSFT

Научная статья  
УДК 633.111.1+581.1+631.524.85

### Влияние засоления на морфогенез проростков интрогрессивных линий мягкой пшеницы с генетическим материалом *Aegilops columnaris*

Ю. В. Даштоян<sup>1</sup>✉, А. В. Калинина<sup>1</sup>, В. В. Коробко<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Федеральный аграрный научный центр Юго-Востока, Россия, 410010, г. Саратов, ул. Тулайкова, д. 7

<sup>2</sup>Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Россия, 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, д. 83

Даштоян Юлия Васильевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории генетики и цитологии, [dashto@rambler.ru](mailto:dashto@rambler.ru), <https://orcid.org/0000-0003-4481-2417>

Калинина Алла Владимировна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории генетики и цитологии, [kalininaal@mail.ru](mailto:kalininaal@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0001-6608-708X>

Коробко Валерия Валерьевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии и физиологии растений, [v.v.korobko@mail.ru](mailto:v.v.korobko@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0002-0444-8238>

**Аннотация.** Внесение генетического материала дикорастущих видов в геном культурных растений позволяет существенно расширить возможности селекции. Для эффективного использования интрогрессивных растений необходимо изучение их хозяйственно-ценных признаков и адаптационных возможностей. Проведено исследование влияния генетического материала от *Aegilops columnaris* Zhuk. на морфометрические параметры проростков интрогрессивных линий мягкой яровой пшеницы в условиях солевого стресса. Объекты исследования – проростки мягкой яровой пшеницы сорта Добрыня и проростки интрогрессивных линий мягкой яровой пшеницы, содержащие генетический материал *Aegilops columnaris* Zhuk. Культивирование проростков осуществлялось на растворах хлорида и сульфата натрия. Влияние засоления на рост оценивали по следующим показателям: корневому индексу, показателю корнеобеспеченности проростка, длине первого листа, количеству корней семидневных проростков. Среди изученных интрогрессивных линий мягкой яровой пшеницы наибольшая устойчивость к действию хлорида натрия была характерна для проростков линий L1946/1 (6A(6U); T4BS/T4BL-1D; 3AL with terminal C-band), L1882/2 (monosomic addition 2/4/7X), L2021/4 (5D(5X)6D(6X); terminal transl. 3DL) и L2021/2 (5D(5X)6A(6X)). Проростки линий L1882/2 (monosomic addition 2/4/7X) и L2028/3 (5D(5X)) проявили устойчивость в условиях сульфатного засоления. Полученные результаты позволяют сделать вывод о положительном влиянии или отсутствии отрицательного влияния указанных изменений генома на солеустойчивость мягкой пшеницы. Выявленное негативное влияние хлоридного и сульфатного засоления на исследуемые морфометрические показатели выявлено у растений линии L1721/2 (6A(6U<sup>del</sup>); T4BS/T4BL-1D), что указывает на отрицательное влияние такого изменения генома на солеустойчивость мягкой пшеницы.  
**Ключевые слова:** *Triticum aestivum* L., интрогрессивные линии мягкой пшеницы, хлоридное засоление, сульфатное засоление, морфогенез проростков



**Для цитирования:** Даштоян Ю. В., Калинина А. В., Коробко В. В. Влияние засоления на морфогенез проростков интрогрессивных линий мягкой пшеницы с генетическим материалом *Aegilops columnaris* // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 3. С. 308–317. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-3-308-317>, EDN: FVXSFT

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0)

Article

**Effect of salinity on the morphogenesis of seedlings of introgressive lines of spring bread wheat with genetic material *Aegilops columnaris***

I. V. Dashtoyan<sup>1</sup> ✉, A. V. Kalinina<sup>1</sup>, V. V. Korobko<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Federal Center of Agriculture Research of the South-East Region, 7 Tulaikov St., Saratov 410010, Russia

<sup>2</sup>Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia

Iuliia V. Dashtoyan, [dashto@rambler.ru](mailto:dashto@rambler.ru), <https://orcid.org/0000-0003-4481-2417>

Alla V. Kalinina, [kalininaal@mail.ru](mailto:kalininaal@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0001-6608-708X>

Valeria V. Korobko, [v.v.korobko@mail.ru](mailto:v.v.korobko@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0002-0444-8238>

**Abstract.** The introduction of the genetic material of wild-growing species into the genome of cultivated plants can significantly expand the diversity of breeding material. For the effective use of introgressive plants, it is necessary to study their economically valuable traits and adaptive capabilities. The objective of the work is to study the effect of two types of salinity on the morphogenesis of seedlings of introgressive lines of spring bread wheat containing the genetic material of *Aegilops columnaris* Zhuk. The objects of study are seedlings of spring bread wheat of the Dobrynya variety and seedlings of introgressive lines of spring bread wheat, created in the laboratory of genetics and cytology of the Federal Center of Agriculture Research of the South-East Region on the basis of the Dobrynya variety and *Aegilops columnaris* Zhuk. Cultivation of plants was carried out on solutions of sodium chloride and sulfate; the concentrations of the solutions corresponded to an osmotic pressure of 7 atm. The effect of salinity on growth was assessed by the following indicators: root index value, root-to-shoot ratio of seedlings, length of the first leaf, and number of roots of seven-day-old seedlings. Among the studied introgressive lines of spring bread wheat, the highest resistance to the action of sodium chloride is characteristic of seedlings of lines L1946/1 (6A(6U); T4BS/T4BL-1D; 3AL with terminal C-band), L1882/2 (monosomic addition 2/4/ 7X), L2021/4 (5D(5X)6D(6X); terminal transl. 3DL) and L2021/2 (5D(5X)6A(6X)). Seedlings of lines L1882/2 (monosomic addition 2/4/7X) and L2028/3 (5D(5X)) showed resistance to sulfate salinity. Seedlings of line L2028/3 (5D(5X)) are slightly inferior to seedlings of the Dobrynya variety in the length of the first leaf under conditions of chloride salinization, and line L2021/4 is inferior in terms of root supply under conditions of sulfate salinity (5D(5X)6D(6X); terminal transl. 3DL). The results obtained allow us to conclude that the indicated changes in the genome have a positive or no negative effect on the salt tolerance of common wheat. The pronounced negative effect of chloride and sulfate salinity on the studied morphometric parameters was found in plants of the line L1721/2 (6A(6Udel); T4BS/T4BL-1D), which suggests that such a change in the genome negatively affects the salt tolerance of bread wheat.

**Keywords:** *Triticum aestivum* L., introgressive lines of bread wheat, chloride salination, sulfate salinity, seedling morphogenesis

**For citation:** Dashtoyan I. V., Kalinina A. V., Korobko V. V. Effect of salinity on the morphogenesis of seedlings of introgressive lines of spring bread wheat with genetic material *Aegilops columnaris*. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2023, vol. 23, iss. 3, pp. 308–317 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-3-308-317>, EDN: FVXSFT

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC-BY 4.0)

## Введение

Интрогрессивная селекция в современном растениеводстве позволяет получать растения, способные с большей эффективностью переносить влияние неблагоприятных факторов среды. Благодаря внесению генетического материала дикорастущих видов в геном культурных растений можно существенно расширить разнообразие селекционного материала. Чужеродные гены встраиваются в геном реципиента, как правило, большими фрагментами и, наряду с полезными признаками, могут приводить к проявлению у гибридов нежелательных свойств [1]. Дальнейшее использование в селекции растений, полученных таким методом, возможно после изучения их хозяйственно-ценных признаков и адаптационных возможностей.

Одним из факторов среды, способным негативно влиять на рост и развитие растений, является засоление почв. В земельном фонде России засоленные почвы занимают 38,4 млн га, при этом площади засоленных территорий постоянно увеличиваются, а их полное рассоление с использованием мелиоративных мер практически невозможно.

С точки зрения агрономии важным критерием солеустойчивости является урожайность растений на засоленной почве, при этом отбор солеустойчивых форм в полевых условиях осложняется из-за неравномерности распределения засоленных участков. Поэтому на практике широко применяются лабораторные методы диагностики солеустойчивости, как прямые, так и косвенные [2].



Цель настоящей работы – выявление влияния генетического материала от *Aegilops columnaris* Zhuk. на морфометрические параметры проростков интрогрессивных линий мягкой яровой пшеницы в условиях солевого стресса.

### Материалы и методы

Исследования проводились в лаборатории цитологии и генетики ФГБНУ «ФАНЦ Юго-Востока». Объектами исследования служили проростки мягкой яровой пшеницы сорта Добрыня и проростки интрогрессивных линий мягкой яровой пшеницы, созданных в лаборатории

генетики и цитологии ФАНЦ Юго-Востока на основе сорта Добрыня и *Aegilops columnaris* Zhuk. k1193. Характеристика объектов исследования представлена в табл. 1.

Цитогенетическое изучение интрогрессивных линий, состояние чужеродной генетической изменчивости, ее количество и включение в реконструированный геном мягкой пшеницы, а именно в виде дополненных или замещённых хромосом, транслокаций, было проведено в лаборатории генетических основ идентификации растений Института общей генетики им. Н. И. Вавилова (г. Москва) [3].

Таблица 1 / Table 1

### Генетическая характеристика изученных интрогрессивных линий мягкой яровой пшеницы Genetic characteristics of the studied introgressive lines of soft spring wheat

Линия / Lines	Родословная линии / Pedigree of lines
L1949	Dobrynya/ <i>Ae.columnaris</i> (k1193)*3//Dobrynya 2A(2U)
L1777/4	Dobrynya/ <i>Ae.columnaris</i> (k1193)*3//Dobrynya 6D(6U); T4BS/T4BL-1D; 1BL with terminal deletion
L1946/1	Dobrynya/ <i>Ae.columnaris</i> (k1193)*3//Dobrynya 6A(6U); T4BS/T4BL-1D; 3AL with terminal C-band
L2308/5	Dobrynya/ <i>Ae.columnaris</i> (k1193)*3//Dobrynya 6A(6U); T4BS/T4BL-1D
L1721/2	Dobrynya/ <i>Ae.columnaris</i> (k1193)*3//Dobrynya 6A(6U <sup>del</sup> ); T4BS/T4BL-1D
L1869/3-16	AD Dobrynya/ <i>Ae.columnaris</i> (k1193)*4//Dobrynya monosomic subst. 1A/1X
L1882/2	AD Dobrynya/ <i>Ae.columnaris</i> (k1193)//Dobrynya/3/Dobrynya monosomic addition 2/4/7X
L1837/1	AD Dobrynya/ <i>Ae.columnaris</i> (k1193)/Dobrynya 3B(3X); T5DS.5DL
L1881/1	AD Dobrynya/ <i>Ae.columnaris</i> (k1193)*3//Dobrynya 5D(5X)
L2028/3	AD Dobrynya/ <i>Ae.columnaris</i> (k1193)//Dobrynya/3/Dobrynya 5D(5X)
L1808/1	AD Dobrynya/ <i>Ae.columnaris</i> (k1193)//Dobrynya/3/Dobrynya 6D(6X)
L2021/4	AD Dobrynya/ <i>Ae.columnaris</i> (k1193)//Dobrynya/3/Dobrynya 5D(5X) 6D(6X); terminal transl. 3DL
L2021/2	AD Dobrynya/ <i>Ae.columnaris</i> (k1193)//Dobrynya/3/Dobrynya 5D(5X)6A(6X)
L1777/1	Dobrynya/ <i>Ae.columnaris</i> (k1193)*3//Dobrynya 5D(5X)6A(6X); 1BL with terminal deletion

Для определения эффекта, оказываемого на растительный организм факторами окружающей среды, рекомендуется использовать различные тест-функции, к числу которых относят всхожесть, параметры развития корневой системы и побега [4, 5]. При проведении исследования мы посчитали целесообразным использовать комплекс морфометрических показателей, сопоставление которых позволит выявить различные аспекты роста и развития проростка.

Для исследования использовали неповрежденные, выровненные по размеру семена 2022 г. репродукции, с хорошей всхожестью ( $\geq 90\%$ ). Проращивание зерновок осуществляли в чашках Петри, с использованием в качестве субстрата изотонических растворов хлорида и сульфата натрия (концентрации растворов

соответствовали осмотическому давлению 7 атм). Контролем служили растения, культивированные на дистиллированной воде. Опытные и контрольные проростки культивировали в темноте при температуре  $+20^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ . На седьмые сутки проводили количественный учет роста: определяли абсолютно сухую массу надземной части побега и корневой системы, длину главного и боковых зародышевых корней, длину первого листа, количество корней ( $n = 30$ ). На основании полученных данных рассчитывали показатель корнеобеспеченности, как отношение абсолютно сухой массы корневой системы к абсолютно сухой массе побега. Корневой индекс определяли как среднее значение длины самых длинных корней, отнесенное к аналогичному в контроле.



Результаты исследований подвергались статистической обработке в табличном процессоре Excel пакета MS Office 2010.

### Результаты и их обсуждение

При изучении влияния хлоридного и сульфатного засоления на процесс роста и развития корневой системы проростков было обнаружено, что количество корней, развивающихся у проростков ряда интрогрессивных линий в присутствии солей, отличалось от количества корней проростков, выращенных на дистиллированной воде. Учет количества корней семидневных проростков сорта Добрыня показал, что среднеарифметическое значение в контрольном варианте опыта составило 4,2 шт., при этом мода ( $M_o$ ) равна 5, а коэффициент варьирования ( $C_v$ ) 21%. В условиях хлоридного засоления существенного отличия данного показателя от контроля выявлено не было: среднеарифметическое значение равно 4,4 шт.,  $M_o = 5$ ,  $C_v$  на 5% ниже, чем в контроле, тогда как в условиях сульфатного наблюдалось существенное – на 1,5 шт. – увеличение среднеарифметического значения количества корней и моды ( $M_o = 6$ ), снижение показателя варьирования признака ( $C_v = 8\%$ ).

Среди исследованных линий наименьшее количество корней в контрольном варианте опыта было отмечено у проростков линии L2308/5 (среднее значение 3,7 шт.) и линии L1869/3-16 (среднее значение 3,8 шт.). Отметим, что проростки всех линий, содержащих замещения 5D(5X), культивированных на дистиллированной воде, имели большее по сравнению с сортом Добрыня количество корней, при этом значение моды и у проростков сорта Добрыня, и у проростков этих линий было одинаково и равно 5.

Статистический анализ данных по количеству корней проростков, культивированных в условиях хлоридного засоления, показал, что мода имела минимальное значение ( $M_o = 3$ ) у проростков линий L1949, L1882/2 и L1881/1 (для них же было характерно наименьшее среднеарифметическое значение 3,0–3,1 шт.), а также линий L1837/1, L2028/3, L2021/4, L2308/5. Средние арифметические значения исследуемого показателя развития корневой системы проростков линий L1808/1 и L1777/1 превышали аналогичное значение проростков сорта Добрыня, при этом различия статистически не достоверны (табл. 2).

Таблица 2 / Table 2

### Влияние разнокачественного засоления на количество корней семидневного проростка интрогрессивных линий *T. aestivum* L.

Influence of different-quality salinity on the number of roots seven-day-old seedling of introgressive lines of *T. aestivum* L.

Объект / The object	Контроль / The control			Хлоридное засоление / Chloride salination			Сульфатное засоление / Sulfate salination		
	$\Sigma$ , шт.	$M_o$	$C_v$ , %	$\Sigma$ , шт.	$M_o$	$C_v$ , %	$\Sigma$ , шт.	$M_o$	$C_v$ , %
Добрыня / Dobrynya	4,2 ± 0,5	5	20,8	4,4 ± 0,5	5	15,4	5,7* ± 0,3	6	7,9
L1949	4,7 ± 0,4	5	13,6	3,0** ± 0	3	0	4,7 ± 0,6	5	16,0
L1777/4	4,1 ± 0,6	5	22,5	4,1 ± 0,5	4	17,9	5,1* ± 0,3	5	6,8
L1946/1	4,4 ± 0,5	5	15,4	3,9 ± 0,6	4	24,2	4,3** ± 0,3	4	10,5
L2308/5	3,7 ± 0,5	3	21,1	3,3 ± 0,4	3	20,0	5,1* ± 0,4	5	11,1
L1721/2	4,7 ± 0,4	5	13,6	4,4 ± 0,5	5	15,9	5,4 ± 0,3	5	9,1
L1869/3-16	3,8 ± 0,5	3	19,7	3,7 ± 0,4	4	18,2	5,1* ± 0,3	5	6,8
L1882/2	4,3 ± 0,7	5	22,8	3,0** ± 0	3	0	4,0** ± 0	4	0
L1837/1	5,0** ± 0	5	0	3,7* ± 0,5	3	21,1	5,0** ± 0	5	0
L1881/1	4,8 ± 0,5	5	15,6	3,1** ± 0,2	3	10,6	5,0** ± 0	5	0
L2028/3	4,3 ± 0,5	5	18,2	3,4 ± 0,5	3	19,9	5,8* ± 0,3	6	6,4
L1808/1	5,2** ± 0,3	5	7,7	4,5 ± 0,5	5	17,9	5,2 ± 0,4	5	12,0
L2021/4	5,0** ± 0	5	0	3,8* ± 0,5	3	22,9	5,2 ± 0,4	5	12,0
L2021/2	4,8 ± 0,3	5	8,3	4,4 ± 0,5	5	18,2	5,0** ± 0	5	0
L1777/1	4,8 ± 0,3	5	8,3	4,8 ± 0,3	5	8,3	5,0** ± 0	5	0

Примечание.  $M_o$  – мода,  $C_v$  – коэффициент варьирования,  $\Sigma$  – среднее арифметическое, \* – различия между контролем и опытом достоверны при  $p \leq 0,05$ , \*\* – различия между сортом Добрыня и линией достоверны при  $p \leq 0,05$ .

Note.  $M_o$  – mode,  $C_v$  – coefficient of variation,  $\Sigma$  – arithmetic mean, \* – differences between control and experiment are significant at  $p \leq 0,05$ , \*\* – differences between the Dobrynya variety and the line are significant at  $p \leq 0,05$ .





В условиях хлоридного засоления степень варьирования количества корней у семидневных проростков может быть охарактеризована как незначительная у линий L1949, L1882/2, L1777/1; существенная – у линий L1946/1, L1837/1, L2021/4; средняя – у проростков сорта Добрыня и остальных исследуемых линий.

Выявлено стимулирующее действие сульфатного засоления на образование корней у проростков некоторых линий: среднее арифметическое значение данного признака достоверно превышало контрольное значение у линий L1777/4, L2308/5, L1869/3-16, L2028/3. Проростки других линий в условиях сульфатного засоления статистически значимых отличий от контроля по количеству корней не имели.

Проростки интрогрессивных линий при культивировании на сульфате натрия по количеству корней уступали проросткам сорта Добрыня. Исключение составили проростки линии L2028/3, среднее арифметическое количество корней у этих проростков было 5,8 шт., т.е. незначительно превышало показатель сорта Добрыня (5,7 шт.), при этом значение моды у проростков сорта Добрыня и линии L2028/3 было максимальным среди всех исследуемых объектов в условиях сульфатного засоления ( $M_0 = 6$ ).

Для большинства исследованных линий и сорта Добрыня характерно незначительное варьирование в выборке по количеству корней семидневных проростков, тогда как у проростков линий L1949, L1946/1, L2308/5, L1808/1 и L2021/4 варьирование анализируемого показателя оценивается как среднее.

Таким образом, несмотря на статистически незначимые различия значений количества корней у проростков большинства изученных нами линий по сравнению с проростками сорта Добрыня в контрольном варианте опыта, при действии различных типов засоления проявляется генетическая специфика, выражающаяся в изменении средних значений и в различной степени варьирования анализируемого показателя.

Были определены показатель корнеобеспеченности и корневой индекс контрольных растений и выращенных в условиях хлоридного и сульфатного засоления. Показатель корнеобеспеченности семидневных проростков сорта Добрыня в контрольном варианте опыта составил 0,8 отн.ед., тогда как значение данного показателя проростков, изученных интрогрессивных линий мягкой пшеницы в контроле, варьировало от 0,5 отн.ед. (L1882/2) до 0,9 отн.ед. (L1869/3-16).

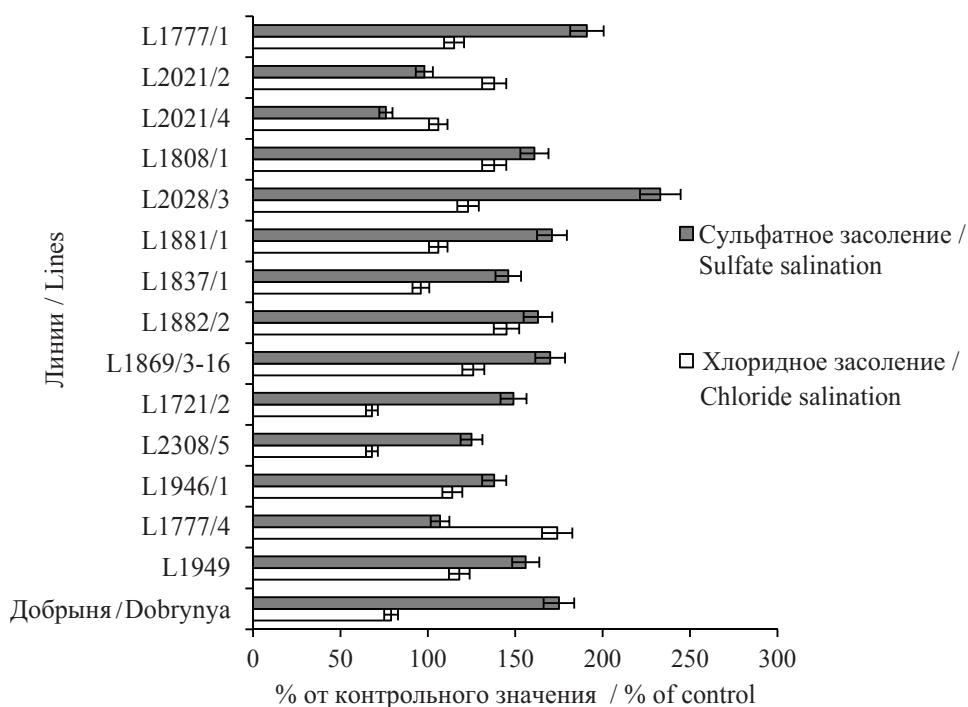


Рис. 1. Показатель корнеобеспеченности проростков сорта Добрыня и интрогрессивных линий *T. aestivum* L.

Fig. 1. The root-to-shoot ratio of seedlings of the variety Dobrynya and introgressive lines *T. aestivum* L.



Исследование влияния качества засоления на корнеобеспеченность проростков показало, что у всех объектов исследования, за исключением линий L1777/4, L2021/4 и L2021/2, показатель корнеобеспеченности, выраженный в % от контрольного значения, в условиях сульфатного засоления оказался выше, чем в условиях хлоридного (рис. 1).

В присутствии сульфата натрия относительное массовое соотношение корней и побега проростков линий L1777/1 и L2028/3, содержащих замещения 5D(5X), существенно (в 1,9–2,3 раза) превышало анализируемый показатель у проростков сорта Добрыня. Корнеобеспеченность проростков других интрогрессивных линий мягкой пшеницы уступала анализируемому показателю проростков родительской формы; при этом у растений линии L1881/1, содержащих замещение 5D(5X), значение корнеобеспеченности было незначительно ниже, чем у сорта Добрыня – на 4%, а у растений линии L1808/1 с замещением 6D(6X) – на 14%. У проростков линий L2021/4 и L2021/2, имеющих двойные замещения 5D(5X)6D(6X) и 5D(5X)6A(6X), выявлено существенное – на 99 и 77% соответственно – снижение анализируемого показателя относительно сорта-реципиента. Связано ли высокое значение показателя корнеобеспеченности в условиях сульфатного засоления у проростков линии L1777/1 с делецией 1BL не известно.

В условиях хлоридного засоления показатель корнеобеспеченности проростков линий L2308/5, L1721/2 был на 11% ниже, чем у проростков сорта-реципиента, у проростков линии L1837/1 на 17% его превышал. Проростки остальных изученных интрогрессивных линий имели более высокие показатели корнеобеспеченности, чем проростки сорта Добрыня.

Таким образом, среди исследуемых интрогрессивных линий мягкой пшеницы выявлены линии, для которых, как и для проростков сорта Добрыня, характерно значительное снижение показателя корнеобеспеченности в условиях хлоридного засоления – это линии L2308/5 (6A(6U); T4BS/T4BL-1D) и L1721/2 (6A(6U<sup>del</sup>); T4BS/T4BL-1D). В условиях сульфатного засоления наблюдается существенное увеличение показателя корнеобеспеченности проростков относительно контроля у всех исследуемых линий, за исключением L2021/2 (5D(5X)6A(6X)) и L2021/4 (5D(5X)6D(6X); terminal transl. 3DL). Следует отметить, что пока-

затель корнеобеспеченности, представляющий собой относительное массовое соотношение корней и побега, используется для оценки стратегии адаптации растений к окружающей среде [4], демонстрирует способность растений регулировать соотношение корень/побег в стрессовых условиях за счет перераспределения пластических веществ между надземными и подземными органами.

Определено влияние разнокачественного засоления на корневой индекс проростков линий. У всех проростков опытных растений наибольшей длины достигал главный корень, его длина у контрольных растений интрогрессивных линий мягкой пшеницы варьирует от 82 (L1946/1) до 182 мм (L1837/1), тогда как у сорта Добрыня длина главного зародышевого корня составила 143 мм.

На основании полученных данных установлено, что оба типа засоления оказывают негативное влияние на показатель корневого индекса, при этом данный эффект в большей степени проявляется в условиях сульфатного засоления (табл. 3). Так, в условиях хлоридного засоления корневой индекс проростков сорта Добрыня составил 0,36 отн. ед., у проростков интрогрессивных линий – от 0,17 до 0,51 отн. ед.; тогда как при культивировании на сульфате натрия значение анализируемого показателя у растений сорта Добрыня составило 0,07 отн. ед., а у растений интрогрессивных линий – 0,02–0,09 отн. ед. В условиях хлоридного засоления существенных отличий значения корневого индекса проростков линий L2028/3, L1882/2, L2021/4, а также линий L2308/5, L2021/2 и L1777/1 от значения корневого индекса проростков сорта Добрыня обнаружено не было. Повышение корневого индекса по сравнению с аналогичным показателем роста корня родительского сорта было характерно для проростков линий L1949 (2A(2U)), и L1946/1 (6A(6U); T4BS/T4BL-1D; 3AL with terminal C-band).

В условиях сульфатного засоления у растений двух линий – L1777/4 (6D(6U); T4BS/T4BL-1D; 1BL with terminal deletion) и L1946/1 (6A(6U); T4BS/T4BL-1D; 3AL with terminal C-band) наблюдается увеличение корневого индекса по сравнению со значением данного показателя у проростков сорта Добрыня. Корневой индекс проростков линий L1949, L1882/2, L2028/3, L2021/4 не имеет статистически значимых отличий от его значения для сорта Добрыня. У остальных изученных линий этот критерий меньше, чем у проростков сорта Добрыня.



Таблица 3 / Table 3

**Значение корневого индекса проростков сорта Добрыня  
и интрогрессивных линий *T.aestivum* L.****Root index value of seedlings of the variety Dobrynya and introgressive lines *T.aestivum* L.**

Объект / The object	Хлоридное засоление, отн. ед. / Chloride salination, a.u.	Сульфатное засоление, отн. ед. / Sulfate salination, a.u.
Добрыня / Dobrynya	0,36	0,07
L1949	0,44	0,06*
L1777/4	0,29	0,09
L1946/1	0,51	0,09
L2308/5	0,34*	0,04
L1721/2	0,24	0,05
L1869/3-16	0,33	0,02
L1882/2	0,35*	0,08*
L1837/1	0,22	0,04
L1881/1	0,17	0,05
L2028/3	0,36*	0,07*
L1808/1	0,31	0,05
L2021/4	0,35	0,06*
L2021/2	0,34*	0,05
L1777/1	0,34*	0,05
HCP <sub>0,95</sub>	0,02	0,01

Примечание. \* – различия между сортом Добрыня и линией не достоверны при  $p \leq 0,05$ .

Note. \* – differences between the Dobrynya variety and the line are not significant at  $p \leq 0,05$ .

Таким образом, корневой индекс проростков линии L1946/1 (6A(6U); T4BS/T4BL-1D; 3AL with terminal C-band) в условиях обоих типов засоления превышает значение корневого индекса сорта Добрыня; проростков линии L1949 (2A(2U)) в условиях хлоридного засоления – превышает показатель сорта Добрыня, а в условиях сульфатного уступает ему лишь на 0,01 отн.ед. Следует отметить, что растения линии L1949 содержат замещение 2A(2U). По литературным данным, 2A хромосома несет QTL солевого стресса [6]. Положительное влияние на солеустойчивость было отмечено Р. С. Юдиной с соавторами для линии мягкой пшеницы, несущей интрогрессию от *T. timopheevii* Zhuk. в хромосоме 2A [7]. Также есть данные, свидетельствующие о наличии гена *Nax1*, регулирующего транспорт натрия в клетке (НКТ7) [8]. Полученные нами результаты позволяют предположить, что отсутствие замещённого генетического материала мягкой пшеницы, связанного с солеустойчивостью, у интрогрессивных линий, было компенсировано генетическим материалом *Ae. columnaris*. Для

ряда линий – L1721/2, L1837/1, L1881/1, L1808/1, L1869/3-16, L1777/1 – характерно снижение анализируемого показателя роста корневой системы относительно сорта Добрыня, а корневой индекс проростков линий L1882/2, L2028/3, L2021/4 соответствует или не имеет существенных отличий от аналогичного показателя сорта Добрыня.

На основании полученных данных установлено, что для этих линий характерно снижение корневого индекса в условиях хлоридного засоления, при этом показатель корнеобеспеченности превышал аналогичные значения, установленные для родительской формы. Этот факт позволяет сделать вывод, что хлорид натрия, оказывая ингибирующее действие на линейный рост растений, не приводит к существенным отклонениям относительного массового соотношения корней и побега проростков.

У проростков линий L1949, L2028/3 и L1882/2 в условиях хлоридного засоления ингибирование роста первого листа было значительнее, чем у сорта Добрыня (рис. 2). По двум другим анализируемым показателям растения

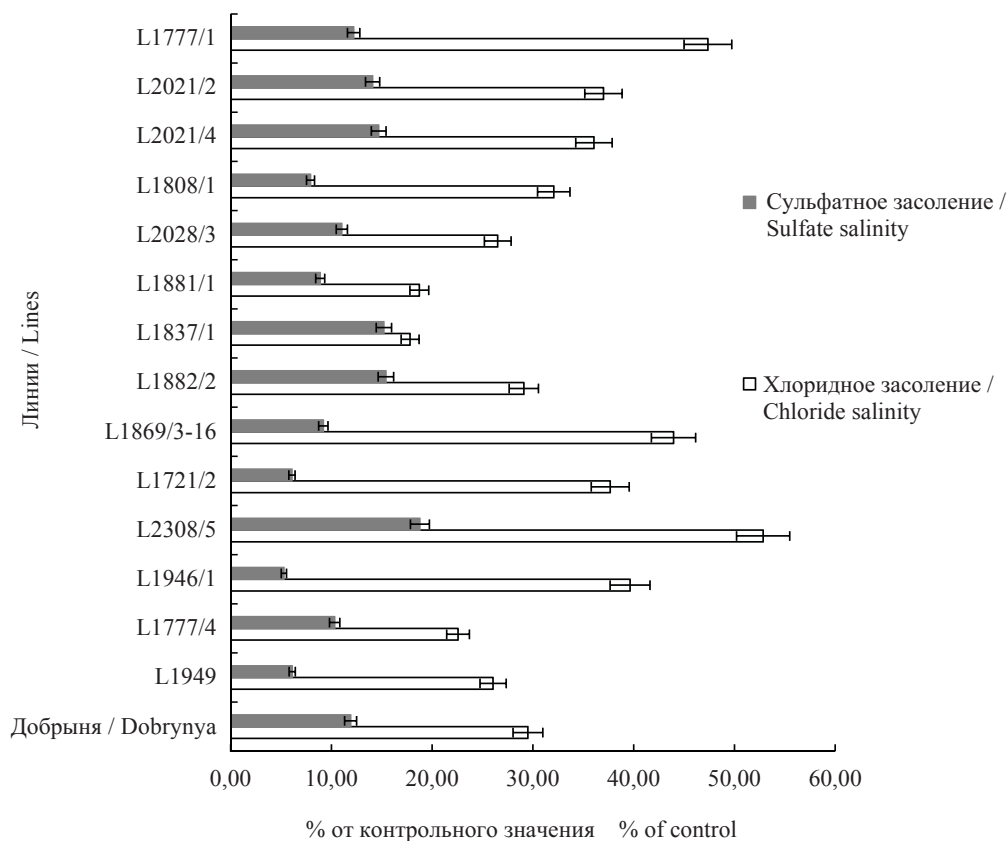


Рис. 2. Длина первого листа проростков сорта Добрыня и интрогрессивных линий *T. aestivum* L.  
Fig. 2. The first leaf length of seedlings of the variety Dobrynya and introgressive lines *T. aestivum* L.

этих линий имели результаты, превосходящие родительскую форму. Следовательно, изменения в геномах этих интрогрессивных линий не приводят к снижению уровня толерантности к хлоридному засолению, характерного родительскому сорту. Наименьшее влияние хлоридного засоления на рост первого листа было отмечено у растений линий L2308/5 (53% от контроля) и L1777/1 (47% от контроля); и, хотя по значению корневого индекса представители этих линий существенных отклонений от сорта-реципиента не обнаружили, по показателю корнеобеспеченности линия L2308/5 существенно ему уступает. Следует отметить, что аналогичная реакция на засоление, а именно снижение показателя корнеобеспеченности, уменьшение корневого индекса и меньшая степень ингибирования роста первого листа по сравнению с родительской формой, была получена при изучении линии L1721/2, содержащей, как и линия L2308/5, транслокацию T4BS/T4BL-1D. При этом у линии L1946/1, содержащей такую же транслокацию, но имеющей также изменения в 3A хромосоме, значения всех рассмотренных показателей в условиях хлоридного засоления были выше, чем у сорта Добрыня.

Длина первого листа проростков сорта Добрыня при воздействии раствора сульфата натрия составила 12% от контрольного значения. В большей степени негативный эффект данного типа засоления на рост первого листа обнаружен у семидневных проростков линий L1949, L1946/1, L1721/2, L1869/3-16, L1881/1 и L1808/1, длина первого листа проростков которых составила 5 – 9% от контрольных значений. Отметим, что растения этих линий в условиях сульфатного засоления имели также более низкие показатели корнеобеспеченности и меньший корневой индекс по сравнению с сортом Добрыня. Исключения: линия L1949, у проростков которой значение корневого индекса соответствовало значению сорта-реципиента и линия L1946/1, корневой индекс проростков которой превышал значение аналогичного показателя родительской формы.

Менее выраженное ингибирующее влияние сульфатного засоления на рост первых листьев было отмечено у проростков линий L1882/2, L1837/1, L2021/4 и L2021/2, длина первого листа которых составила 14–15% от контрольных значений. Минимальное ингибирующее воз-



действие оба типа засоления оказали на рост первого листа проростков линии L2308/5 (19% от контроля). Отметим, что по корнеобеспеченности и корневому индексу растения этих линий уступали родительскому сорту или имели значение корневого индекса близкое к нему (L1882/2 и L2021/4).

Проростки линии L2028/3, содержащей замещение 5D(5X), превосходили Добрыню по значениям корневого индекса и корнеобеспеченности, а также и по устойчивости к негативному влиянию сульфата натрия на рост первого листа имели близкие результаты к родительскому сорту.

В условиях сульфатного и хлоридного засоления наименьшее негативное воздействие на рост первого листа характерно проросткам линий L2308/5, L1882/2, L2021/4, L2021/2 и L1777/1, тогда как наибольшее негативное влияние солей на рост первого листа выявлено у проростков линии L1881/1.

#### Заключение

Таким образом, анализируя все полученные в ходе эксперимента данные, можно заключить, что наибольший негативный эффект засоления был отмечен у растений линии L1721/2 (6A(6U<sup>del</sup>); T4BS/T4BL-1D). Возможно, изменения генома такого характера снижает степень солеустойчивости мягкой пшеницы.

Среди изученных интрогрессивных линий мягкой пшеницы наибольшую устойчивость к действию хлорида натрия проявили растения линий L1946/1 (6A(6U); T4BS/T4BL-1D; 3AL with terminal C-band), L1882/2 (monosomic addition 2/4/7X), L2021/4 (5D(5X)6D(6X); terminal transl. 3DL) и L2021/2 (5D(5X)6A(6X)).

Устойчивость в условиях сульфатного засоления показали растения линий L1882/2 (monosomic addition 2/4/7X) и L2028/3 (5D(5X)). При этом линия L2028/3 (5D(5X)) незначительно уступала сорту Добрыня по росту первого листа в условиях хлоридного засоления, а линия L2021/4 – по показателю корнеобеспеченности в условиях сульфатного (5D(5X)6D(6X); terminal transl. 3DL). Такие результаты позволяют сделать вывод о положительном влиянии или отсутствии отрицательного влияния указанных изменений генома на солеустойчивость мягкой пшеницы. Следовательно, линии L1946/1, L1882/2, L2021/4, L2021/2, L2028/3 являются перспективными для дальнейшей работы и выведения новых сортов мягкой яровой пшеницы, обладающих высокой солеустойчивостью.

#### Список литературы

1. Дружин А. Е., Сибикеев С. Н., Гульмяева Е. И., Баранова О. А., Андреева Л. В., Голубева Т. Д., Калинин Т. В. Изучение хозяйственно ценных и адаптивных признаков у линий яровой мягкой пшеницы, созданных с участием синтетических форм пшеницы // Аграрный вестник Юго-Востока. 2019. № 3. С. 7–10.
2. Коробко В. В., Волков Д. П. Устойчивость некоторых сортов зернового сорго к разнокачественному засолению // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2013. Т. 13, вып. 2. С. 107–111.
3. Badaeva E. D., Ruban A. S., Shishkina A. A., Sibikееv S. N., Druzhin A. E., Surzhikov S. A., Dragovich A. Yu. Genetic classification of *Aegilops columnaris* Zhuk. (2n = 4x = 28, UcUcXcXc) chromosomes based on FISH analysis and substitution patterns in common wheat × *Ae. columnaris* introgressive lines // Genome. 2018. Vol. 61, № 2. P. 131–143. <https://doi.org/10.1139/gen-2017-0186>
4. Ledo A., Burslem D. F. R. P., Paul K. I., Battaglia M., England J. R., Pinkard E., Roxburgh S., Ewel J. J., Barton C., Brooksbank K., Carter J., Eid T. H., Fitzgerald A., Jonson J., Mencuccini M., Montagu K. D., Montero G., Ruizpeinado R., Mugasha W. A., Ryan C. M., Sochacki S., Specht A., Wildy D., Wirth C., Zerihun A., Chave J. Tree size and climatic water deficit control root to shoot ratio in individual trees globally // New Phytologist. 2018. Vol. 217, № 1. P. 8–11. <https://doi.org/10.1111/nph.14863>
5. Шапошников А. И., Моргунов А. И., Акин Б., Макарова Н. М., Белимов А. А., Тихонович И. А. Сравнительные характеристики корневых систем и корневой экссудации у синтетического, примитивного и современного сортов пшеницы // Сельскохозяйственная биология. 2016. Т. 51, № 1. С. 68–78. <https://doi.org/10.15389/agrobiol.2016.1.68rus>
6. Pal N., Saini D. K., Kumar S. Meta-QTLs, ortho-MQTLs and candidate genes for the traits contributing to salinity stress tolerance in common wheat (*Triticum aestivum* L.) // Physiology and Molecular Biology of Plants. 2021. Vol. 27, № 12. P. 2767–2786. <https://doi.org/10.1007/s12298-021-01112-0>
7. Юдина Р. С., Леонова И. Н., Салина Е. А., Хлесткина Е. К. Изменение солеустойчивости мягкой пшеницы в результате интрогрессии генетического материала *Aegilops speltoides* и *Triticum timopheevii* // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015. Т. 19, № 2. С. 171–175. <https://doi.org/10.18699/VJ15.021>
8. Huang S., Spielmeyer W., Lagudah E. S., James R. A., Platten J. D., Dennis E. S., Munns R. A sodium transporter (NKT7) is a candidate for Nax1, a gene for salt tolerance in durum wheat // Plant Physiology. 2006. Vol. 142, № 4. P. 1718–1727. <https://doi.org/10.1104/pp.106.088864>



## References

1. Druzhin A. E., Sibikeev S. N., Gulyaeva E. I., Baranova O. A., Andreeva L. B., Golubeva T. D., Kalintseva T. V. Study of agronomic valuable and adaptive traits in spring bread wheat lines produced with the participation of synthetic forms of wheat. *Agrarian Reporter of South-East*, 2019, no. 3, pp. 7–10 (in Russian).
2. Korobko V. V., Volkov D. P. Resistance of some varieties of grain sorghum to salinity of different quality. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2013, vol. 13, iss. 2, pp. 107–111 (in Russian).
3. Badaeva E. D., Ruban A. S., Shishkina A. A., Sibikeev S. N., Druzhin A. E., Surzhikov S. A., Dragovich A. Yu. Genetic classification of *Aegilops columnaris* Zhuk. ( $2n=4x=28$ , UcUcXcXc) chromosomes based on FISH analysis and substitution patterns in common wheat  $\times$  *Ae. columnaris* introgressive lines. *Genome*, 2018, vol. 61, no. 2, pp. 131–143. <https://doi.org/10.1139/gen.2017.0186>
4. Ledo A., Burslem D. F. R. P., Paul K. I., Battaglia M., England J. R., Pinkard E., Roxburgh S., Ewel J. J., Barton C., Brooksbank K., Carter J., Eid T. H., Fitzgerald A., Jonson J., Mencuccini M., Montagu K. D., Montero G., Ruizpeinado R., Mugasha W. A., Ryan C. M., Sochacki S., Specht A., Wildy D., Wirth C., Zerihun A., Chave J. Tree size and climatic water deficit control root to shoot ratio in individual trees globally. *New Phytologist*, 2018, vol. 217, no. 1, pp. 8–11. <https://doi.org/10.1111/nph.14863>
5. Shaposhnikov A. I., Morgunov A. I., Akin B., Makarova N. M., Belimov A. A., Tikhonovich I. A. Comparative characteristics of root systems and root exudation in synthetic, primitive and modern wheat varieties. *Agricultural Biology*, 2016, vol. 51, no. 1, pp. 68–78 (in Russian). <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2016.1.68rus>
6. Pal N., Saini D.K., Kumar S. Meta-QTLs, ortho-MQTLs and candidate genes for the traits contributing to salinity stress tolerance in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2021, vol. 27, no. 12, pp. 2767–2786. <https://doi.org/10.1007/s12298-021-01112-0>
7. Yudina R. S., Leonova I. N., Salina E. A., Khlestkina E. K. Change of salt tolerance in common wheat after introgression of genetic material from *Aegilops speltoides* and *Triticum timopheevii*. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 2015, vol. 19, no. 2, pp. 171–175 (in Russian). <https://doi.org/10.18699/VJ15.021>
8. Huang S., Spielmeier W., Lagudah E. S., James R. A., Platten J. D., Dennis E. S., Munns R. A sodium transporter (HKT7) is a candidate for Nax1, a gene for salt tolerance in durum wheat. *Plant Physiology*, 2006, vol. 142, no. 4, pp. 1718–1727. <https://doi.org/1104/pp.106.088864>

Поступила в редакцию 18.02.2023; одобрена после рецензирования 04.05.2023; принята к публикации 13.05.2023  
The article was submitted 18.02.2023; approved after reviewing 04.05.2023; accepted for publication 13.05.2023



Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 3. С. 318–330

*Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2023, vol. 23, iss. 3, pp. 318–330

<https://ichbe.sgu.ru>

<https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-3-318-330>, EDN: AJAPQI

Научная статья

УДК 579.6:574.24

## Изучение биологических и функциональных свойств микроорганизмов с высокой устойчивостью к марганцу (II)



М. А. Касаткина<sup>1</sup>✉, М. В. Решетников<sup>2</sup>, Е. В. Плешакова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Россия, 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, д. 83

<sup>2</sup>Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю. А., Россия, 410054, г. Саратов, ул. Политехническая, д. 77

Касаткина Милена Александровна, магистрант кафедры биохимии и биофизики, milena.kasatkina22@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3057-1341>

Решетников Максим Владимирович, доцент кафедры «Теплогасоснабжение и нефтегазовое дело», mavr15@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0009-2361-5941>

Плешакова Екатерина Владимировна, доктор биологических наук, профессор кафедры биохимии и биофизики, plekat@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3836-0258>

**Аннотация.** Вопрос очистки вод центрального водоснабжения, а также сточных вод от избыточного содержания тяжёлых металлов остаётся актуальным и в настоящее время. Присутствие тяжёлых металлов даже в следовых количествах, оказывает отрицательное воздействие не только на окружающую среду, но и на все системы органов человека. На данный момент к числу приоритетных поллютантов, поступающих в организм человека с питьевой водой, относятся железо и марганец. Были проведены исследования по изучению биологических и функциональных свойств у выделенных из высокомагнитной почвы микроорганизмов, продемонстрировавших ранее высокую устойчивость к марганцу (II). Микробные штаммы с максимальной резистентностью к Mn (II) идентифицированы как: *Bacillus simplex* 55.2, *B. simplex* 13.2 и *Listeria murrayi* 13.4. Исследована динамика роста *B. simplex* 55.2 и *B. megaterium* 69.5 в условиях периодического культивирования в жидкой среде, содержащей 2 ммоль/л Mn (II). Показано, что через 7 сут. культивирования вес биомассы *B. megaterium* 69.5 увеличился в 5,5 раза, *B. simplex* 55.2 – в 3,7 раза относительно значений через 1 сут. культивирования, оптическая плотность культуральной среды *B. megaterium* 69.5 увеличилась в 4 раза, *B. simplex* 55.2 – в 2 раза по сравнению с исходной посевной дозой. Удельная скорость роста *B. megaterium* 69.5 через 7 сут. культивирования была выше, чем у *B. simplex* 55.2 примерно в 2 раза, а степень удаления Mn (II) из водной среды была меньше. *B. simplex* 55.2 снижал содержание Mn (II) на 66 %, *B. megaterium* 69.5 – на 50%. Установлено, что *B. megaterium* 69.5, *B. simplex* 55.2, *B. simplex* 13.2 и *L. murrayi* 13.4 способны расти в условиях повышенной щёлочности и минерализации среды (pH 7–10; 10% NaCl). Учитывая, что данные микроорганизмы способны удалять высокие концентрации Mn (II) из водной среды, они представляют перспективу для использования их в биотехнологии очистки воды.

**Ключевые слова:** ионы марганца (II), марганцеокисляющие микроорганизмы, устойчивость, периодическое культивирование, прирост биомассы

**Для цитирования:** Касаткина М. А., Решетников М. В., Плешакова Е. В. Изучение биологических и функциональных свойств микроорганизмов с высокой устойчивостью к марганцу (II) // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 3. С. 318–330. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-3-318-330>, EDN: AJAPQI

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0)

Article

### A study of the biological and functional properties of microorganisms with high resistance to manganese (II)

М. А. Kasatkina<sup>1</sup>✉, М. В. Reshetnikov<sup>2</sup>, Е. В. Pleshakova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia

<sup>2</sup>Yuri Gagarin State Technical University of Saratov, 77 Politekhnikeskaya St., Saratov 410054, Russia

Milena A. Kasatkina, milena.kasatkina22@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3057-1341>

Maxim V. Reshetnikov, mavr15@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0009-2361-5941>

Ekaterina V. Pleshakova, plekat@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3836-0258>

**Abstract.** The issue of water treatment of the central water supply, as well as wastewater, from excessive content of heavy metals (HMs) remains relevant at the present time. The presence of heavy metals, even in trace amounts, has a negative impact not only on the environment, but also



on all human organic systems. At the moment, iron and manganese are among the main pollutants entering the human body via drinking water. Studies were carried out on the biological and functional properties of microorganisms isolated from highly magnetic soil, which previously demonstrated high resistance to manganese (II). Microbial strains with maximum resistance to Mn (II) were identified as: *Bacillus simplex* 55.2, *B. simplex* 13.2 and *Listeria murrayi* 13.4. The growth dynamics of *B. simplex* 55.2 and *B. megaterium* 69.5 was studied under conditions of periodic cultivation in a liquid medium containing 2 mmol/L Mn (II). It was shown that after 7 day's cultivation, the weight of the biomass of *B. megaterium* 69.5 increased by 5.5 times, *B. simplex* 55.2 increased by 3.7 times relative to the values after 1 day cultivation, the optical density of the culture medium *B. megaterium* 69.5 increased 4 times, *B. simplex* 55.2 increased 2 times compared with the initial sowing dose. The specific growth rate of *B. megaterium* 69.5 after 7 days cultivation was higher than that of *B. simplex* 55.2 by about 2 times, and the degree of removal of Mn (II) from the aquatic environment was less. *B. simplex* 55.2 reduced the content of Mn (II) by 66%, *B. megaterium* 69.5 reduced by 50%. It was established that *B. megaterium* 69.5, *B. simplex* 55.2, *B. simplex* 13.2 and *L. murrayi* 13.4 are able to grow in conditions of high alkalinity and mineralization of the medium (pH 7–10; 10% NaCl). Taking into account that these microorganisms are able to remove high concentrations of Mn (II) from the aquatic environment, they are promising for their use in water treatment biotechnology..

**Keywords:** manganese (II) ions, manganese-oxidizing microorganisms, resistance, periodic cultivation, biomass growth

**For citation:** Kasatkina M. A., Reshetnikov M. V., Pleshakova E. V. A study of the biological and functional properties of microorganisms with high resistance to manganese (II). *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2023, vol. 23, iss. 3, pp. 318–330 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-3-318-330>, EDN: AJAPQI

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC-BY 4.0)

## Введение

Отличительными особенностями современного мира являются: интенсификация техногенеза; включение в биогеохимические циклы потоков токсичных элементов в концентрациях, не характерных для среды обитания человека, значительно превышающих допустимые уровни; деградация компонентов окружающей среды (атмосферы, гидросферы, литосферы, биосферы) [1]. Многие водные объекты урбанизированных территорий, особенно расположенные вблизи промышленных предприятий, постоянно подвергаются сильной техногенной нагрузке, в том числе загрязнению тяжёлыми металлами (ТМ) [2–4]. Во многих городах отмечено ухудшение качества подземных вод, используемых для питьевого водоснабжения. Экологические последствия загрязнения вод питьевого назначения ТМ разнообразны [5, 6]. Ущерб здоровью населения от потребления недоброкачественной питьевой воды соразмерен с потерями от стихийных бедствий, голода и других глобальных факторов [7, 8]. Наибольшие опасения связаны с влиянием ТМ на состояние здоровья детей, как наиболее чувствительную субпопуляцию людей [9]. Население Саратовской области в 80% случаев использует воду из малых рек для хозяйственно-бытовых целей, не прошедшую очистку или при наличии частичной очистки [10].

К числу приоритетных поллютантов, поступающих в организм человека с питьевой водой, относятся железо и марганец [11]. В Саратовской области превышение ПДК марганца наблюдалось в реках Хопёр, Большой Узень, Карай, Большой Иргиз, Карабулак, в воде для водоснабжения г. Вольска [10]. При экзогенном поступлении избытка марганца в организм человека с питьевой водой наблюдается общерезорб-

тивное и специфическое повреждающее действие марганца на желудочно-кишечный тракт, почки, ЦНС, кровяную, костную и иммунную системы, снижается активность антиоксидантной системы и обменных процессов [8]. При постоянном употреблении воды с повышенным содержанием марганца происходит снижение абсорбции и метаболизма железа, что ведёт к развитию железодефицитного состояния. При избыточном поступлении марганца в условиях производства развиваются манганозы с возможным синдромом паркинсонизма, психическими нарушениями, астено-вегетативным синдромом с угнетением функции гонад [12].

Для извлечения марганца из техногенных вод применяют следующие методы: ионную флотацию, катионирование, сорбцию, экстракцию, аэрацию, окисление [13]. Поскольку марганец относится к токсичным ТМ, и согласно СанПиН 2.1.3684-21 его содержание в питьевой воде не должно превышать 0,1 мг/л, поэтому удаление марганца из природной воды (деманганация) является важной и наиболее распространённой операцией водоподготовки [14]. При этом используются следующие способы: увеличение окислительно-восстановительного потенциала среды путём применения сильных окислителей без корректирования значения pH воды; повышение pH воды при недостаточном окислительно-восстановительном потенциале в случае использования слабых окислителей; совместное применение более сильного окислителя и повышение pH среды [15]. Современной альтернативой физико-химическим способам очистки воды от ТМ являются более доступные и инновационные биологические методы с использованием микроорганизмов [16–18], в том числе для удаления из воды избытка марганца [19].





Железо и марганец присутствуют в природных водах в форме минеральных или органических соединений гуминовых или некоторых жирных кислот. Железо- и марганеорганические комплексы создают условия для развития маргано- и ферробактерий [20]. Такие микроорганизмы способны ферментативно окислять двухвалентные соединения марганца и другие металлы, а также осаждать оксиды элементов на поверхности собственной клетки. Данные свойства обнаружены у многих микроорганизмов родов *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, а также актинобактерий – типичных обитателей не только водоёмов, но и почв [21–24]. Показано, что микроорганизмы окисляют Mn (II) с помощью медь-зависимых оксидаз, которые были найдены у пресноводных грамотрицательных бактерий *Pseudomonas putida*, *Leptothrix discophora* и морской грамположительной бактерии *Bacillus* sp. SG-1 [25]. Скорость микробиологической трансформации растворимого Mn (II) в нерастворимую форму Mn (IV) на несколько порядков выше скорости абиотического окисления марганца в природных водах [21, 23, 26]. Поэтому использование микроорганизмов для деманганации воды представляется перспективной биотехнологией, направленной на снижение избыточного содержания марганца в водных экосистемах, в очищаемых сточных водах и в питьевой воде [27]. Совершенствование биотехнологий микробной очистки от ионов марганца связано с получением высокоактивных штаммов, изучением и отработкой условий их наиболее эффективного использования. В связи с этим выявление подобных микробных штаммов, исследование их свойств, позволяющих применять микроорганизмы в биотехнологиях очистки воды от повышенного содержания марганца, является актуальным.

Целью настоящей работы было изучение биологических и функциональных свойств микроорганизмов, способных к росту в среде, содержащей широкий диапазон концентраций Mn (II).

#### Материалы и методы

В качестве объектов исследования использовалось 11 микроорганизмов, изолированных ранее из высокомагнитной почвы г. Медногорска (Оренбургская область, Россия) [28]. Почвенные пробы, из которых изолировали микроорганизмы, характеризовались значительной степенью антропогенной нагрузки и чрезвычайно высоким уровнем магнитной восприимчивости, что

свидетельствовало о повышенном содержании в почве магнитных минералов, в первую очередь, минералов группы железа [29]. Среди объектов наших исследований было два штамма железобактерий: *Bacillus megaterium* 69.3 и *B. megaterium* 69.5, идентифицированных ранее по совокупности изученных культурально-морфологических, физиолого-биохимических признаков и результатов молекулярного типирования [30]. Последовательности 16S рРНК *B. megaterium* 69.3 и *B. megaterium* 69.5 были зарегистрированы в GenBank NCBI под номерами MK764545 и MK764687 соответственно. Также изучали девять изолятов, выделенных с использованием селективной среды следующего состава, г/л:  $MnSO_4 \times 5H_2O$  – 4,72;  $(NH_4)_2SO_4$  – 0,5;  $NaNO_3$  – 0,5;  $K_2HPO_4$  – 0,5;  $MgSO_4 \times 7H_2O$  – 0,5; лимонная кислота – 10,0; сахароза – 2,0; пептон – 1,0; pH 7,0 [31].

Морфолого-культуральные и физиолого-биохимические признаки микроорганизмов исследовали по стандартным методикам [32]. Идентификацию микроорганизмов проводили по результатам изучения совокупности морфолого-культуральных и физиолого-биохимических признаков согласно определителю бактерий Берджи [33].

В опытах по изучению влияния pH сред для культивирования (в диапазоне pH от 5,0 до 10,0) на рост бактерий применяли жидкую питательную среду (МПБ) с использованием TRIS буфера (pH 9,0) и буферного раствора на основе карбоната натрия с соляной кислотой (pH 10,0) [34]. При изучении способности микроорганизмов расти в среде с повышенной степенью минерализации их выращивали в МПБ с различным содержанием NaCl: 2, 5, 7, 10 и 15%.

Для определения показателей роста микроорганизмов в условиях периодического культивирования их выращивали в 50 мл жидкой селективной среды, содержащей Mn (II) в концентрации 2 ммоль/л в 0,25-л колбах Эрленмейера в настольном шейкере-инкубаторе PSU-10i (BioSan, Латвия) при 160 об/мин и температуре 22–24°C в течение 7 сут. В качестве посевного материала использовали смыв суточной культуры микроорганизмов с агаризованной селективной среды стерильным физиологическим раствором. Оптическая плотность исходной посевной дозы составляла 1,0 ед. при длине волны 440 нм. В качестве контроля использовали селективную среду без микроорганизмов. Каждый вариант изучали в трёх повторностях.



Показатели роста микроорганизмов определяли через 1, 3 и 7 сут. культивирования двумя методами (прямым (1) и косвенным (2)): 1) весовой метод – оценка прироста биомассы по сырому весу (г/л); 2) анализ абсолютного прироста биомассы путём измерения оптической плотности культуральной жидкости.

Весовой метод включал следующие процедуры: 1) предварительное взвешивание центрифужных пробирок; 2) отделение клеток микроорганизмов от культуральной жидкости центрифугированием. Для этого центрифугировали 1 мл культуральной жидкости в пробирках (5 шт.) на центрифуге MiniSpin plus (Eppendorf, Россия) в течение 5–7 мин при 10 тыс. об/мин. После центрифугирования супернатант осторожно сливали; 3) определение веса биомассы. Взвешивали центрифужные пробирки с осадком клеток микроорганизмов. Вес сырой биомассы определяли по формуле:

$$M = \frac{(A - B)}{V} \cdot 1000,$$

где  $M$  – вес сырой биомассы, г/л;  $A$  – вес центрифужной пробирки с осадком, г;  $B$  – вес центрифужной пробирки без осадка, г;  $V$  – объём культуральной жидкости, взятый для центрифугирования, мл.

Также нами был использован косвенный метод оценки биомассы – фотометрический метод измерения мутности бактериальной суспензии, основанный на её способности поглощать свет пропорционально количеству находящегося в среде микроорганизмов. Измерение оптической плотности культуральной жидкости осуществляли при  $\lambda = 440$  нм на фотоколориметре КФК-2 в кювете с длиной оптического пути 1,0 см. Абсолютный прирост биомассы выражали в единицах оптической плотности суспензии клеток микроорганизмов [35].

Удельные скорости роста бактериальных культур ( $\mu$ ) рассчитывали по данным концентрации биомассы по формуле:

$$\mu = \frac{\ln X_0 - \ln X_1}{T_1 - T_0},$$

где  $X_1$  и  $X_2$  – значения биомассы, соответствующие времени роста  $T_0$  и  $T_1$ .

Для измерения массовой концентрации общего марганца в культуральной среде использовали метод с использованием окисления до перманганат-ионов согласно ГОСТ 4974-2014 [36]. Сущность метода заключается в каталитическом

окислении соединений марганца персульфатом калия до перманганат-ионов с последующим измерением оптической плотности раствора и расчётом массовой концентрации марганца в среде. Для регистрации данных определяли массовую концентрацию марганца, используя предварительно построенный градуировочный график.

Для всех полученных данных вычисляли средние значения, для сравнения которых использовали показатели стандартного отклонения и наименьшей существенной разницы. Статистическую обработку результатов проводили при  $p \leq 0,05$  с помощью программного обеспечения Microsoft Excel 2007. Корреляционный анализ осуществляли с использованием программы STATISTICA 7 (TIBCO Software Inc. 2017, Statsoft Russia).

### Результаты и их обсуждение

В ходе ранее проведённых скрининговых исследований было установлено, что 9 из 11 исследованных микроорганизмов, изолированных из микробоценозов высокомагнитных почв города Медногорска, приоритетными загрязнителями которого являются промышленные выбросы с ТМ, проявили высокую устойчивость к ионам марганца (II) [37].

Были выявлены два микроорганизма с максимальной устойчивостью: изолят 55.2 и *B. megaterium* 69.5, максимально-толерантная концентрация (МТК) Mn (II) для них составила 300,0 и 350,0 ммоль/л, минимально-ингибирующая концентрация (МИК) – 350,0 и 450,0 ммоль/л соответственно. Чуть ниже были данные показатели у двух других изолятов: 13.2 и 13.4. МТК Mn (II) для них составила 200,0, а МИК – 250,0 ммоль/л. Была продемонстрирована высокая резистентность микроорганизмов: изолята 55.2 и *B. megaterium* 69.5 к диапазону концентраций Mn (II) от 0,5 до 250,0 ммоль/л при их культивировании в питательной и селективной жидкой среде. Максимальный рост обоих штаммов наблюдался при концентрации марганца (II) в среде культивирования 10 ммоль/л [37].

У микроорганизмов, отобранных по результатам скрининговых исследований, были изучены культурально-морфологические и физиолого-биохимические признаки (табл. 1). В табл. 1 для сравнения приведена характеристика микробного штамма *B. megaterium* 69.5, идентифицированного ранее [30], который окислял железо и обладал высокой устойчивостью к Mn (II).



Таблица 1 / Table 1

**Морфологические и физиолого-биохимические признаки микроорганизмов**  
**Morphological and physiological and biochemical features of the microorganisms**

Тест / Test		Штаммы / Strains			
		69.5	55.2	13.2	13.4
Окраска по Граму / Gram stain		+	+	+	+
Морфология клеток / Cell morphology		Бациллы / Bacilli			Палочки / Coli
Пигментация / Pigmentation		–	–	–	–
Подвижность / Motility		+	+	+	+
Рост в анаэробных условиях / Growth under anaerobic conditions		+	+	+	+–
Каталазная активность / Catalase activity		+	+	+	+
Тест Фогес – Проскауэра / Vogues – Proskauer test		–	–	–	–
Гидролиз / Hydrolysis	Желатин / Gelatin	+	+	+	+
	Крахмал / Starch	+	+	+	+
Образование кислоты из: / Formation of acid from:	Глюкоза / Glucose	+	+	+	+
	Сахароза / Sucrose	+	+	+	+
	Арабиноза / Arabinose	+	+–	–	+
	Ксилоза / Xylose	+	–	+	–
	Лактоза / Lactose	+	+	–	+
	Мальтоза / Maltose	+	+	+	+
	Сорбит / Sorbitol	+	+	–	+
	Маннит / Mannitol	+	+–	+–	+–
Редукция нитратов / Reduction of nitrates		–	–	–	–
Использование цитрата / Use of citrate		–	–	–	–
Рост при: / Growth at:	10 °C	–	–	–	–
	42 °C	–	–	–	–
	2% NaCl	+	+	+	+
	5% NaCl	+	+	+	+
	7% NaCl	+	+	+	+
	10% NaCl	+	+	+	+
	15% NaCl	–	–	–	–
	pH 5	–	–	–	–
	pH 9	+	+	+	+
pH 10	+	+	+	+	
Образование из пептона / Formation of from peptone	Аммиак / Ammonia	–	–	–	–
	H <sub>2</sub> S	+	–	–	–

Примечание. «–» – отсутствие роста; «+–» – слабый рост; «+» – заметный рост.  
 Note. “–” – no growth; “+–” – small growth; “+” – good growth.

Изучение микробных изолятов 55.2 и 13.2 показало, что они представлены грамположительными прямыми палочками, расположенными одиночно, обладают подвижностью, способны образовывать споры. Эндоспоры сферические, лежат терминально в раздутом спорангии. Данные микроорганизмы факультативные

анаэробы. Наблюдается хороший рост на МПА через сутки культивирования при 28°C. Колонии на МПА мелкие, округлой формы, гладкие, блестящие, белого цвета, гомогенные, с ровными краями, слизистой консистенции; диаметр колоний – 1,0–4,0 мм. На МПБ при инкубации в течение 24–48 ч без встряхивания наблюдается



образование плёнки на поверхности среды. Температурный оптимум 20–30° С. Не растут при 42 и 10° С. Наблюдается гибель при pH 5, при значениях pH 9 и 10 рост сохраняется (табл. 1 и 2). Не используют цитрат на среде Симмонса, не образуют аммиак и H<sub>2</sub>S, не продуцируют нитратредуктазу. Оксидазоотрицательные.

Каталазоположительны. Способны гидролизовать крахмал, желатин. Есть способность к окислению глюкозы, лактозы, сахарозы, фруктозы, арабинозы, мальтозы; маннит и ксилозу окисляют слабо. Реакция Фогес – Проскауэра отрицательная.

По результатам изучения изолята 13.4 было установлено, что он представлен грамположительными палочками, расположенными одиночно или в виде коротких цепочек (3–5 клеток), подвижный. Данный микроорганизм является факультативным анаэробом. Колонии на МПА мелкие, беловатые с перламутровым оттенком, плоские, гладкие, блестящие, с ровными краями, с однородной слизистой консистенцией; диаметр колоний – 1–2 мм. При инкубации в течение 24–48 ч в МПБ без встряхивания при 28 °С наблюдается значительный рост, плёнка на

поверхности среды не образуется. Не растёт при 42 и 10 °С. При pH 5 происходит гибель микроорганизма, при значениях pH 9 и 10 рост сохраняется (см. табл. 1 и 2). Не использует цитрат на среде Симмонса, не продуцирует аммиак и H<sub>2</sub>S, не образует нитратредуктазу. Оксидазоотрицательный. Каталазоположительный. Способен гидролизовать крахмал, желатин. Есть способность к окислению глюкозы, лактозы, сахарозы, фруктозы, арабинозы, мальтозы; маннит и ксилозу окисляют слабо. Реакция Фогес – Проскауэра отрицательная.

На основании проведённых исследований по результатам сравнительного анализа культурально-морфологических и физиолого-биохимических признаков в соответствии с критериями дифференциации бактерий, предложенными в 9-м издании руководства «Определитель бактерий Берджи» (1997), были идентифицированы нами как *Bacillus simplex* 55.2, *B. simplex* 13.2 и *Listeria murrayi* 13.4.

У отобранных нами четырёх микробных штаммов наблюдался активный рост в среде с содержанием NaCl до 10%. При концентрации NaCl, равной 15%, рост не обнаруживался (см. табл. 2).

Таблица 2 / Table 2

**Ростовые и ферментативные свойства микроорганизмов**  
**Growth and enzymatic properties of microorganisms**

Микроорганизм / Microorganism	Рост в условиях / Growth in conditions								Активность / Activity		
	pH			содержание NaCl, % по объёму / NaCl content, % by volume					гемолитическая / hemolytic	липазная / lipase	лецитиназная / lecithinase
	5	9	10	2	5	7	10	15			
<i>Bacillus megaterium</i> 69.5	–	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–
<i>Bacillus simplex</i> 13.2	–	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–
<i>Bacillus simplex</i> 55.2	–	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–
<i>Listeria murrayi</i> 13.4	–	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–

Примечание. «–» – отсутствие роста; «+» – заметный рост.  
Note. “–” – no growth; “+” – good growth.

Согласно Федеральному закону «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» микроорганизмы, обладающие патогенностью, токсичностью или полирезистентностью к антибиотикам, не могут быть включены в состав биоремедиационных препаратов, так как несут угрозу здоровью человека и животных. Учитывая возможность использования изучаемых нами микроорганизмов в биотехнологических процессах деманганации воды, была изучена гемолитическая и лецитиназная активность бактерий,

которая может свидетельствовать о наличии факторов патогенности у микроорганизмов.

Гемолитическую активность у микроорганизмов определяли методом высева на кровяной агар и последующей инкубацией в термостате в течение 24–48 ч. В результате не было обнаружено зон гемолиза вокруг образовавшихся колоний (см. табл. 2). Также был произведён посев данных штаммов на желточно-соляной агар, результат теста оказался отрицательным, липазная и лецитиназная активность у изученных микробных



штаммов отсутствовала. Проведённые тесты косвенно свидетельствуют об отсутствии патогенности у изучаемых нами микроорганизмов.

Результаты оценки роста микроорганизмов *B. simplex* 55.2 и *B. megaterium* 69.5 в условиях периодического культивирования в жидкой селективной среде с 2 ммоль/л Mn (II) представле-

ны на рис. 1 и 2. Данная концентрация марганца, как было показано ранее [37], не ингибировала рост *B. megaterium* 69.5 и *B. simplex* 55.2, МТК и МИК для этих микроорганизмов были намного выше. Учитывая, что ПДК ионов марганца в питьевой воде – 0,1 мг/л, данная концентрация соответствовала 1000ПДК.

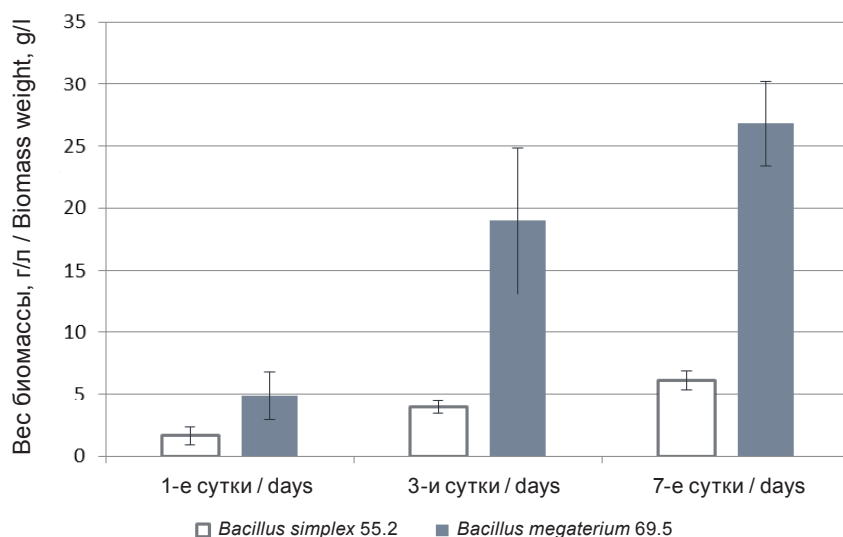


Рис. 1. Прирост биомассы по сырому весу у *B. simplex* 55.2 и *B. megaterium* 69.5, культивируемых в селективной среде с 2 ммоль/л Mn (II)

Fig. 1. Biomass growth by wet weight in strain *B. simplex* 55.2 and *B. megaterium* 69.5 cultivated in a selective medium containing 2 mmol/L Mn (II)

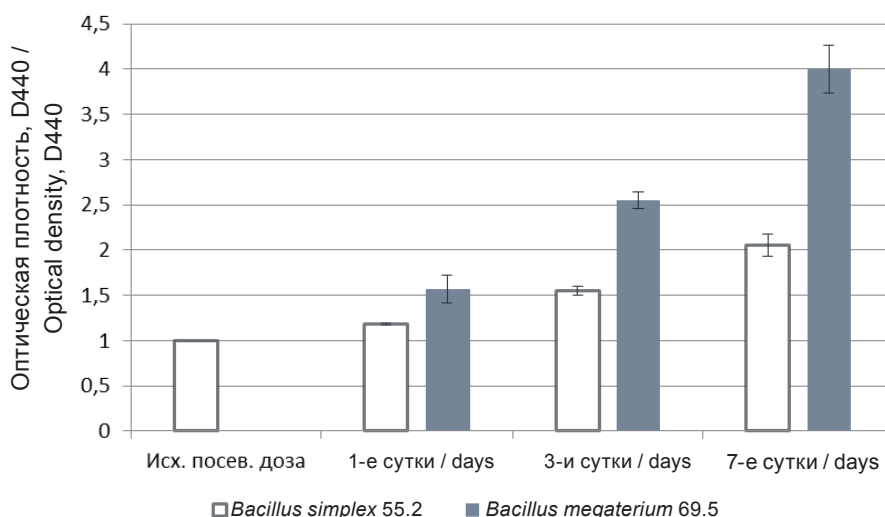


Рис. 2. Абсолютный прирост биомассы у *B. simplex* 55.2 и *B. megaterium* 69.5, культивируемых в селективной среде с 2 ммоль/л Mn (II)

Fig. 2. Absolute increase in biomass in strain *B. simplex* 55.2 and *B. megaterium* 69.5 cultivated in a selective medium containing 2 mmol/L Mn (II)

Согласно весовому методу *B. simplex* 55.2 продемонстрировал хороший рост в селективной среде, содержащей 2 ммоль/л Mn (II) (см. рис. 1). Вес сырой биомассы через сутки куль-

тивирования составил 1,6 г/л. Через трое суток культивирования в жидкой селективной среде с Mn (II) вес биомассы *B. simplex* 55.2 увеличился в 2,4 раза по сравнению с первыми сутками



культивирования в таких же условиях. Через 7 сут. культивирования прирост биомассы продолжался, вес биомассы у данного штамма по сравнению с первыми сутками культивирования увеличился в 3,7 раза и составил 6,1 г/л.

Согласно весовому методу *B. megaterium* 69.5 вес сырой биомассы через сутки культивирования составил 4,88 г/л, что было в 3 раза выше, чем вес сырой биомассы у штамма 55.2 (см. рис. 1). Через 3 сут. культивирования в жидкой селективной среде с ионами марганца вес биомассы штамма *B. megaterium* 69.5 увеличился в 3,9 раза по сравнению с первыми сутками культивирования в таких же условиях. Через 7 сут. культивирования прирост биомассы продолжался, вес биомассы у данного штамма по сравнению с первыми сутками культивирования увеличился в 5,5 раза и составил 26,8 г/л.

Результаты определения абсолютного прироста биомассы фотометрическим методом несколько отличались от результатов весового метода. Хотя тенденция роста *B. simplex* 55.2 в течение 7 сут. сохранялась, но увеличение абсолютного прироста биомассы было не таким выраженным. Изменение оптической плотности через сутки культивирования *B. simplex* 55.2 произошло незначительно – на 18% относительно исходной посевной дозы, которая была равна 1 ед. (см. рис. 2). Через трое сут. культивирования оптическая плотность культуральной среды изменилась в 1,55 раза. Через 7 сут. роста микроорганизма оптическая плотность культуральной среды увеличилась примерно в 2 раза по сравнению с исходной посевной дозой.

Результаты определения абсолютного прироста биомассы *B. megaterium* 69.5 фотометрическим методом несколько отличались от результатов весового метода, как и у *B. simplex* 55.2. Тенденция активного роста *B. megaterium* 69.5 в течение 7 сут. сохранялась, но увеличение абсолютного прироста биомассы было не таким выраженным. Оптическая плотность через сутки культивирования *B. megaterium* 69.5 увеличилась

в 1,57 раза относительно исходной посевной дозы (см. рис. 2). Через 3 сут. культивирования оптическая плотность культуральной среды увеличилась в 2,55 раза. Через 7 сут. роста микроорганизма оптическая плотность культуральной среды возросла в 4 раза по сравнению с исходной посевной дозой.

При сравнении роста *B. simplex* 55.2 и *B. megaterium* 69.5 через 7 сут. культивирования видно, что прирост биомассы по сырому весу у штамма *B. megaterium* 69.5 был в 4,4 раза выше, чем данный показатель у *B. simplex* 55.2.

Известно, что распространённым механизмом адаптации к воздействию ТМ у микроорганизмов является сорбция соединений металлов, в том числе марганца, на клеточной стенке бактерий, мембране или капсуле. Многие микроорганизмы, такие как представители родов *Bacillus*, *Lactococcus*, *Pseudomonas*, способны поглощать ионы ТМ внутриклеточно. Так, исследования, проведённые на микробном штамме *Bacillus thuringiensis* DM55 в присутствии 0,25 ммоль кадмия, показали, что наибольшее количество кадмия аккумулируется биомассой в период с начала культивирования и до ранней фазы экспоненциального роста [38]. Полученные нами данные, продемонстрировавшие, что прирост биомассы у исследованных микроорганизмов по весу значительно превосходит прирост активной части биомассы, определённый с помощью фотометрического метода, возможно, связан с сорбцией ионов марганца микробными клетками, что увеличило их вес.

После оценки прироста биомассы микроорганизмов по весовому и фотометрическому методам, нами была рассчитана удельная скорость роста  $\mu$  (табл. 3). Скорость роста микроорганизмов зависит от многих факторов таких, как условия, в которых происходило культивирование микроорганизмов, физиологические особенности исследуемых штаммов, природа утилизируемого субстрата и его соответствующая концентрация в среде культивирования [18, 39].

Таблица 3 / Table 3

Удельные скорости роста исследованных микроорганизмов  
Specific growth rates of the studied microorganisms

Микроорганизм / Microorganism	Скорость роста, усл. ед./ч, по результатам метода / Specific growth rate, CU h <sup>-1</sup> based on the method			
	Весового / Weight method		Фотометрического / Photometric method	
	3 сут. / 3 days	7 сут. / 7 days	3 сут. / 3 days	7 сут. / 7 days
<i>B. simplex</i> 55.2	0,0219	0,0110	0,0066	0,0043
<i>B. megaterium</i> 69.5	0,0467	0,0196	0,0148	0,0082



Стоит отметить, что удельная скорость роста у *B. megaterium* 69.5 значительно выше, чем у *B. simplex* 55.2. Данная закономерность прослеживается при использовании как весового, так и фотометрического метода. При весовом методе оценивания удельная скорость роста *B. megaterium* 69.5 примерно в 2 раза выше через трое сут. культивирования, чем у *B. simplex* 55.2. По данным фотометрического метода видно, что удельная скорость роста *B. megaterium* 69.5 в 2,2 раза выше через 3 сут. культивирования, чем у *B. simplex* 55.2. Через 7 сут. культивирования удельная скорость роста *B. megaterium* 69.5 выше, чем у *B. simplex* 55.2 в 1,8 раза (по данным весового метода) и в 1,9 раза (согласно фотометрическому анализу). При выборе перспективных

для практического использования микробных штаммов величина удельной скорости роста имеет большое значение [40]. С этой точки зрения микробный штамм *B. megaterium* 69.5 имеет преимущества перед *B. simplex* 55.2.

При измерении массовой концентрации марганца в среде культивирования было установлено, что убыль Mn (II) в среде составила около 20% через трое сут. культивирования двух исследуемых нами микробных штаммов (рис. 3). Через неделю культивирования данный показатель существенно увеличился. Убыль металла в среде, в которой культивировался *B. simplex* 55.2, составила 66% относительно абиотического контроля. Убыль Mn (II) при культивировании *B. megaterium* 69.5 составила 50%.

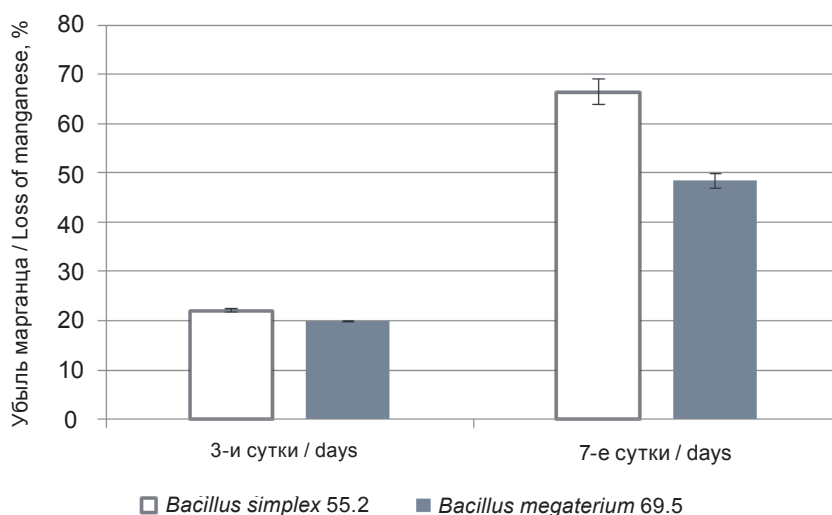


Рис. 3. Убыль марганца (II) при культивировании *B. simplex* 55.2 и *B. megaterium* 69.5

Fig. 3. The loss of manganese (II) during the cultivation of *B. simplex* 55.2 and *B. megaterium*

Была установлена сильная обратная зависимость между убылью марганца (II) и приростом биомассы *B. simplex* 55.2 по сырому весу (коэффициент корреляции Пирсона =  $-0,9426$ , при  $p = 0,00004$ ; коэффициент Спирмена =  $-1,00$ ); между убылью марганца и абсолютным приростом биомассы *B. simplex* 55.2 (коэффициент корреляции Пирсона =  $-0,9633$ , при  $p = 0,000008$ ; коэффициент Спирмена =  $-0,9970$ ). У *B. megaterium* 69.5 корреляционные коэффициенты были чуть ниже, чем у *B. simplex* 55.2, но также свидетельствовали о сильной обратной зависимости между переменными. Между убылью марганца (II) и приростом биомассы *B. megaterium* 69.5 по сырому весу коэффициент корреляции Пир-

сона =  $-0,8916$ , при  $p = 0,0005$ ; коэффициент Спирмена =  $-0,9970$ ; между убылью марганца и абсолютным приростом биомассы *B. megaterium* 69.5 коэффициент корреляции Пирсона =  $-0,9518$ , при  $p = 0,00002$ ; коэффициент Спирмена =  $-0,9939$ . Таким образом, результаты корреляционного анализа свидетельствуют, что рост исследованных микроорганизмов в среде, содержащей ионы марганца в высокой концентрации, строго коррелирует с убылью марганца.

### Заключение

Итак, в ходе скрининговых исследований была показана высокая устойчивость к ионам Mn (II) у 9 из 11 исследованных микробных



штаммов, изолированных из микробоценозов высокомагнитных почв г. Медногорска. Выявлены два микробных штамма с максимальной устойчивостью: 55.2 и *B. megaterium* 69.5, МТК Мп (II) для них составила 300,0 и 350,0 ммоль/л, МИК – 350,0 и 450,0 ммоль/л соответственно. Была продемонстрирована высокая резистентность микробных штаммов 55.2 и *B. megaterium* 69.5 к диапазону концентраций Мп (II): от 0,5 до 250,0 ммоль/л при их культивировании в питательной и селективной жидкой среде. Отмечено, что максимальный рост обоих штаммов наблюдался при концентрации марганца в среде культивирования 10 ммоль/л.

Выделенные из высокомагнитной почвы микробные штаммы с установленной максимальной резистентностью к Мп (II) и способностью к удалению Мп (II) из водной среды были идентифицированы нами как *Bacillus simplex* 55.2, *B. simplex* 13.2 и *Listeria murrayi* 13.4. Установлено, что микробные штаммы *B. megaterium* 69.5, *B. simplex* 55.2, *B. simplex* 13.2 и *L. murrayi* 13.4 способны расти в условиях повышенной щёлочности и минерализации среды (рН 7–10; 10% NaCl). Показано отсутствие гемолитической, липазной и лецитиназной активности у штаммов, что косвенно свидетельствует о непатогенности микроорганизмов.

Изучена динамика роста *B. simplex* 55.2 и *B. megaterium* 69.5 в условиях периодического культивирования в жидкой среде с 2 ммоль/л Мп (II). Через 7 сут. культивирования вес биомассы *B. megaterium* 69.5 увеличился в 5,5 раза, оптическая плотность культуральной среды в 4 раза по сравнению с показателями через 1 сут., что было в несколько раз выше показателей у *B. simplex* 55.2. Оба микроорганизма активно росли в данных условиях и снижали содержание Мп (II) в среде культивирования на 50 и 66% за 7 сут.

Таким образом, в результате проведённых исследований доказано, что высокомагнитные почвы представляют собой источник высокоспециализированных микроорганизмов, обладающих способностью расти при неблагоприятных условиях окружающей среды (рН 9–10), а также в условиях повышенной солёности, и являющихся условно экологически безопасными. Учитывая, что данные микроорганизмы способны удалять высокие концентрации Мп (II) из водной среды, они представляют перспективу для использования их в биотехнологии очистки воды.

## Список литературы

1. Рустембекова С. А., Барабошкина Т. А. Микроэлементозы и факторы экологического риска / под ред. В. В. Горшкова. М. : Университетская книга ; Логос, 2006. 112 с.
2. Рябова Э. Г. Содержание тяжёлых металлов в городских водоёмах // Теоретическая и прикладная экология. 2019. № 1. С. 36–40. <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2019-1-036-040>
3. Brown M. T., Foos B. P. Assessing children's exposures and risks to drinking water contaminants: a manganese case study // Human and Ecological Risk Assessment. 2009. Vol. 15, № 5. P. 923–947. <https://doi.org/10.1080/10807030903153030>
4. Redwan M., Elhaddad E. Assessment the seasonal variability and enrichment of toxic trace metals pollution in sediments of Damietta branch, Nile river, Egypt // Water. 2020. Vol. 12. Article ID 3359. <https://doi.org/10.3390/w12123359>
5. Su C., Jiang Q. L., Zhang W. J. A review on heavy metal contamination in the soil worldwide: Situation, impact and remediation techniques // Environ. Skeptics and Critics. 2014. Vol. 3, № 2. P. 24–38.
6. Proshad R., Kormoker T., Islam Md. S., Saha B. C., Hosain Md. R., Prince M. H., Khan M. M. An appurtenment of arsenic and iron contamination of tube-well groundwater with possible health risk in Bangladesh // Journal of Environment Pollution and Human Health. 2017. Vol. 5, № 3. P. 117–123. <https://doi.org/10.12691/jephh-5-3-7>
7. Ashraf M. A., Alam M. N., Islam M. T., Alam M. S. Deterioration of water quality by heavy metal contamination at Mymensingh municipality // Progressive Agriculture. 2007. Vol. 18, № 1. P. 235–242.
8. Мазунина Д. Л. Негативные эффекты марганца при хроническом поступлении в организм с питьевой водой // Экология человека. 2015. № 3. С. 25–31.
9. Stepanova N. V., Valeeva E. R., Ziyatdinova A. I., Fomina S. F. Peculiarities of children's risk assessment on ingestion of chemicals with drinking water // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2016. Vol. 7, iss. 3. P. 1677.
10. Мусаев Ш. Ж., Елисеев Ю. Ю., Луцевич И. Н., Долич В. Н. Гигиеническая оценка риска здоровью сельского населения, связанного с химическим загрязнением водных ресурсов // Здоровье населения и среда обитания – ЗНиСО. 2016. № 9 (282). С. 20–23.
11. Рябчиков Б. Е. Современные методы обезжелезивания и деманганации природной воды // Энергосбережение и водоподготовка. 2005. № 6 (38). С. 5–10.
12. Жаворонков А. А., Михалева Л. М., Авцын А. П. Микроэлементозы – новый класс болезней человека, животных и растений // Проблемы биогеохимии и геохимической экологии. Труды биогеохимической лаборатории. М. : Наука, 1999. Т. 23. С. 183–225.
13. Мишурина О. А., Чупрова Л. В., Муллина Э. Р. Деманганация сточных вод растворами хлорной извести // Альманах современной науки и образования. 2013. № 9 (76). С. 115–118.





14. СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий»: взамен СанПиН 2.1.7.1287-03 : дата введ. 01.03.2021 / утв. Постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28 января 2021 г. № 3.
15. Калюкова Е. Н., Иванская Н. Н. Деманганация водных растворов природным сорбентом // Вестник Башкирского университета. 2009. Т. 14, № 4. С. 1340–1342.
16. Домрачева Л. И., Скугорева С. Г., Ашихмина Т. Я., Огородникова С. Ю., Кондакова Л. В., Великородчанина Е. О., Короткова А. В., Ковина А. Л. Использование отработанного активного ила для очистки сточных вод, загрязнённых тяжёлыми металлами // Теоретическая и прикладная экология. 2020. № 4. С. 176–184. <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2020-4-176-184>
17. Dixit R., Wasiullah, Malaviya D., Pandiyan K., Singh U. B., Sahu A., Shukla R., Singh B. P., Rai J. P., Sharma P. K., Lade H., Paul D. Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: An overview of principles and criteria of fundamental processes // Sustainability. 2015. Vol. 7. P. 2189–2212. <https://doi.org/10.3390/su7022189>
18. Mosa K. A., Saadoun I., Kumar K., Dhankher O. P. Potential biotechnological strategies for the cleanup of heavy metals and metalloids. *Frontiers in Plant Science*. 2016. Vol. 7. P. 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00303>
19. Шубаков А. А., Михайлова Е. А., Оводов Ю. С. Использование микроорганизмов для извлечения марганца из водных сред // Известия Коми научного центра УрО РАН. 2014. Вып. 1 (17). С. 16–18.
20. Войтов Е. Л., Сколубович Ю. Л., Майков В. М., Шведков П. В. Технология подготовки питьевой воды из подземного источника с высоким содержанием железа и марганца // Известия высших учебных заведений. Строительство. 2022. № 1 (757). С. 44–56. <https://doi.org/10.32683/0536-1052-2022-757-1-44-56>
21. De Schampelaire L., Rabaey K., Boon N., Verstraete W., Voeckx P. Minireview: The potential of exchanged manganese redox cycling for sediment oxidation // *Geomicrobiology Journal*. 2007. Vol. 24, № 7-8. P. 547–558. <https://doi.org/10.1080/01490450701670137>
22. Falamin A. A., Pinevich A. V. Isolation and characterization of a unicellular manganese-oxidizing bacterium from a freshwater lake in Northwestern Russia. *Microbiology*, 2006, vol. 75, pp. 180–185. <https://doi.org/10.1134/S0026261706020111>
23. Sujith P. P., Loka Bharathi P. A. Manganese oxidation by bacteria: biogeochemical aspects // *Molecular biomineralization. Progress in molecular and subcellular biology*. Vol. 52 / ed. W. Müller. Berlin : Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, 2011. P. 49–76.
24. Virpiranta H., Banasik M., Taskila S., Leiviskä T., Halttu M., Sotaniemi V., Tanskanen J. Isolation of efficient metal-binding bacteria from boreal peat soils and development of microbial biosorbents for improved nickel scavenging // *Water*. 2020. Vol. 12. Article ID 2000. <https://doi.org/10.3390/w12072000>
25. Brouwers G. J., Vijgenboom E., Corstjens P., De Vrind J. P. M., de Vrind-de Jong E. W. Bacterial Mn<sup>2+</sup> oxidizing systems and multicopper oxidases: an overview of mechanisms and functions // *Geomicrobiology Journal*. 2000. Vol. 17. P. 1–24. <https://doi.org/10.1080/014904500270459>
26. Tebo B. M., Geszvain K., Lee S.-W. Chapter 13. The molecular geomicrobiology of bacterial manganese (II) oxidation // *Geomicrobiology : Molecular and Environmental Perspective* / eds. L. L. Burton, M. Mandl, A. Loy. New York : Springer, 2010. P. 285–308.
27. Kalaimurugan D., Balamuralikrishnan B., Durairaj K., Vasudhevan P., Shivakumar M. S., Kaul T., Chang S. W., Ravindran B., Venkatesan S. Isolation and characterization of heavy-metal-resistant bacteria and their applications in environmental bioremediation // *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2020. Vol. 17. P. 1455–1462. <https://doi.org/10.1007/s13762-019-02563-5>
28. Плешакова Е. В., Решетников М. В., Нзун К. Т., Шувалова Е. П. Микробиологическая и биохимическая индикация почв города Медногорска // *Агрохимия*. 2016. № 1. С. 66–73.
29. Zhang C., Qiao Q., Piper J. D. A., Huang B. Assessment of heavy metal pollution from a Fe-smelting plant in urban river sediments using environmental magnetic and geochemical methods // *Environ. Pollut.* 2011. Vol. 159. P. 3057–3070.
30. Pleshakova E., Ngun C., Reshetnikov M., Larionov M. V. Evaluation of the ecological potential of microorganisms for purifying water with high iron content // *Water*. 2021. Vol. 13. Article ID 901. <https://doi.org/10.3390/w13070901>
31. Granina L. Z., Parfenova V. V., Zemskaya T. I., Zakharova Y. R., Golobokova L. P. On iron and manganese oxidizing microorganisms in sedimentary redox cycling in lake Baikal // *Berliner Palaobiologische Abhandlungen*. 2003. Vol. 4. P. 121–128.
32. Практикум по микробиологии / под ред. А. И. Нетрусова. М. : Академия, 2005. 608 с.
33. Определитель бактерий Берджи: в 2 т. / пер. с англ. ; под ред. Дж. Хоулта Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса. 9-е изд. М. : Мир, 1997. 1232 с.
34. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. М. : Мир, 1991. 544 с.
35. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd ed. New York : Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 1659 p.
36. ГОСТ 4974-2014. Вода питьевая. Определение содержания марганца фотометрическими методами. М. : Стандартинформ, 2015. 23 с.
37. Плешакова Е. В., Касаткина М. А., Нзун К. Т., Решетников М. В. Изучение марганцеокисляющих микроорганизмов, выделенных из микробеценозов высокомагнитных почв // *Известия Саратовского*



- университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2022. Т. 22, вып. 4. С. 409–418. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2022-22-4-409-418>
38. El-Helou E. R. Cadmium biosorption by a cadmium resistant strain of *Bacillus thuringiensis*: Regulation and optimization of cell surface affinity for metal cations // *Biometals*. 2000. Vol. 13, № 4. P. 273–280.
  39. Менча М. Н. Железобактерии в системах питьевого водоснабжения из подземных источников // *Водоснабжение и санитарная техника*. 2006. № 7. С. 25–32.
  40. Сироткин А. С., Жукова В. Б. Теоретические основы биотехнологии: учебно-методическое пособие. Казань : Казан. гос.-технол. ун-т., 2010. 87 с.
  10. Musayev Sh. Zh., Eliseyev Yu. Yu., Lutsevich I. N., Dolich V. N. Hygienic assessment of health risks of rural population with chemical water pollution. *Public Health and Life Environment – PH&LE*, 2016, vol. 9 (282), pp. 20–23 (in Russian).
  11. Riabchikov B. E. Modern methods of iron removal and demanganization of natural water. *Energoberezhenie i vodopodgotovka*, 2005, vol. 6 (38), pp. 5–10 (in Russian).
  12. Zhavoronkov A. A., Mikhaleva L. M., Avtsyn A. P. Microelementoses – a new class of human, animal and plant diseases. *Problemy biogeokhimii i geokhimicheskoi ekologii. Trudy biogeokhimicheskoi laboratorii*. [Problems of Biogeochemistry and Geochemical Ecology. Proceedings of the Biogeochemical Laboratory]. Moscow, Nauka, 1999, vol. 23, pp. 183–225 (in Russian).
  13. Mishurina O. A., Chuprova L. V., Mullina E. R. Waste Water Demanganization with Bleach Solutions. *Almanac of Modern Science and Education*, 2013, vol. 9 (76), pp. 115–118 (in Russian).
  14. SanPiN 2.1.3684-21 “Sanitarno-epidemiologicheskie trebovaniia k sodержaniuu territorii gorodskikh i sel’skikh poselenii, k vodnym ob’ektam, pit’evoi vode i pit’evomu vodosnabzheniiu, atmosfernomu vozdukhу, pochvam, zhilym pomeshcheniiam, ekspluatatsii proizvodstvennykh, obshchestvennykh pomeshchenii, organizatsii i provedeniiu sanitarno-protivoepidemicheskikh (profilakticheskikh) meropriiatiu”: vzamen SanPiN 2.1.7.1287-03: data vved. 01.03.2021. *Utv. Postanovleniem Glavnogo gosudarstvennogo sanitarnogo vracha Rossiyskoy Federatsii ot 28 yanvarya 2021 g. № 3* [Sanitary and epidemiological requirements for the maintenance of territories of urban and rural settlements, for water bodies, drinking water and drinking water supply, atmospheric air, soils, residential premises, operation of industrial, public premises, organization and implementation of sanitary and anti-epidemic (preventive) measures: instead of SanPiN 2.1.7.1287-03: enforced on 01.03.2021, approved by the Decree of the Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation dated 28 January 2021, No. 3].
  15. Kaliukova E. N., Ivanskaia N. N. Demanganization of aqueous solutions with natural sorbent. *Vestnik Bashkirskogo Universiteta*, 2009, vol. 14, no. 4, pp. 1340–1342. (in Russian).
  16. Domracheva L. I., Skugoreva S. G., Ashikhmina T. Ia., Ogorodnikova S. Iu., Kondakova L. V., Velikoredchanina E. O., Korotkova A. V., Kovina A. L. The use of waste activated sludge for the treatment of wastewater contaminated with heavy metals. *Theoretical and Applied Ecology*, 2020, no. 4, pp. 176–184. <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2020-4-176-184> (in Russian).
  17. Dixit R., Wasiullah, Malaviya D., Pandiyan K., Singh U. B., Sahu A., Shukla R., Singh B. P., Rai J. P., Sharma P. K., Lade H., Paul D. Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: An overview of principles and criteria of fundamental processes. *Sustainability*, 2015, vol. 7, pp. 2189–2212. <https://doi.org/10.3390/su7022189>
  1. Rustembekova S. A., Baraboshkina T. A. *Mikroelementozy i faktory ekologicheskogo riska*. Pod red. V. V. Gorshkova [Gorshkov V. V., ed. Microelementoses and Environmental Risk Factors]. Moscow, Universitetskaya kniga, Logos, 2006. 112 p. (in Russian).
  2. Riabova E. G. The content of heavy metals in urban water bodies. *Theoretical and Applied Ecology*, 2019, no. 1, pp. 36–40 (in Russian). <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2019-1-036-040>
  3. Brown M. T., Foos B. P. Assessing children’s exposures and risks to drinking water contaminants: A manganese case study. *Human and Ecological Risk Assessment*, 2009, vol. 15, no. 5, pp. 923–947. <https://doi.org/10.1080/10807030903153030>
  4. Redwan M., Elhaddad E. Assessment the seasonal variability and enrichment of toxic trace metals pollution in sediments of Damietta branch, Nile river, Egypt. *Water*, 2020, vol. 12, article ID 3359. <https://doi.org/10.3390/w12123359>
  5. Su C., Jiang Q. L., Zhang W. J. A review on heavy metal contamination in the soil worldwide: Situation, impact and remediation techniques. *Environ. Skeptics and Critics*, 2014, vol. 3, no. 2, pp. 24–38.
  6. Proshad R., Kormoker T., Islam Md. S., Saha B. C., Hossain Md. R., Prince M. H., Khan M. M. An apportionment of arsenic and iron contamination of tube-well groundwater with possible health risk in Bangladesh. *Journal of Environment Pollution and Human Health*, 2017, vol. 5, no. 3, pp. 117–123. <https://doi.org/10.12691/jephh-5-3-7>
  7. Ashraf M. A., Alam M. N., Islam M. T., Alam M. S. Deterioration of water quality by heavy metal contamination at Mymensingh municipality. *Progressive Agriculture*, 2007, vol. 18, no. 1, pp. 235–242.
  8. Mazunina D. L. Negative effects of manganese in chronic intake with drinking water. *Human Ecology*, 2015, no. 3, pp. 25–31 (in Russian).
  9. Stepanova N. V., Valeeva E. R., Ziyatdinova A. I., Fomina S. F. Peculiarities of children’s risk assessment on ingestion of chemicals with drinking water. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 2016, vol. 7, iss. 3, pp. 1677.



18. Mosa K. A., Saadoun I., Kumar K., Dhankher O. P. Potential biotechnological strategies for the cleanup of heavy metals and metalloids. *Frontiers in Plant Science*, 2016, vol. 7, pp. 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00303>
19. Shubakov A. A., Mikhailova E. A., Ovodov Iu. S. Use of microorganisms to extract manganese from aqueous media. *Proceedings of the Komi Scientific Center of the Ural Division of the Russian Academy of Sciences*, 2014, iss. 1 (17), pp. 16–18 (in Russian).
20. Voytov E. L., Skolubovich Yu. L., Maykov V. M., Shvedkov P. V. Technology for preparing drinking water from an underground source with a high content of iron and manganese. *News of Higher Educational Institutions. Construction*, 2022, vol. 1 (757), pp. 44–56 (in Russian). <https://doi.org/10.32683/0536-1052-2022-757-1-44-56>
21. De Schampelaire L., Rabaey K., Boon N., Verstraete W., Boeckx P. Minireview: The potential of exchanged manganese redox cycling for sediment oxidation. *Geomicrobiology Journal*, 2007, vol. 24, no. 7-8, pp. 547–558. <https://doi.org/10.1080/01490450701670137>
22. Falamin A. A., Pinevich A. V. Isolation and characterization of a unicellular manganese-oxidizing bacterium from a freshwater lake in Northwestern Russia. *Microbiology*, 2006, vol. 75, pp. 180–185. <https://doi.org/10.1134/S0026261706020111>
23. Sujith P. P., Loka Bharathi P. A. Manganese oxidation by bacteria: biogeochemical aspects. In: *Molecular Biomineralization. Progress in Molecular and Subcellular Biology*, Müller W., ed., vol. 52. Berlin, Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, 2011, pp. 49–76.
24. Virpiranta H., Banasik M., Taskila S., Leiviskä T., Halttu M., Sotaniemi V., Tanskanen J. Isolation of efficient metal-binding bacteria from boreal peat soils and development of microbial biosorbents for improved nickel scavenging. *Water*, 2020, vol. 12, article ID 2000. <https://doi.org/10.3390/w12072000>
25. Brouwers G. J., Vijgenboom E., Corstjens P., De Vrind J. P. M., de Vrind-de Jong E. W. Bacterial Mn<sup>2+</sup> oxidizing systems and multicopper oxidases: An overview of mechanisms and functions. *Geomicrobiology Journal*, 2000, vol. 17, pp. 1–24. <https://doi.org/10.1080/014904500270459>
26. Tebo B. M., Geszvain K., Lee S.-W. Chapter 13. The molecular geomicrobiology of bacterial manganese (II) oxidation. In: Burton L. L., Mandl M., Loy A., eds. *Geomicrobiology: Molecular and Environmental Perspective*. New York, Springer, 2010, pp. 285–308.
27. Kalaimurugan D., Balamuralikrishnan B., Durairaj K., Vasudhevan P., Shivakumar M. S., Kaul T., Chang S. W., Ravindran B., Venkatesan S. Isolation and characterization of heavy-metal-resistant bacteria and their applications in environmental bioremediation. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 2020, vol. 17, pp. 1455–1462. <https://doi.org/10.1007/s13762-019-02563-5>
28. Pleshakova E. V., Reshetnikov M. V., Ngun C. T., Shuvalova E. P. Microbiological and biochemical indication of soils in the city of Mednogorsk. *Agrochemistry*, 2016, no. 1, pp. 66–73 (in Russian).
29. Zhang C., Qiao Q., Piper J. D. A., Huang B. Assessment of heavy metal pollution from a Fe-smelting plant in urban river sediments using environmental magnetic and geochemical methods. *Environmental Pollution*, 2011, vol. 159, pp. 3057–3070.
30. Pleshakova E., Ngun C., Reshetnikov M., Lariov M. V. Evaluation of the ecological potential of microorganisms for purifying water with high iron content. *Water*, 2021, vol. 13, article ID 901. <https://doi.org/10.3390/w13070901>
31. Granina L. Z., Parfenova V. V., Zemskaya T. I., Zakharova Y. R., Golobokova L. P. On iron and manganese oxidizing microorganisms in sedimentary redox cycling in lake Baikal. *Berliner Palaobiologische Abhandlungen*, 2003, vol. 4, pp. 121–128.
32. *Praktikum po mikrobiologii. Pod red. A. I. Netrusova.* [Netrusov A. I., ed. Workshop on Microbiology]. Moscow, Academy, 2005. 608 p. (in Russian).
33. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 1993. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, PA, USA, Translated under the Title: *Opredelitel' Bakterii Berdzhii*. Moscow, Mir, 1997. 1232 p. (in Russian).
34. Dawson R., Elliot D., Elliot W., Jones K. *Spravochnik biokhimiya* [Handbook of a Biochemist]. Moscow, Mir, 1991. 544 p. (in Russian).
35. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. New York, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 1659 p.
36. GOST 4974-2014. *Voda pit'evaia. Opreделение soderzhaniia margantsa fotometricheskimi metodami* [Drinking water. Determination of manganese content by photometric methods]. Moscow, Standartinform, 2015. 23 p. (in Russian).
37. Pleshakova E. V., Kasatkina M. A., Ngun C. T., Reshetnikov M. V. A study of manganese-oxidizing microorganisms isolated from microbiocenoses of highly magnetic soils. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2022, vol. 22, iss. 4, pp. 409–418 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2022-22-4-409-418>
38. El-Helow E. R. Cadmium biosorption by a cadmium resistant strain of *Bacillus thuringiensis*: Regulation and optimization of cell surface affinity for metal cations. *Biometals*, 2000, vol. 13, no. 4, pp. 273–280.
39. Mencha M. N. Iron bacteria in systems of drinking water supply from underground sources. *Water Supply and Sanitary Engineering*, 2006, no. 7, pp. 25–32 (in Russian).
40. Sirotkin A. S., Zhukova V. B. *Teoreticheskiye osnovy biotekhnologii: uchebno-metodicheskoye posobiye* [Theoretical Foundations of Biotechnology: Teaching aid]. Kazan, Kazan Technological University Publ., 2010. 87 p. (in Russian).

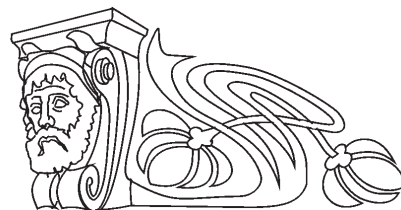
Поступила в редакцию 15.05.2023; одобрена после рецензирования 16.05.2023; принята к публикации 17.05.2023  
The article was submitted 15.05.2023; approved after reviewing 16.05.2023; accepted for publication 17.05.2023



Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 3. С. 331–336  
*Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2023, vol. 23, iss. 3, pp. 331–336  
<https://ichbe.sgu.ru> <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-3-331-336>, EDN: AREZLW

Научная статья  
УДК 595.461

## Филогенетический анализ скорпионов рода *Mesobuthus* (Vachon, 1950), обитающих на территории Казахстана, на основании анализа фрагментов митохондриальных и ядерных генов



Н. М. Поверенный ✉, В. В. Аникин

Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Россия, 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, д. 28

Поверенный Никита Максимович, аспирант кафедры морфологии и экологии животных, [nikitapov64@yandex.ru](mailto:nikitapov64@yandex.ru), <https://orcid.org/0000-0001-9958-9342>

Аникин Василий Викторович, доктор биологических наук, профессор кафедры морфологии и экологии животных, [anikinvasiliiv@mail.ru](mailto:anikinvasiliiv@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0001-8575-5418>

**Аннотация.** Систематика скорпионов рода *Mesobuthus* в недавнем прошлом, претерпела ряд существенных корректировок. Изначально на основании особенностей морфологических признаков учёные выделили и описали значительное число подвидов у разных видов этого рода. В последнее десятилетие современные учёные на основе результатов генетических и морфологических анализов «пересмотрели» видовое разнообразие рода и сформировали новые отдельные видовые комплексы. Так, был выделен видовой комплекс – «*Mesobuthus caucasicus*», который в 2019 г. был восстановлен Франтишеком Коварджик до рода *Olivierus*. На текущий момент род насчитывает 18 видов, 7 из которых обитают на территории Средней Азии. Ареалы обитания большинства среднеазиатских видов рода *Olivierus* пересекаются с ареалами обитания видов рода *Mesobuthus*. В частности, на территории республики Казахстан встречается вид *Olivierus gorelovi*, чей ареал обитания совпадает с ареалом обитания вида *Mesobuthus thersites*. Поскольку видовой статус некоторых популяций скорпионов, обитающих на территории республики Казахстан, до сих пор остается неопределённым и слабоизученным, авторами предпринята попытка определить филогенетические связи особей из разных популяций, используя данные полученных результатов молекулярно-генетического баркодинга. Анализ проводился по трём ядерным и одному митохондриальному фрагментам генов у скорпионов, обитающих на территориях Жамбылской, Карагандинской, Атырауской, Туркестанской, Абайской, Алматинской областей. Полученные результаты свидетельствуют, что скорпионы рода *Olivierus* обитают на территориях Атырауской, Алматинской, Карагандинской и Туркестанской областей, а скорпионы рода *Mesobuthus* обитают на территориях Жамбылской, Карагандинской и Абайской областей. Данная работа вносит непосредственный вклад в изучение биоразнообразия скорпионофауны Средней Азии.

**Ключевые слова:** фауна, скорпионы, *Mesobuthus*, *Olivierus*, протеинкиназа, секвенирование, филогеография, Средняя Азия

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность Сергею Вячеславовичу Малярову (г. Темиртау, Республика Казахстан) за возможность использовать собранный материал для исследования.

**Для цитирования:** Поверенный Н. М., Аникин В. В. Филогенетический анализ скорпионов рода *Mesobuthus* (Vachon, 1950), обитающих на территории Казахстана, на основании анализа фрагментов митохондриальных и ядерных генов // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 3. С. 331–336. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-3-331-336>, EDN: AREZLW

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0)

Article

**Phylogenetic analysis of scorpions of the genus *Mesobuthus* (Vachon, 1950), inhabiting the territory of Kazakhstan, based on the analysis of fragments of mitochondrial and nuclear genes.**

N. M. Poverenniy ✉, V. V. Anikin

Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia

Nikita M. Poverenniy, [nikitapov64@yandex.ru](mailto:nikitapov64@yandex.ru), <https://orcid.org/0000-0001-9958-9342>

Vasily V. Anikin, [anikinvasiliiv@mail.ru](mailto:anikinvasiliiv@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0001-8575-5418>

**Abstract.** The taxonomy of scorpions belonging to the genus *Mesobuthus* has undergone significant revisions in recent times. Initially, based on the morphological characteristics, scientists identified and described a considerable number of subspecies within different species of this



genus. However, in the last decade, modern researchers have “revised” the species diversity of the genus based on the results of genetic and morphological analyses, forming new separate species complexes. As a result, a species complex called “*Mesobuthus caucasicus*” was identified, which was later reassigned to the genus *Olivierus* by František Kovařík in 2019. Currently, the genus *Olivierus* comprises 18 species, with 7 of them inhabiting the territory of Central Asia. The distribution ranges of most Central Asian species of the genus *Olivierus* overlap with those of the genus *Mesobuthus*. Specifically, in the territory of the Republic of Kazakhstan, the species *Olivierus gorelovi* occurs, whose distribution range coincides with that of *Mesobuthus thersites*. Due to this overlap, the taxonomic status of some scorpion populations inhabiting the territory of the Republic of Kazakhstan remains uncertain and poorly studied. The authors of this study attempted to determine the phylogenetic relationships among individuals from different populations using data obtained from molecular genetic barcoding. The analysis was conducted on three nuclear and one mitochondrial gene fragments of scorpions inhabiting the regions of Zhambyl, Karaganda, Atyrau, Turkestan, Abay, and Almaty. The obtained results indicate that scorpions of the genus *Olivierus* inhabit the territories of Atyrau, Almaty, Karaganda, and Turkestan regions, while scorpions of the genus *Mesobuthus* inhabit the territories of Zhambyl, Karaganda, and Abay regions. This study makes a direct contribution to the study of scorpion fauna biodiversity in Central Asia.

**Key words:** *Mesobuthus*, protein kinase, sequencing, *Olivierus*, scorpion

**Acknowledgements.** The authors are grateful to Sergey V. Malyarov (the city of Temirtau, Kazakhstan) for the opportunity to collect the material used for the study.

**For citation:** Poverenniy N. M., Anikin V. V. Phylogenetic analysis of scorpions of the genus *Mesobuthus* (Vachon, 1950), inhabiting the territory of Kazakhstan, based on the analysis of fragments of mitochondrial and nuclear genes. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2023, vol. 23, iss. 3, pp. 331–336 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-3-331-336>, EDN: AREZLW

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC-BY 4.0)

## Введение

Род *Mesobuthus* был недавно пересмотрен и на данный момент насчитывает 29 видов [1]. Центром видового разнообразия скорпионов рода *Mesobuthus* является территория Ирана. В Средней Азии обитают всего семь видов из этого рода, но эти виды широко распространены в регионе. В Казахстане массово распространен вид *Mesobuthus thersites*. Недавние молекулярно-генетические данные авторов продемонстрировали, что сборы из Казахстана относились исключительно к этому виду, но в анализ не были введены последовательности фрагментов генов скорпионов рода *Olivierus* [2]. Недавние научные таксономические события, а именно восстановление рода *Olivierus* [3] и выделение трёх новых видов из Узбекистана и Казахстана этого рода [4], актуализировали использование данных молекулярно-генетического анализа по видам данного рода. Были привнесены в анализ расшифрованные нуклеиновые последовательности представителей скорпионов рода *Olivierus* при исследовании результатов баркодинга скорпионов рода *Mesobuthus*. Известно, что в южной части Казахстана обитают скорпионы вида *Olivierus gorelovi*, ареал которых совпадает с ареалом вида *Mesobuthus thersites* [1]. В связи с этим целью работы было проведение филогенетического анализа различных таксонов скорпионов по современным образцам (сборам) из различных мест обитания на территории Казахстана (Жамбылской, Карагандинской, Атырауской,

Туркестанской, Абайской и Алматинской областях) с определением таксономического статуса скорпионов из этих регионов республики.

## Материалы и методы

Сбор скорпионов проводился с июня по август 2020–2021 гг. Коллектирование скорпионов было произведено на территориях в окрестностях села Шокай (Жамбылская область), посёлка Доссор (Атырауская область), города Саптаев, города Балхаш (Карагандинская область), береговой линии озера Алаколь (Абайская область), берега Шардаринского водохранилища (Туркестанская область), города Капчагай (ныне Конаев) (Алматинская область) (рис. 1).

Выполнение работ по пробоподготовке материала, выделение ДНК, амплификация, секвенирование и анализ полученных данных осуществлялся на базе учебно-молекулярной лаборатории биологического факультета и кафедре морфологии и экологии животных Саратовского национального исследовательского государственного университета им. Н. Г. Чернышевского.

## Результаты и их обсуждение

Для проведения молекулярно-генетических исследований был взят митохондриальный ген цитохром-с-оксидазы первый субъединицы (COI) [6,7], а также ядерные гены: тиоредоксин-1 (Txr1), дефенсин (4kD) и протеинкиназа [8]. Для амплификации и секвенирования были выбраны специфичные праймеры:



Рис. 1. Места сбора скорпионов, обитающих на территории Казахстана. Чёрными точками отмечены места сборов: 1 – село Шокай (Жамбылская область), 2 – посёлок Доссор (Атырауская область), 3 – окрестности города Саптаев (Карагандинская область), 4 – озёра Алаколь (Абайская область), 5 – Балхаш (Карагандинская область), 6 – берег Шардаринского водохранилища (Туркестанская область), 7 – окрестности города Капчагай (ныне Конаев) (Алматинская область) [5]

Fig. 1. Places of collection of scorpions living on the territory of Kazakhstan. Black dots mark collection sites: 1 – Shokai village (Zhambyl region), 2 – Dossor village (Atyrau region), 3 – neighborhood of the city of Saptaev (Karaganda region), 4 – Alakol lakes (Abai region), 5 – Balkhash (Karaganda region), 6 – shore of the Shardara reservoir. (Turkestan region), 7 – neighborhood of the city of Kapchagay (now Konaev) (Almaty region) [5]

Цитохром-с-оксидаза 1 субъединица:

5'-GGTCAACAAATCATCATAAAGATATTGG-3',

5'-CCCGGTA AAAAT TAAAATATAAACTTC-3';

протеинкиназа: 5'-TCTGATGTATGGCAGATGGCAATG-3',

5'-CGAACTCAAGATCCACTCCTGTA CT CG-3';

дефенсин: 5'-GCCATGAAAGCCGTTGCTATTCT-3'

5'-ACGACACAAATACAGGTGA-3';

тиоредоксин-1: 5'-TAACTTGACCATTTACCTAGAATGTCAC-3'

5'-CATGTA CTGACGCTGGCATTGCC-3'.

Для нашего исследования ДНК была выделена из заднебрюшья скорпионов, в некоторых случаях использовалось переднебрюшье, но без многолопастной печени, так как она токсична и может повлиять на выход чистой ДНК. ДНК была выделена с помощью набора DNA mini kit (Qiagen, США). Размер ДНК оценивался с помощью метода гель-электрофореза. Для окрашивания ДНК использовался 6-кратный DNA Gel Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, США). Для постановки использовался 1% агарозный гель, однократный трис-боратный буфер. Напряжение составляло 120 В, для сравнительной оценки использовался маркер GenRuler 100bp plus. Процедуру проводили в течение 15 мин. Для проведения полимеразной цепной реакции использовали следующий амплификационный профиль: 1-й шаг – 1 мин 96°C (1 шаг –

цикл), 2-й шаг – 20 с 96°C, 3-й шаг – 30 с 64°C, 4-й шаг – 40 с 72°C (2–4-е шаги – 24 цикла).

В реакцию было добавлено: 6 мкл 10-кратного Tersus-буфера, 1 мкл Tersus-полимеразы, 0,5 мкл 50-кратной смеси dNTP, 5 п/моль каждого праймера и 50 нг ДНК. Реакция по Сэнгеру, очистка ее продуктов и секвенирование проводилось по соответствующим протоколам.

Филогенетическое древо построено с использованием модели максимального правдоподобия, модель Джукса–Кантора использовалась в качестве модели замещения [9]. Для того чтобы оценить генетическое расхождение между образцами, мы применили метод bootstrap с использованием 2000 репликаций. Для построения дендрограммы использовали программный пакет Mega X. Выравнивание расшифрованных нуклеотидных последовательностей выполнено вручную.



Для анализа, кроме наших собственных образцов из Казахстана, были введены последовательности из базы данных NCBI. Использовались последовательности скорпионов *Mesobuthus eupeus* и *Olivierus gorelovi*, обитающих на территории Туркменистана, Узбекистана, Казахстана. Кроме того, в анализ были

введены последовательности, полученные в ходе работы авторов по определению видового статуса популяций скорпионов из Нижнего Поволжья (Саратовская, Волгоградская, Астраханская области) [2]. Полученные результаты по разным генам представлены на кладограммах I и II (рис. 2).

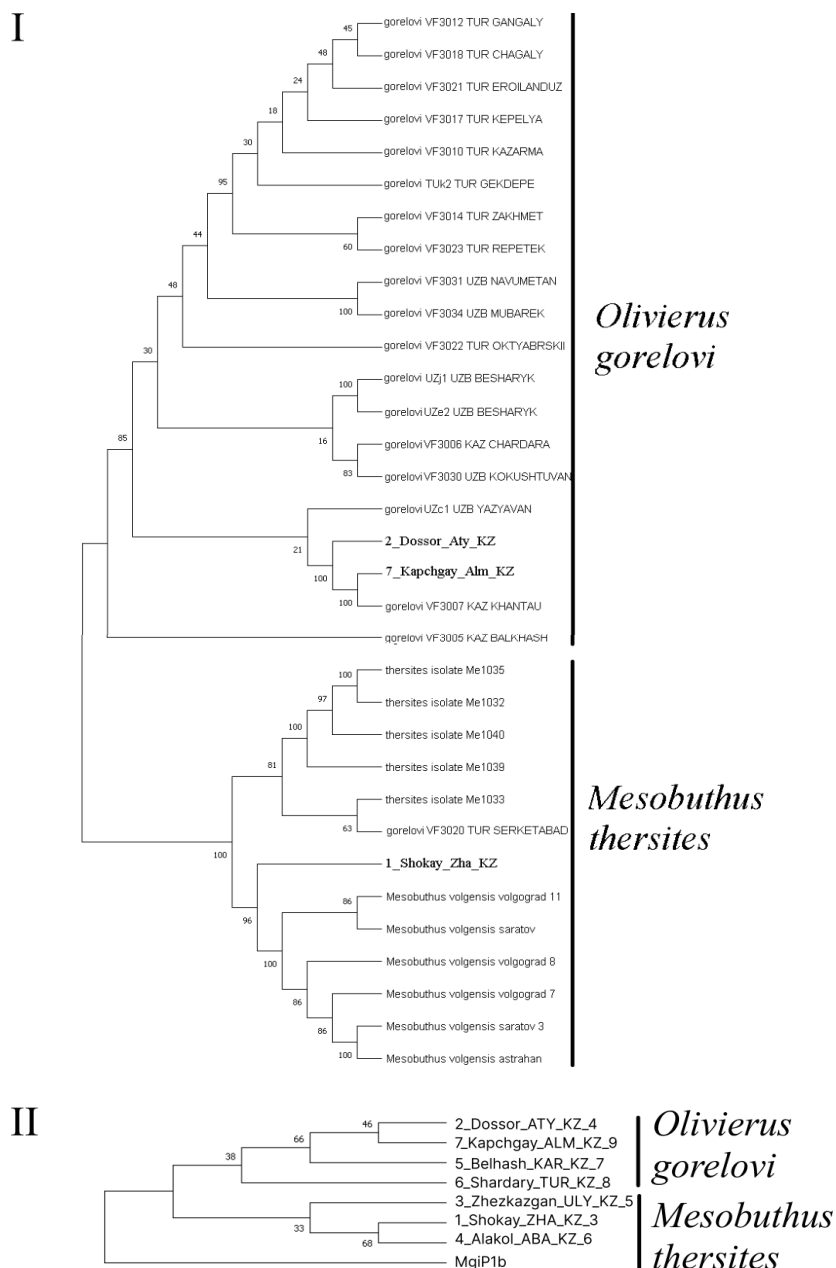


Рис. 2. Дендрограммы, построенные на основе анализа расшифрованных нуклеотидных последовательностей фрагментов генов: COI (I), дефенсина, протеинкиназы и тиоредоксина (II) скорпионов, обитающих в Нижнем Поволжье (Саратовская, Волгоградская, Астраханская области), а также Туркменистана, Узбекистана, Казахстана

Fig. 2. Dendrograms built on the basis of the analysis of the decoded nucleotide sequences of gene fragments: COI (I), defensin, protein kinase and thioredoxin (II) of scorpions living in the Lower Volga region (Saratov, Volgograd, Astrakhan regions), as well as Turkmenistan, Uzbekistan, Kazakhstan



Первичный анализ фрагментов генов COI показал наличие двух кластеров, первый из которых включает в себя 2 клады, одна из которых состоит из сборной группы туркменских, узбекских и казахских популяций. Вторая клада включает в себя сиквенсы наших образцов из Казахстана (Доссор (Атырауская область), Капчагай (ныне Конаев) (Алматинская область)) и образцов казахско-узбекских популяций *Olivierus gorelovi*. Второй кластер также представлен двумя кладами. Первая состоит в большинстве из казахских популяций *Mesobuthus thersites*. Вторая клада представлена сиквенсами скорпионов Саратовской, Волгоградской и Астраханской областей. Внутри клады, но отдельной ветвью, обособленно находится образец, собранный в окрестностях села Шокай (Жамбылская область).

Вторичный анализ, основанный на сравнении комплекса ядерных генов (дефенсин, тиоредоксин-1, протеинкиназа), показал наличие двух кластеров. Первый кластер состоит из представителей скорпионов Атырауской, Алматинской, Карагандинской, Туркестанской областей. Второй кластер представлен сборной группой представителей популяций Жамбылской, Карагандинской, Абайской областей.

### Заключение

Исходя из полученных данных по первичному анализу, можно предположить, что скорпионы, обитающие на территориях Атырауской и Алматинской области, относятся к виду *Olivierus gorelovi*. Также следует, что скорпионы, обитающие на территории села Шокай Жамбылской области относятся к роду *Mesobuthus*, а именно, вероятнее всего, являются близкородственными к узбекским популяциям скорпионов вида *Mesobuthus barszcevszkii*. Близкородственность между этими узбекскими и нижеволжскими популяциями была установлена в недавней ревизии рода [1]. Вторичный анализ данных по комплексу ядерных генов частично подтверждает полученные результаты по гену COI, что скорпионы *Olivierus gorelovi* обитают на территориях в окрестностях посёлка Доссор (Атырауская область), города Капчагай (ныне Конаев) (Алматинская область), города Балхаш (Карагандинская область), береговой линии Шардаринского водохранилища (Туркестанская область). Скорпионы, обитающие на территориях в окрестностях села Шокай (Жамбылская область), города Саптаев (Кара-

гандинская область), озера Алаколь (Абайская область), относятся к виду *Mesobuthus thersites*. Таким образом, благодаря полученным результатам удалось установить таксономический статус скорпионов из разных популяций, обитающих в схожих ландшафтах и биотопах Казахстана, и ответить на вопрос о присутствии близкородственных видов скорпионофауны в данном регионе.

### Список литературы

1. Kovařík F., Fet V., Gantenbein B., Graham M. R., Yağmur E. A., Štáhlavský F., Poverennyi N. M., Novruzov N. E. A revision of the genus *Mesobuthus* Vachon, 1950, with a description of 14 new species (Scorpiones: Buthidae) // *Euscorpius*. 2022. № 348. P. 1–189.
2. Поверенный Н. М., Аникин В. В. Филогенетические связи скорпиона *Mesobuthus eupeus volgensis* (Birula, 1925) из Нижнего Поволжья с близкородственными видами скорпионов Центральной Азии на основе анализа ДНК по гену COI // *Энтомологические и паразитологические исследования в Поволжье*. 2020. Вып. 17. С. 12–16.
3. Kovařík F. Taxonomic reassessment of the genera *Lychas*, *Mesobuthus*, and *Olivierus*, with descriptions of four new genera (Scorpiones: Buthidae) // *Euscorpius*. 2019. № 288. P. 1–27.
4. Fet V., Kovařík F., Gantenbein B., Graham M. R. Three new species of *Olivierus* (Scorpiones: Buthidae) from Kazakhstan and Uzbekistan // *Zootaxa*. 2021. Vol. 5006, № 1:29 Jul. P. 54–72. <https://doi.org/10.11646/ZOOTAXA.5006.1.9>
5. Карта – Сервис Google Планета Земля. URL: <https://www.google.ru/intl/ru/earth/> (дата обращения: 27.05.23).
6. Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial Cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates // *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 1994. Vol. 3, № 5. P. 294–299.
7. Raharimalala F. N., Ravaomanarivo L. H., Ravelonandro P., Rafaraso L. S., Zouache K., Tran-Van V. Biogeography of the two major arbovirus mosquito vectors, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae), in Madagascar // *Parasites and Vectors*. 2012. № 5. Article number 56. P. 5–10. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-56>
8. Gantenbein B., Keightley P. D. Rates of molecular evolution in nuclear genes of east Mediterranean scorpions // *Evolution*. 2004. Vol. 58, iss. 11. P. 2490. PMID: 15612292.
9. Chor B., Tuller T. Maximum likelihood of evolutionary trees: Hardness and approximation // *Bioinformatics*. 2005. Vol. 21. Suppl. 1. P. i97–i106. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti1027>





## References

1. Kovařík F., Fet V., Gantenbein B., Graham M. R., Yağmur E. A., Šťáhlavský F., Poverennyi N. M., Novruzov N. E. A revision of the genus *Mesobuthus* Vachon, 1950, with a description of 14 new species (Scorpiones: Buthidae). *Euscorpius*, 2022, no. 348, pp. 1–189.
2. Poverennyi N. M., Anikin V. V. The phylogenetic relations of scorio – *Mesobuthus eupeus volgensis* (Birula, 1925) from the Lower Volga Region with closely related species from Central Asia on the base of DNA analysis by gene COI. *Entomological and parasitological investigations in Volga Region*, 2020, iss. 17, pp. 12–16 (in Russian).
3. Kovařík F. Taxonomic reassessment of the genera *Lychas*, *Mesobuthus*, and *Olivierus*, with descriptions of four new genera (Scorpiones: Buthidae). *Euscorpius*, 2019, no. 288, pp. 1–27.
4. Fet V., Kovařík F., Gantenbein B., Graham M. R. Three new species of *Olivierus* (Scorpiones: Buthidae) from Kazakhstan and Uzbekistan. *Zootaxa*, 2021, vol. 5006, no. 1:29 Jul., pp. 54–72. <https://doi.org/10.11646/ZOOTAXA.5006.1.9>
5. Karta – Servis Google Planeta Zemlja (Map – Google Earth Service). Available at: <https://www.google.ru/intl/ru/earth/> (accessed May 27, 2023).
6. Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial Cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1994, vol. 3, no. 5, pp. 294–299.
7. Raharimalala F. N., Ravaomanarivo L. H., Ravelonandro P., Rafaraso L. S., Zouache K., Tran-Van V. Biogeography of the two major arbovirus mosquito vectors, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae), in Madagascar. *Parasites and Vectors*, 2012, no. 5, article no. 56, pp. 5–10. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-56>
8. Gantenbein B., Keightley P. D. Rates of molecular evolution in nuclear genes of east Mediterranean scorpions. *Evolution*, 2004, vol. 58, iss. 11, pp. 2490, PMID: 15612292.
9. Chor B., Tuller T. Maximum likelihood of evolutionary trees: Hardness and approximation. *Bioinformatics*, 2005, vol. 21, suppl. 1, pp. i97–i106. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti1027>

Поступила в редакцию 13.05.2023; одобрена после рецензирования 14.05.2023; принята к публикации 20.05.2023  
The article was submitted 13.05.2023; approved after reviewing 14.05.2023; accepted for publication 20.05.2023



Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 3. С. 337–344  
*Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2023, vol. 23, iss. 3, pp. 337–344  
<https://ichbe.sgu.ru>

<https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-3-337-344>, EDN: BCAPTE

Научная статья  
УДК 579.64

## Антагонистическая активность некоторых представителей рода *Herbaspirillum* в отношении фитопатогенных микромицетов



Н. С. Величко<sup>1</sup>✉, Н. К. Кондюрина<sup>1,2</sup>, Ю. П. Федоненко<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ «Саратовский научный центр Российской академии наук» (ИБФРМ РАН), Россия, 410049, г. Саратов, пр. Энтузиастов, д. 13

<sup>2</sup>Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Россия, 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, д. 83

Величко Наталья Сергеевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории биохимии [velichko\\_n@ibppm.ru](mailto:velichko_n@ibppm.ru), <https://orcid.org/0000-0001-9734-3947>

Кондюрина Наталья Кирилловна, <sup>1</sup>лаборант лаборатории биохимии, <sup>2</sup>студент кафедры биохимии и биофизики, [natasha.kondyurina@gmail.com](mailto:natasha.kondyurina@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0003-2975-6066>

Федоненко Юлия Петровна, кандидат биологических наук, <sup>1</sup>заведующий лабораторией биохимии, доцент, <sup>2</sup>доцент кафедры биохимии и биофизики, [fedonenko\\_yu@ibppm.ru](mailto:fedonenko_yu@ibppm.ru), <https://orcid.org/0000-0003-0255-8190>

**Аннотация.** Распространенной проблемой агропромышленного комплекса является ущерб от инфекционных заболеваний растений, вызываемых наиболее распространенными фитопатогенами родов *Alternaria*, *Helminthosporium*, *Cladosporium* и *Fusarium*, приводящих не только к снижению урожая, но и к ухудшению его качества в результате накопления в зерне опасных для здоровья человека и животных продуктов жизнедеятельности грибов – микотоксинов. В качестве альтернативы фунгицидам в последнее время используются биологические средства защиты урожая, основанные на применении антагонистов фитопатогенных грибов – непатогенных микроорганизмов. Целью исследования явилась оценка антагонистического потенциала почвенных микроорганизмов рода *Herbaspirillum* в отношении грибов рода *Fusarium*. Скрининг симбиотических бактерий, проявляющих фунгицидную активность, сохраняет свою актуальность, поскольку позволяет выявлять потенциальные инструменты биоконтроля. Представлены результаты оценки биологической активности коллекционных штаммов бактерий рода *Herbaspirillum* по отношению к полевым штаммам мицелиальных грибов рода *Fusarium*. Антигрибную активность исследуемых бактериальных штаммов определяли по размеру зоны ингибирования роста грибного мицелия вокруг лунок. Учитывали наличие и интенсивность роста фитопатогенных грибов, бактерий-антагонистов, а также характер их взаимодействия. На основании проведенного первичного скрининга охарактеризована биофунгицидная активность гербаспирилл. Результаты данной работы могут быть использованы в дальнейшей разработке экологически безопасных, высокопродуктивных и конкурентоспособных в адаптивном земледелии биопрепаратов, способных контролировать фузариоз важнейших сельскохозяйственных культур и активизировать защитные системы растений.

**Ключевые слова:** антагонизм, *Fusarium*, *Herbaspirillum*, фитопатогены, биоконтроль

**Благодарности.** Исследование выполнено в рамках проекта Российского научного фонда № 22-24-00421 (<https://rscf.ru/project/22-24-00421/>).

**Для цитирования:** Величко Н. С., Кондюрина Н. К., Федоненко Ю. П. Антагонистическая активность некоторых представителей рода *Herbaspirillum* в отношении фитопатогенных микромицетов // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 3. С. 337–344. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-3-337-344>, EDN: BCAPTE

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0)

Article

**Antagonistic activity of some *Herbaspirillum* species against phytopathogenic micromycetes**

N. S. Velichko<sup>1</sup>✉, N. K. Kondyurina<sup>1,2</sup>, Yu. P. Fedonenko<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms – Subdivision of the Federal State Budgetary Research Institution Saratov Federal Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences (IBPPM RAS), 13 Entuziastov prospekt, Saratov 410049, Russia

<sup>2</sup>Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia

Natalya S. Velichko, [velichko\\_n@ibppm.ru](mailto:velichko_n@ibppm.ru), <https://orcid.org/0000-0001-9734-3947>

Natalya K. Kondyurina, [natasha.kondyurina@gmail.com](mailto:natasha.kondyurina@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0003-2975-6066>

Yulia P. Fedonenko, [fedonenko\\_yu@ibppm.ru](mailto:fedonenko_yu@ibppm.ru), <https://orcid.org/0000-0003-0255-8190>



**Abstract.** A common problem of agriculture is damage from infectious plant diseases caused mainly by plant-pathogenic *Alternaria*, *Helminthosporium*, *Cladosporium*, and *Fusarium*. Fusariosis is a harmful, widespread worldwide disease caused by *Fusarium* species, which leads not only to a decrease in yield but also to a deterioration in its quality as a result of the accumulation of mycotoxin waste products of fungi that are hazardous to human and animal health. Biocontrol is an environmentally friendly approach to using microorganisms to control plant diseases. The use of antagonists is one of the ways to reduce the harmfulness of phytopathogens. Interest in such organisms has increased in recent decades due to the accumulation of negative consequences from the long-term use of chemical protection agents with a lack of organic fertilizers. The paper presents the results of assessing the biological activity of collection strains of bacteria of the genus *Herbaspirillum* with field strains of filamentous fungi of the genus *Fusarium*. Based on the primary screening of representatives of different species of *Herbaspirillum* for antagonism against natural isolates of *Fusarium* by the method characterizing their bio-fungicidal activity. The results of this work can be used in environmentally friendly, highly productive, and competitive biopreparations in adaptive farming, capable of controlling the *Fusarium* of the most important crops and activating plant defence systems.

**Keywords:** antagonism, *Fusarium*, *Herbaspirillum*, phytopathogens, biocontrol

**Acknowledgments.** This work was supported by the Russian Science Foundation, project No. 22-24-00421 (<https://rscf.ru/en/project/22-24-00421/>).

**For citation:** Velichko N. S., Kondyurina N. K., Fedonenko Yu. P. Antagonistic activity of some *Herbaspirillum* species against phytopathogenic microfungi. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2023, vol. 23, iss. 3, pp. 337–344 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-3-337-344>, EDN: BCAPTE

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC-BY 4.0)

## Введение

Мировое сельское хозяйство несёт огромный ущерб от инфекционных заболеваний растений, вызываемых в основном фитопатогенными грибами и бактериями [1]. Видовой и количественный состав микромицетов-возбудителей болезней сельскохозяйственных культур не являются постоянными величинами и могут меняться. К наиболее распространенным фитопатогенам этой группы относят представителей родов *Alternaria*, *Helminthosporium*, *Cladosporium* и *Fusarium*. Грибы рода *Fusarium*, являясь преимущественно факультативными паразитами, вызывают массовые поражения растений при определенных условиях, а также известны как «плесени хранения» [2]. Инфицирование важнейших сельскохозяйственных культур приводит не только к снижению урожая, но и к ухудшению его качества в результате накопления в зерне опасных для здоровья человека и животных фузариотоксинов. Согласно данным Организации по продовольствию и сельскому хозяйству при ООН, более 25% всего производимого зерна поражено микотоксинами. Кроме того, повсеместное распространение технологии минимальной обработки почв влечет за собой сохранение, а при благоприятных условиях накопление инфекционной нагрузки для последующих культур [3].

Залогом обеспечения продовольственной безопасности населения является защита урожая от вредоносных организмов. Практика мирового земледелия свидетельствует о том, что до 25–30% урожая обеспечивают химические средства защиты растений. В то же время широкое многолетнее применение химических

фунгицидов сопровождается накоплением неблагоприятных экологических последствий, а также может приводить к появлению не только более устойчивых, но и более токсиногенных и агрессивных форм фитопатогена [4].

В качестве альтернативы фунгицидам в последнее время используются биологические средства защиты урожая, основанные на применении антагонистов фитопатогенных грибов – непатогенных микроорганизмов, обитающих в ризосфере, филлосфере или эндофитно в растениях, конкурирующих с ними за экологические ниши и пищевые субстраты, а также обладающих ценными функциональными свойствами для растений-хозяев (*plant growth-promoting bacteria* – бактерии, стимулирующие рост растений, PGPR) [5]. При успешной конкуренции бактерии группы PGPR подавляют рост и развитие почвенных фитопатогенов, вытесняют их из зоны влияния на растения. Как следствие, ограничиваются инфицирование и заболеваемость растений, что способствует их нормальному росту и развитию. Особый интерес для исследователей представляют бактерии родов *Gluconacetobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Rhizobium* и *Herbaspirillum*, составляющие перспективный биотехнологический ресурс для создания адекватной и экологически безопасной альтернативы агрохимикатам [6].

Представители рода *Herbaspirillum* при взаимодействии с растениями увеличивают их резистентность и продуктивность, в том числе за счет индукции защитных механизмов в отношении различных стрессовых факторов [7]. *Herbaspirillum* spp. обладают высокой колонизи-



рующей активностью, способны образовывать биопленки на поверхности корневой системы [8], что составляет конкурентное преимущество при реализации биоконтроля [9]. Широкое распространение гербаспирилл (в почве, воде, на поверхности и во внутренних тканях растений), высокая адаптивная способность к изменяющимся условиям окружающей среды, разнообразие биосинтетических и катаболических реакций позволяют рассматривать их как в качестве перспективного объекта для применения в биотехнологии [10, 11], так и в качестве адекватной модели для изучения различных аспектов растительно-микробных взаимодействий.

Скрининг симбиотических бактерий, проявляющих фунгицидную активность, сохраняет свою актуальность, поскольку позволяет выявлять потенциальные инструменты биоконтроля. В связи с этим целью исследования явилась оценка антагонистического потенциала почвенных микроорганизмов рода *Herbaspirillum* в отношении грибов рода *Fusarium*.

## Материалы и методы

**Объекты исследования.** В работе использовали культуры бактерий *Herbaspirillum lusitanum* P6-12<sup>T</sup> (IBPPM 515), *H. frisingense* GSF30<sup>T</sup> (IBPPM 626), *H. chlorophenolicum*<sup>T</sup> (IBPPM 627), *H. seropedicae* Z67<sup>T</sup> (IBPPM 630), предоставленные коллекцией ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (<http://collection.ibppm.ru>), которые выращивали в жидкой синтетической питательной среде с витаминами [12] при 30°C в течение 24 ч, что соответствовало окончанию экспоненциальной фазы роста.

В качестве тест-объектов использовали полевые штаммы мицелиальных грибов рода *Fusarium* (табл. 1), любезно предоставленные коллекцией лаборатории микологии и фитопатологии Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений, вызывающие корневые гнили пшеницы (<http://vizrspb.ru/struktura-instituta/research/mikologii-i-fitopatologii/>). Для хранения культур грибов и поддержания их в рабочем состоянии использовали агаризованную среду Чапека и картофельно-глюкозный агар.

Таблица 1 / Table 1

**Фитопатогенные грибы рода *Fusarium*, использованные в работе**  
Origin, source and year of isolation of *F. culmorum*, *F. sporotrichioides*, *F. oxysporum*,  
*F. graminearum*, *F. solani* strains used in the present work

Вид гриба <i>Fusarium</i> species	Штамм Strain	Место, источник и год выделения Origin, source and year of isolation
<i>F. culmorum</i>	58800	Ленинградская обл. ячмень, зерно, 2015 г. Leningradskaya obl., barley, grain, 2015
<i>F. sporotrichioides</i>	262900	Красноярский край, пшеница, зерно, 2018 г. Krasnoyarskiy kray, wheat, grain, 2018
<i>F. oxysporum</i>	60521	Челябинская обл., ячмень, корень, 2019 г. Chelyabinskaya obl., barley, root, 2019
<i>F. graminearum</i>	58889	Краснодарский край, пшеница, колос, 2016 г. Krasnodarskiy kray, wheat, ear, 2016
<i>F. solani</i>	60519	Челябинская обл. ячмень, корень, 2019 г. Chelyabinskaya obl., barley, root, 2019

Фунгицидную активность гербаспирилл оценивали методом лунок на среде Чапека [13]. В центр чашки Петри с питательной средой вносили мицелий гриба (10×10 мм). Стерильным сверлом вырезали из агаровой пластинки четыре симметрично расположенных лунки диаметром 5 мм, в которые вносили по 50 мкл суспензии клеток исследуемых штаммов бактерий (10<sup>9</sup> КОЕ/мл). Контролем служил посев гриба без бактерий. Чашки Петри выдерживали в термостате при 30°C в течение 5 суток. Учитывали наличие и интенсивность роста фитопатогенных

грибов, бактерий-антагонистов, а также характер их взаимодействия. Антигрибную активность исследуемых бактериальных штаммов определяли по размеру зоны ингибирования роста грибного мицелия вокруг лунок. Взаимоотношения патогена и антагониста характеризовали по классификации Т. В. Пестинской [14].

## Результаты и их обсуждение

Использование методов определения антагонистической активности *in vitro* позволяет быстро и эффективно провести скрининговые



исследования большого массива бактериальных штаммов и грибных тест-культур. К этой группе традиционно относят диффузионные методы, в том числе используемый в данной работе метод лунок, позволяющие визуально наблюдать продукцию бактериями антигрибных метаболитов, диффундирующих в толщу агаризованной среды и подавляющих рост тест-культур.

Опыты по определению фунгицидной активности бактериальных штаммов проводят в отношении каждого вида гриба. Однако большое количество видов рода *Fusarium* приводит к некоторому ограничению выборки тест-культур. Как правило, при подобных исследованиях выбирают либо доминирующие в определенном регионе виды грибов, либо наиболее агрессивные виды или штаммы. В связи с этим в качестве тест-культур нами были выбраны полевые

штаммы разных видов *Fusarium*, изолированные из корней, колоса и зерна пшеницы и ячменя в различных регионах.

Как следует из представленных в табл. 2 результатов первичного скрининга, все используемые в ходе данной работы штаммы *Herbaspirillum* spp. характеризовались фунгицидной активностью в отношении фузариозных грибов. При этом установлена избирательность и специфичность антагонистического действия бактерий на грибные тест-культуры, очевидно, обусловленные несколькими механизмами супрессии фитопатогенов, к которым у бактерий относят активный синтез вторичных метаболитов различной химической природы, таких как гетероциклические конденсированные соединения, циклические липопептиды, пептиды, полипептиды, гидролитические ферменты, полисахариды и др.

Таблица 2 / Table 2

**Антагонистическая активность штаммов *Herbaspirillum* spp. в отношении фитопатогенных грибов р. *Fusarium***  
**The spectrum of antagonistic action of the *Herbaspirillum* species against phytopathogenic *Fusarium***

Фитопатоген Phytopathogen	Бактерия-антагонист / Bacteria			
	P6-12 <sup>T</sup>	GSF30 <sup>T</sup>	Z67 <sup>T</sup>	CPW301 <sup>T</sup>
<i>F. culmorum</i> 58800	+++	+++	+++	+++
<i>F. sporotrichioides</i> 262900	+++	+++	++	+
<i>F. oxysporum</i> 60521	+	+	+/-	+/-
<i>F. graminearum</i> 58889	++	+++	+	++
<i>F. solani</i> 60519	–	+/-	–	+/-

Примечание. Величина зоны подавления фитопатогена: «–» – отсутствует, «+» – до 5 мм, «++» – 5–15 мм, «+++» – более 15 мм [14].

Note. The size of the phytopathogen suppression zone: “–” absent, “+” up to 5 mm, “++” 5–15 mm, “+++” more than 15 mm [14].

Наибольшее восприятие ко всем штаммам гербаспирилл было отмечено для *F. culmorum* 58800, а наименьшее – для *F. solani* 60519. Следует отметить, что стерильные зоны вокруг лунок с культурами *Herbaspirillum* spp. при анализе *F. solani* отсутствовали. Бактериальные культуры *H. frisingense* GSF30<sup>T</sup> и *H. chlorophenolicum* CPW301<sup>T</sup> существенно не влияли на линейную скорость роста гриба, но оказывали небольшое ингибирующее действие на интенсивность его роста, что проявлялось в изменениях его морфолого-культуральных признаков по сравнению с контрольным вариантом грибной культуры без бактерий (табл. 3).

В отношении *F. sporotrichioides* 262900 была показана высокая антифунгальная активность для штаммов *H. lusitanum* P6-12<sup>T</sup> и *H. frisingense* GSF30<sup>T</sup> и чуть менее выраженная – для *H. seropedicae* Z67<sup>T</sup>, в отличие от *H. chlorophenolicum* CPW301<sup>T</sup>, который в наименьшей степени ингибировал линейный рост данной тест-культуры. Наибольшая антагонистическая активность в отношении *F. graminearum* 58889 была отмечена для *H. frisingense* GSF30<sup>T</sup>, которая убывала в ряду *H. chlorophenolicum* CPW301<sup>T</sup>, *H. lusitanum* P6-12<sup>T</sup>, *H. seropedicae* Z67<sup>T</sup>. *F. oxysporum* 60521 продемонстрировал достаточно высокую устойчивость ко всем тестируемым гербаспириллам при незначительном изменении скорости линейного роста,

**Влияние *in vitro* некоторых представителей рода *Herbaspirillum* на морфологические и культуральные характеристики *F. culmorum* 58800, *F. sporotrichioides* 262900, *F. oxysporum* 60521, *F. graminearum* 58889, *F. solani* 60519**

***In vitro* effect of some *Herbaspirillum* species on the morphological and cultural characteristics of *F. culmorum* 58800, *F. sporotrichioides* 262900, *F. oxysporum* 60521, *F. graminearum* 58889, *F. solani* 60519**

№	Цвет мицелия / Color of mycelium		Структура мицелия / Mycelium	Наличие мицелия в зоне задержки роста / The presence of mycelium in zone of inhibition
	Воздушный / Aerial mycelium	Субстратный / Substrate mycelium		
Контроль / Control				
1	белый / white	коричнево-оливковый / olive-brown	пушистый / floccose aerial	+
2	бело-желтый / white to yellow	желтый / yellow	пушистый / floccose aerial	+
3	белый / white	бежевый / cream	пушистый / floccose aerial	+
4	белый / white	темно-коричневый / dark brown	гладкий / felty	+
5	белый / white	коричневый / brown	пушистый / floccose aerial	+
<i>H. lusitanum</i> P6-12 <sup>T</sup>				
1	бело-желтый / white to yellow	желто-коричневый / yellow brown	пушистый / floccose aerial	–
2	бежевый / cream	бежевый / cream	пушистый / floccose aerial	–
3	белый / white	бежевый / cream	пушистый / floccose aerial	–
4	белый / white	темно-коричневый / dark brown	пушистый / floccose aerial//	–
5	белый / white	коричневый / brown	пушистый / floccose aerial	+
<i>H. frisingense</i> GSF30 <sup>T</sup>				
1	белый / white	коричневый / brown	пушистый / floccose aerial	–
2	белый / white	коричневый / brown	пушистый / floccose aerial	–
3	белый / white	коричневый / brown	пушистый / floccose aerial	–
4	белый / white	коричневый / brown	пушистый / floccose aerial	–
5	белый / white	бежевый / cream	пушистый / floccose aerial	+
<i>H. seropedicae</i> Z67 <sup>T</sup>				
1	белый / white	коричневый / brown	пушистый / floccose aerial	–
2	бело-бежевый / white to cream	бежевый / cream	гладкий / felty	–
3	бело-бежевый / white to cream	бежевый / cream	гладкий / felty	–
4	бело-бежевый / white to cream	коричневый / brown	пушистый / floccose aerial	–
5	белый / white	коричневый / brown	пушистый / floccose aerial	+
<i>H. chlorophenicum</i> CPW301 <sup>T</sup>				
1	бело-бежевый / white to cream	коричнево-оливковый	гладкий / felty	–
2	бежевый / cream	желто-коричневый / yellow brown	пушистый / floccose aerial	–
3	белый / white	бежевый / cream	пушистый / floccose aerial	+
4	белый / white	бежевый / cream	гладкий / felty	+
5	бело-желтый / white to yellow	коричневый / brown	гладкий / felty	+

Примечание. 1 – *F. culmorum* 58800; 2 – *F. sporotrichioides* 262900; 3 – *F. oxysporum* 60521; 4 – *F. graminearum* 58889; 5 – *F. solani* 60519. «+» – присутствует мицелий в зоне задержки роста, «–» – отсутствует мицелий в зоне задержки роста.

Note. 1 – *F. culmorum* 58800; 2 – *F. sporotrichioides* 262900; 3 – *F. oxysporum* 60521; 4 – *F. graminearum* 58889; 5 – *F. solani* 60519. «+» – mycelium is present in the growth inhibition zone, «–» – mycelium is absent in the growth inhibition zone.

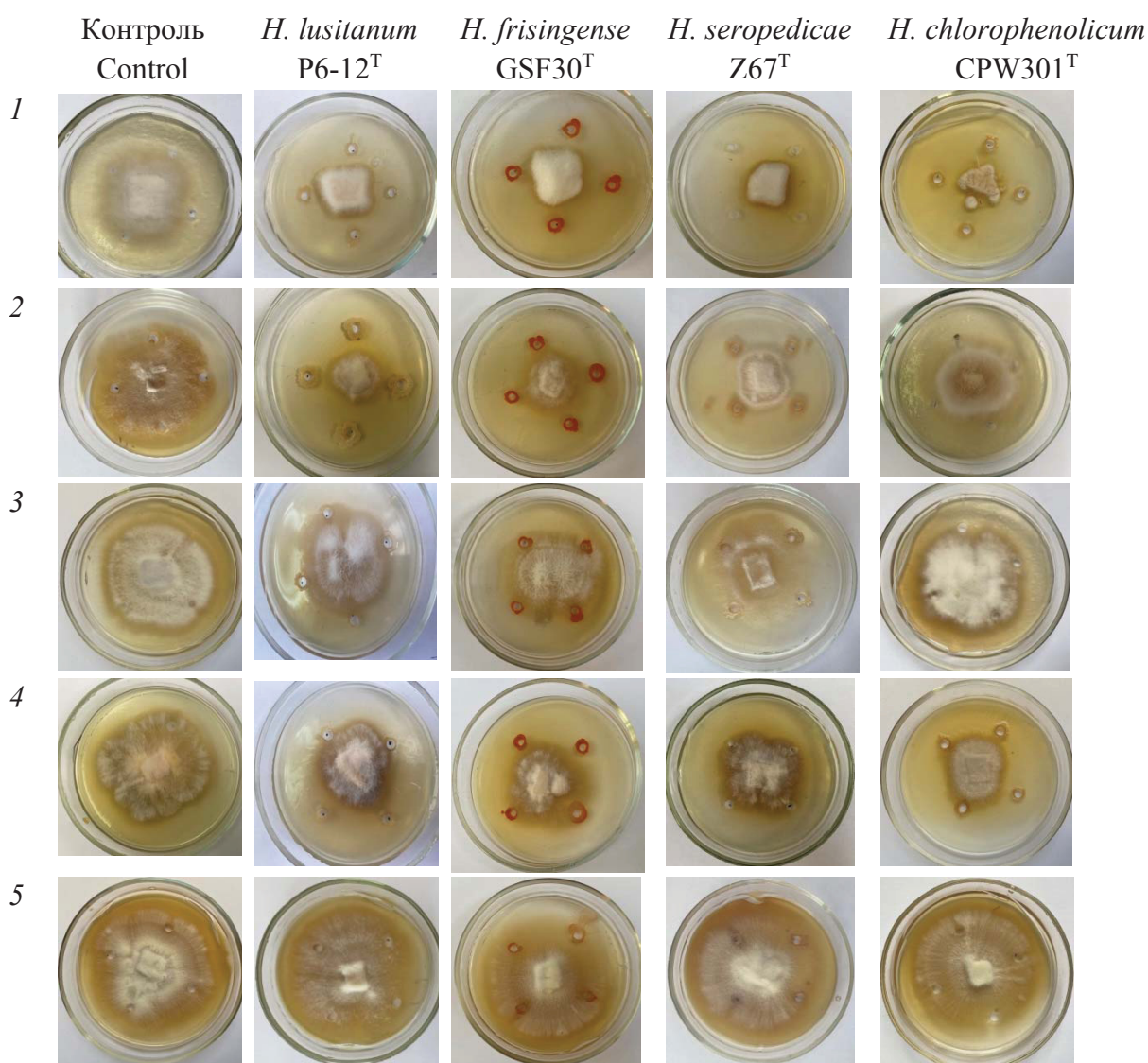


вместе с тем, наблюдалось изменение цвета субстратного мицелия в присутствии *H. frisingense* GSF30<sup>T</sup>, а также структура и цвет воздушного мицелия при воздействии метаболитов *H. seropedicae* Z67<sup>T</sup> (см. табл. 3).

Анализ представленных данных позволяет предполагать, что наблюдаемые эффекты опосредованы антифунгальной активностью исследуемых штаммов *Herbaspirillum* spp., которая в наименьшей степени связана с конкуренцией за питательные ресурсы.

Необходимо отметить, что бактерии рода *Herbaspirillum* практически полностью подавляли рост одного из наиболее вредоносных

видов грибов рода *Fusarium* – *F. culmorum* (рисунок). *H. lusitanum* P6-12<sup>T</sup>, *H. frisingense* GSF30<sup>T</sup>, *H. seropedicae* Z67<sup>T</sup>, *H. chlorophenolicum* CPW301<sup>T</sup> по механизму действия на *F. culmorum* следует отнести к штаммам, проявляющим фунгистатический антибиотический антагонизм (I тип), при котором ингибирование роста гриба происходит на расстоянии под воздействием антибиотических веществ с образованием между культурами пустой, «стерильной» зоны (см. рисунок). К этому же типу взаимодействия следует отнести *H. lusitanum* P6-12<sup>T</sup> и *F. sporotrichioides* 262900. По механизму действия на *F. sporotrichioides* 262900 штаммы *H. frisingense* GSF30<sup>T</sup>, *H. sero-*



Антагонистическая активность штаммов бактерий рода *Herbaspirillum* в отношении грибов рода *Fusarium*: 1 – *F. culmorum* 58800; 2 – *F. sporotrichioides* 262900; 3 – *F. oxysporum* 60521; 4 – *F. graminearum* 58889; 5 – *F. solani* 60519  
Figure. Mycolytic activity of some *Herbaspirillum* species against: 1 – *F. culmorum* 58800, 2 – *F. sporotrichioides* 262900, 3 – *F. oxysporum* 60521, 4 – *F. graminearum* 58889, 5 – *F. solani* 60519



*pedicae* Z67<sup>T</sup>, *H. chlorophenicum* CPW301<sup>T</sup> были отнесены к штаммам с фунгистатическим алиментарным антагонизмом (III тип), выражающимся в остановке роста гриба при контакте с колонией антагониста, а также в нарастании последнего на патоген (см. рисунок). В отношении *F. graminearum* 58889 все используемые в исследовании штаммы бактерий проявляли себя как штаммы III типа. Аналогичное взаимодействие наблюдалось при совместном культивировании *F. oxysporum* с *H. lusitanum* P6-12<sup>T</sup>, *H. frisingense* GSF30<sup>T</sup>, *H. seropedicae* Z67<sup>T</sup>, которое сопровождалось лизисом сформировавшегося мицелия (см. рисунок).

*Herbaspirillum* spp. являются потенциальными объектами агробиотехнологии для разработки на их основе биологических средств, стимулирующих рост и повышающих продуктивность растений [8, 9]. Ранее отмечено стимулирующее влияние предобработки бактериями рода *Herbaspirillum* на развитие важнейших сельскохозяйственных культур [15, 16], которое выражалось в увеличении длины и массы корней и побегов растений [17].

На основании проведенного первичного скрининга представителей разных видов р. *Herbaspirillum* на предмет антагонизма в отношении природных изолятов микроскопических грибов р. *Fusarium* методом лунок охарактеризована их биофунгицидная активность. Полученные результаты могут быть использованы в дальнейшей разработке экологически безопасных, высокопродуктивных и конкурентоспособных в адаптивном земледелии биопрепаратов, способных контролировать фузариоз важнейших сельскохозяйственных культур и активизировать защитные системы растений.

### Список литературы

1. Левитин М. М., Джавахия В. Г. Токсигенные грибы и проблемы продовольственной безопасности (обзор) // Достижения науки и техники АПК. 2020. Т. 34, № 12. С. 5–11.
2. Иванов А. В., Трёмасов М. Я., Папуниди К. Х., Чулков А. К. Микотоксикозы животных (этиология, диагностика, лечение, профилактика). М. : Колос, 2008. 112 с.
3. Häggblom P., Nordkvist E. Deoxynivalenol, zearalenone, and *Fusarium graminearum* contamination of cereal straw; field distribution; and sampling of big bales // Mycotoxin. Res. 2015. Vol. 31, № 2. P. 101–107. <https://doi.org/10.1007/s12550-015-0220-z>
4. Spolti P., Del Ponte E. M., Dong Y., Cummings J. A., Bergstrom G. C. Triazole sensitivity in a contemporary population of *Fusarium graminearum* from New York wheat and competitiveness of a tebuconazole-resistant isolate // Plant Dis. 2014. Vol. 98, № 5. P. 607–613. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-13-1051-RE>
5. Avis T. J., Gravel V., Antoun H., Tweddell R. J. Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity // Soil Biol. Biochem. 2008. Vol. 40. P. 1733–1740. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.02.013>
6. Gómez-Godínez L. J., Aguirre-Noyola J. L., Martínez-Romero E., Arteaga-Garibay R. I., Ireta-Moreno J., Ruvalcaba-Gómez J. M. A Look at plant-growth-promoting bacteria // Plants. 2023. Vol. 12, № 8. Article 1668. <https://doi.org/10.3390/plants12081668>
7. Ramos A. C., Melo J., de Souza S.B., Bertolazi A. A., Renderson A. S., Rodrigues W. P., Campostrini E., Olivares F. L., Eutrópio F. J., Cruz C., Dias T. Inoculation with the endophytic bacterium *Herbaspirillum seropedicae* promotes growth, nutrient uptake and photosynthetic efficiency in rice // Planta. 2020. Vol. 252. Article 87. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03496-x>
8. Velichko N. S., Grinev V. S., Fedonenko Y. P. Characterization of biopolymers produced by planktonic and biofilm cells of *Herbaspirillum lusitanum* P6-12 // J. Appl. Microbiol. 2020. Vol. 129, № 5. P. 1349–1363. <https://doi.org/10.1111/jam.14647>
9. Pellán L., Durand N., Martínez V., Fontana A., Schorr-Galino S., Strub C. Commercial biocontrol agents reveal contrasting compartments against two mycotoxigenic fungi in cereals: *Fusarium graminearum* and *Fusarium verticillioides* // Toxins. 2020. Vol. 12, № 3. Article 152. <https://doi.org/10.3390/toxins12030152>
10. Batista B. D., Lacava P. T., Ferrari A., Teixeira-Silva N. S., Bonatelli M. L., Tsui S., Mondin M., Kitajima E. W., Pereira J. O., Azevedo J. L., Quecine M. C. Screening of tropically derived, multi-trait plant growth-promoting rhizobacteria and evaluation of corn and soybean colonization ability // Microbiol. Res. 2018. Vol. 206. P. 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.09.007>
11. Velichko N. S., Guliy O. I., Kanevsky M. V., Kupryashina M. A., Fedonenko Yu. P. Whole-cell electric sensor for determination of sodium dodecyl sulfate // World J. Microbiol. Biotechnol. 2022. Vol. 38. Article 118. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03309-1>
12. Смолькина О. Н., Шишонкова Н. С., Юрасов Н. А., Игнатов В. В. Капсульные и экстраклеточные полисахариды diaзотрофных ризобактерий *Herbaspirillum seropedicae* Z78 // Микробиология. 2012. Т. 81, № 3. С. 345–352.
13. Практикум по микробиологии / под ред. А. И. Нетрусова. М. : Академия, 2005. 608 с.
14. Пестинская Т. В. О взаимоотношениях грибов, обитающих в почве // Бот. журн. 1958. Т. 43, № 9. С. 1270–1277.
15. Canellas L. P., Balmori D. M., Médici L. O., Aguiar, N. O., Campostrini E., Rosa R. C. C., Façanha A. R., Olivares F. L. A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.) // Plant and Soil. 2013. Vol. 366. P. 119–132.





16. Canellas L. P., da Silva S. F., Olk D. C., Olivares F. L. Foliar application of plant growth-promoting bacteria and humic acid increase maize yields // *Journal of Food, Agriculture & Environment*. 2015. Vol. 13. P. 131–138.
17. Velichko N. S., Bagavova A. R., Burygin G. L., Baymiev A. Kh., Pylaev T. E., Fedonenko Y. P. *In situ* localization and penetration route of an endophytic bacteria into roots of wheat and the common bean // *Rhizosphere*. 2022. Vol. 23. P. 100567. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2022.100567>

## References

1. Levitin M. M., Dzhavakhiya V. G. Toxigenic fungi and food security issues (review). *Achievements of Science and Technology of APK*, 2020, vol. 34, no. 12, pp. 5–11 (in Russian).
2. Ivanov A. V., Tremasov M. Ya., Papunidi K. Kh., Chulkov A. K. *Mikotoksikozy zhivotnykh (etiologiya, diagnostika, lecheniye, profilaktika)* [Animal Mycotoxicosis (Etiology, Diagnosis, Treatment, Prevention)]. Moscow, Kolos, 2008. 112 p. (in Russian).
3. Häggblom P., Nordkvist E. Deoxynivalenol, zearalenone, and Fusarium graminearum contamination of cereal straw; field distribution; and sampling of big bales. *Mycotoxin Res.*, 2015, vol. 31, no. 2, pp. 101–107. <https://doi.org/10.1007/s12550-015-0220-z>
4. Spolti P., Del Ponte E. M., Dong Y., Cummings J. A., Bergstrom G. C. Triazole sensitivity in a contemporary population of Fusarium graminearum from New York wheat and competitiveness of a tebuconazole-resistant isolate. *Plant Dis.*, 2014, vol. 98, no. 5, pp. 607–613. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-13-1051-RE>
5. Avis T. J., Gravel V., Antoun H., Tweddell R. J. Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. *Soil Biol. Biochem.*, 2008, vol. 40, pp. 1733–1740. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.02.013>
6. Gómez-Godínez L. J., Aguirre-Noyola J. L., Martínez-Romero E., Arteaga-Garibay R. I., Ireta-Moreno J., Ruvalcaba-Gómez J. M. A look at plant-growth-promoting bacteria. *Plants*, 2023, vol. 12, no. 8, article no. 1668. <https://doi.org/10.3390/plants12081668>
7. Ramos A. C., Melo J., de Souza S. B., Bertolazi A. A., Renderson A. S., Rodrigues W. P., Campostrini E., Olivares F. L., Eutrópico F. J., Cruz C., Dias T. Inoculation with the endophytic bacterium *Herbaspirillum seropedicae* promotes growth, nutrient uptake and photosynthetic efficiency in rice. *Planta*, 2020, vol. 252, article no. 87. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03496-x>
8. Velichko N. S., Grinev V. S., Fedonenko Y. P. Characterization of biopolymers produced by planktonic and biofilm cells of *Herbaspirillum lusitanum* P6-12. *J. Appl. Microbiol.*, 2020, vol. 129, no. 5, pp. 1349–1363. <https://doi.org/10.1111/jam.14647>
9. Pellán L., Durand N., Martínez V., Fontana A., Schorr-Galino S., Strub C. Commercial biocontrol agents reveal contrasting compartments against two mycotoxigenic fungi in cereals: *Fusarium graminearum* and *Fusarium verticillioides*. *Toxins*, 2020, vol. 12, no. 3, article no. 152. <https://doi.org/10.3390/toxins12030152>
10. Batista B. D., Lacava P. T., Ferrari A., Teixeira-Silva N. S., Bonatelli M. L., Tsui S., Mondin M., Kitajima E. W., Pereira J. O., Azevedo J. L., Quecine M. C. Screening of tropically derived, multi-trait plant growth-promoting rhizobacteria and evaluation of corn and soybean colonization ability. *Microbiol. Res.*, 2018, vol. 206, pp. 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.09.007>
11. Velichko N. S., Guliy O. I., Kanevsky M. V., Kupryashina M. A., Fedonenko Yu. P. Whole-cell electric sensor for determination of sodium dodecyl sulfate. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2022, vol. 38, article no. 118. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03309-1>
12. Smol'kina O. N., Shishonkova N. S., Yurasov N. A., Ignatov V. V. Capsular and extracellular polysaccharides of the diazotrophic rhizobacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z78. *Microbiology*, 2012, vol. 81, no. 3, pp. 317–323 (in Russian). <https://doi.org/10.1134/S0026261712030113>
13. *Praktikum po mikrobiologii. Pod red. A. I. Netrusova* [Netrusov A. I., ed. Workshop on Microbiology]. Moscow, Akademiya, 2005. 608 p. (in Russian).
14. Pestinskaya T. V. On the relationship of fungi living in the soil. *Botanicheskii Zhurnal*, 1958, vol. 43, no. 9, pp. 1270–1277 (in Russian).
15. Canellas L. P., Balmori D. M., Médici L. O., Aguiar N. O., Campostrini E., Rosa R. C. C., Façanha A. R., Olivares F. L. A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). *Plant and Soil*, 2013, vol. 366, pp. 119–132.
16. Canellas L. P., da Silva S. F., Olk D. C., Olivares F. L. Foliar application of plant growth-promoting bacteria and humic acid increase maize yields. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 2015, vol. 13, pp. 131–138.
17. Velichko N. S., Bagavova A. R., Burygin G. L., Baymiev A. Kh., Pylaev T. E., Fedonenko Y. P. *In situ* localization and penetration route of an endophytic bacteria into roots of wheat and the common bean. *Rhizosphere*, 2022, vol. 23, pp. 100567. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2022.100567>

Поступила в редакцию 29.05.2023; одобрена после рецензирования 16.06.2023; принята к публикации 17.06.2023  
The article was submitted 29.05.2023; approved after reviewing 16.06.2023; accepted for publication 17.06.2023



Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 3. С. 345–355  
*Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2023, vol. 23, iss. 3, pp. 345–355  
<https://ichbe.sgu.ru> <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-3-345-355>, EDN: CATNTG

Научная статья  
УДК 57.017.35-611.83:615.2

## Исследование роли нейротрофических факторов в регуляции регенерационных процессов в поврежденных соматических нервах при действии пептидного препарата «Семакс»



М. В. Парчайкина , Т. П. Кузьменко, Е. В. Чудайкина, М. Ю. Гладышева, Э. С. Ревина, В. В. Ревин

Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н. П. Огарёва, Россия, 430005, Республика Мордовия, г. Саранск, ул. Большевикская, д. 68

Парчайкина Марина Владимировна, кандидат биологических наук, доцент кафедры биотехнологии, биохимии и биоинженерии, [mary.isakina@yandex.ru](mailto:mary.isakina@yandex.ru), <https://orcid.org/0000-0002-6627-6582>

Кузьменко Татьяна Павловна, аспирант 4-го года обучения, [zyuzina-tatjana@mail.ru](mailto:zyuzina-tatjana@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0002-3497-2751>

Чудайкина Елена Викторовна, преподаватель, [lena-averkina@rambler.ru](mailto:lena-averkina@rambler.ru), <https://orcid.org/0000-0001-6141-2568>

Гладышева Мария Юрьевна, магистр, [maryayuryevnaglad@yandex.ru](mailto:maryayuryevnaglad@yandex.ru), <https://orcid.org/0000-0009-7150-0247>

Ревина Эльвира Сергеевна, кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры биотехнологии, биохимии и биоинженерии, [rewina.elvira.s@yandex.ru](mailto:rewina.elvira.s@yandex.ru), <https://orcid.org/0000-0002-2418-7012>

Ревин Виктор Васильевич, доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры биотехнологии, биохимии и биоинженерии, [revinvv2010@yandex.ru](mailto:revinvv2010@yandex.ru), <https://orcid.org/0000-0001-6542-2667>

**Аннотация.** Исследовано содержание нейротрофических факторов в поврежденных соматических нервах при действии препарата «Семакс» и установлена их роль в регуляции регенерационных процессов в травмированных нервных проводниках. Показано, что внутримышечное введение препарата сопровождается существенным увеличением уровня фактора роста нервов (NGF) и нейротрофина-3 (NT-3) как в проксимальном, так и в дистальном участках нерва. При этом достоверных изменений количественного содержания нейрорегулина-1 на фоне его использования не наблюдается. Полученные данные позволяют предположить, что одним из механизмов действия препарата «Семакс» является его способность взаимодействовать со шванновскими клетками и стимулировать выброс NGF и NT-3, стимулирующих регенерацию поврежденных аксонов и не оказывать влияния на синтез нейрорегулина-1. Кроме этого, исследование количественного содержания отдельных белковых фракций показало, что препарат «Семакс» оказывает наиболее выраженное действие на уровень нейрофиламентов-H в обоих отрезках нервного проводника, что свидетельствует о важной роли и активации сигнального пути митогенактивируемой протеинкиназы (MAPK/ERK), осуществляющего регуляцию процессов синтеза белков цитоскелета и рост аксонов. Тем не менее, было показано, что в варианте опыта с использованием «Семакса» наблюдается снижение уровня ключевого маркера аксонального роста GAP-43 (Growth-associated protein - 43), как в проксимальном, так и в дистальном отрезке нерва. Полученные данные, вероятнее всего, указывают на то, что внутримышечное введение препарата не затрагивает процессы роста аксонов, а направлено на поддержание выживаемости нейронов и ускоренное восстановление функционального состояния нервных волокон, что также подтверждается появлением потенциала действия и способности нерва к его проведению на фоне использования препарата «Семакс».

**Ключевые слова:** соматический нерв, повреждение, регенерация, нейрорегулины, нейротрофические факторы, Семакс

**Для цитирования:** Парчайкина М. В., Кузьменко Т. П., Чудайкина Е. В., Гладышева М. Ю., Ревина Э. С., Ревин В. В. Исследование роли нейротрофических факторов в регуляции регенерационных процессов в поврежденных соматических нервах при действии пептидного препарата «Семакс» // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 3. С. 345–355. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-3-345-355>, EDN: CATNTG

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0)

Article

**Study of the role of neurotrophic factors in the regulation of regeneration processes in damaged somatic nerves under the action of semax peptide preparation**

M. V. Parchaykina , T. P. Kuzmenko, E. V. Chudaikina, M. Yu. Gladysheva, E. S. Revina, V. V. Revin

Ogarev Mordovia State University, 68 Bol'shevistskaya St., 430005 Saransk, Russia

Marina V. Parchaykina, [mary.isakina@yandex.ru](mailto:mary.isakina@yandex.ru), <https://orcid.org/0000-0002-6627-6582>

© Парчайкина М. В., Кузьменко Т. П., Чудайкина Е. В.,  
Гладышева М. Ю., Ревина Э. С., Ревин В. В., 2023



Tatyana P. Kuzmenko, [zyuzina-tatjana@mail.ru](mailto:zyuzina-tatjana@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0002-3497-2751>

Elena V. Chudaikina, [lena-averkina@rambler.ru](mailto:lena-averkina@rambler.ru), <https://orcid.org/0000-0001-6141-2568>

Maria Yu. Gladysheva, [mariyayuryevnaglad@yandex.ru](mailto:mariyayuryevnaglad@yandex.ru), <https://orcid.org/0000-0009-7150-0247>

Elvira S. Revina, [rewina.elvira.s@yandex.ru](mailto:rewina.elvira.s@yandex.ru), <https://orcid.org/0000-0002-2418-7012>

Viktor V. Revin, [revinvv2010@yandex.ru](mailto:revinvv2010@yandex.ru), <https://orcid.org/0000-0001-6542-2667>

**Abstract.** The content of neurotrophic factors in damaged somatic nerves under the action of the drug «Semax» was studied and their role in the regulation of regenerative processes in injured nerve conductors was established. It has been shown that intramuscular administration of the drug is accompanied by a significant increase in the level of NGF and NT-3 both in the proximal and distal parts of the nerve. At the same time, there are no significant changes in the quantitative content of neuroregulin-1 against the background of its use. The data obtained suggest that one of the mechanisms of action of Semax is its ability to interact with Schwann cells and stimulate the release of NGF and NT-3, which facilitate the regeneration of damaged axons and do not affect the synthesis of neuroregulin-1. In addition, the study of the quantitative content of individual protein fractions showed that the drug «Semax» has the most pronounced effect on the level of neurofilament-H in both segments of the nerve conductor, which indicates the important role and activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK / ERK) signalling pathway, which regulates processes of cytoskeletal protein synthesis and axon growth. Nevertheless, it was shown that in the variant of the experiment using Semax, there was a decrease in the level of GAP-43, which is a key marker of axonal growth, both in the proximal and distal segments of the nerve. The data obtained most likely indicate that the intramuscular administration of the drug does not affect the processes of axon growth, but is aimed at maintaining the survival of neurons and accelerated restoration of the functional state of nerve fibres, which is also confirmed by the appearance of an action potential and the ability of the nerve to conduct it against the background of the use of the Semax drug.

**Keywords:** somatic nerve, damage, regeneration, neuroregulins, neurotrophic factors, Semax

**For citation:** Parchaykina M. V., Kuzmenko T. P., Chudaikina E. V., Gladysheva M. Yu., Revina E. S., Revin V. V. Study of the role of neurotrophic factors in the regulation of regeneration processes in damaged somatic nerves under the action of semax peptide preparation. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2023, vol. 23, iss. 3, pp. 345–355 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-3-345-355>, EDN: CATNTG

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC-BY 4.0)

## Введение

В настоящее время все большее внимание исследователей уделяется роли нейротрофических факторов, в частности, фактора роста нервов (NGF), нейротрофинов и нейрорегулинов (NRGs) в регуляции нормального функционирования центральной и периферической нервной системы. Нейротрофин-3 (NT-3) обладает способностью усиливать синаптическую активность в развивающемся нервно-мышечном синапсе, что реализуется за счет активации тирозинкиназы пресинаптической мембраны [1]. Также известно, что нейрорегулин-1 (NRG-1) является ключевым фактором, необходимым для миграции, выживания, пролиферации и дифференцировки шванновских клеток, а также представляет собой важный модулятор нервной возбудимости и синаптической пластичности в мозге взрослого человека [2]. Согласно литературным данным, нейротрофические факторы обеспечивают нейрональную дифференцировку и выживаемость нейронов за счет взаимодействия со своими рецепторами, которые относятся к семейству тирозинкиназных рецепторов (Trk), и распространяют сигнал с участием фосфатидилинозитол-3-киназного (PIK3/Akt) и митогенактивируемого протеинкиназного (MAPK/ERK) сигнальных каскадов. При этом для каждого из нейротрофинов существует свой

специфический высокоафинный рецептор: NGF связывается с TrkA, NT-3 – преимущественно с TrkC, а нейрорегулин-1 – с ErbB, после чего запускается каскад внутриклеточных реакций [3, 4].

Проблема регенерации нервной ткани остается одной из самых актуальных и малоизученных в биологии и медицине, что обусловлено наличием большого количества нейродегенеративных заболеваний и отсутствием эффективных способов их лечения. Существующие в настоящее время подходы к терапии поврежденных нервов не способны поддерживать в течение необходимого времени выживание нервных клеток и рост нейритов – ключевых факторов регенерации нервов. Принимая во внимание значимость данной проблемы, в последние годы наметился определенный прогресс в изучении нейропротекторного действия различных биологически активных веществ и их роли в регуляции сигнальных путей, участвующих в активации процессов восстановления функционирования травмированных нервных проводников [5, 6].

По данным ряда авторов, среди различных классов физиологически активных веществ особый интерес представляют пептиды, оказывающие регулирующее и нейромодулирующее действие на многие физиологические процессы в организме [7]. В связи с этим создание лекарственных средств на основе регуляторных



пептидов, участвующих в поддержании многих физиологических функций и практически полностью лишенных побочных эффектов, в настоящее время наиболее актуально. Одними из обширных групп регуляторных пептидов являются препараты с нейротропной активностью, в частности «Семакс», представляющий собой синтетический аналог фрагмента аденокортикотропного гормона (АКТГ<sub>4-7</sub>), не имеющий побочных гормональных эффектов и обладающий высокой устойчивостью к действию инактивирующих ферментов за счет присоединения аминокислотной последовательности Pro-Gly-Pro [8]. Препарат «Семакс» относится к классу регуляторных пептидов, представляет собой гептапептид Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro и распадается на короткие фрагменты, что определяет его биологическую активность. Известно, что к основным проявлениям его нейропротекторного действия относится иммуномодуляция, торможение воспалительных реакций и синтез оксида азота [9].

Тем не менее, несмотря на имеющиеся данные о способности препарата «Семакс» стимулировать регенерационные процессы в поврежденной нервной ткани, молекулярные и клеточные механизмы активации процессов регенерации травмированных соматических нервов, а также роль рецепторных сигнальных путей, отвечающих за выживание и восстановление физиологических функций нервного проводника на фоне его использования остаются неизученными.

Исходя из вышесказанного, целью данной работы было изучение роли нейротрофических факторов в регуляции регенерационных процессов в поврежденных соматических нервах при действии пептидного препарата «Семакс». Для достижения цели работы были поставлены следующие задачи:

- исследовать изменение содержания NGF, NT-3 и NRG-1 при дегенеративных и регенеративных процессах в соматических нервах на фоне внутримышечного введения препарата «Семакс»;
- изучить влияние препарата на изменение количественного содержания общего белка и отдельных белковых фракций поврежденных соматических нервов, а также выяснить роль исследуемых нейротрофических факторов в восстановлении функционирования травмированных нервных проводников на фоне использования синтетического аналога АКТГ<sub>4-7</sub>.

#### Материалы и методы

Объектом исследования служили седалищные нервы крыс линии *Wistar* со средней

массой  $250 \pm 50$  г. У животных одной опытной группы осуществляли перерезку седалищного нерва на уровне середины бедра. Животным второй группы после перерезки ежедневно внутримышечно вводили препарат «Семакс» в концентрации 37,5 мг/кг. Проксимальный и дистальный концы нервов извлекали через 7, 14 и 30 суток и помещали в раствор Рингера. Контролем служили интактные животные. Биоэлектрическую активность регистрировали для изолированного нерва при его внеклеточном отведении со следующими параметрами стимуляции: амплитуда 1,5 В, длительность 0,3 мс, частота раздражения 100 имп/с [10]. Количественное определение факторов роста NGF, NT-3 и NRG-1 проводили методом иммуноферментного анализа с использованием специальных коммерческих наборов (Cloud-Clone Corp, Китай; Puda Scientific, Китай). Состав белков соматических нервов изучали методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) по методу Laemmli [11]. Визуализацию, документацию и количественный анализ полученных белковых гелей осуществляли с помощью геледокументирующей системы Gel Doc XR+ (Bio-Rad, США). Обработку результатов проводили в программе ImageLab. Статистическую обработку проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента.

#### Результаты и их обсуждение

В литературе имеются сведения о способности пептидного препарата «Семакс» стимулировать регенерацию нейронов и нервных отростков после их механических или химических повреждений [9]. Тем не менее, механизм действия этого препарата на регенерацию периферических нервов до сих пор остается неизученным. В связи с этим на первом этапе эксперимента было изучено изменение содержания NGF в проксимальном и дистальном участках нерва после перерезки, а также внутримышечного введения препарата «Семакс» в концентрации 37,5 мг/кг. В ходе проведенных исследований было показано, что при повреждении нерва наиболее выраженное изменение уровня NGF наблюдается на 7-е сутки, как в проксимальном, так и в дистальном отрезках нервного проводника, что сопровождается его снижением на 31,7 и 24,4% соответственно по сравнению с контролем. К 30-м суткам наблюдения содержание NGF становится равным контрольному значению в проксимальном отрезке нерва и превышает его уровень на 11,8% в дистальном участке нервного проводника (рис. 1).

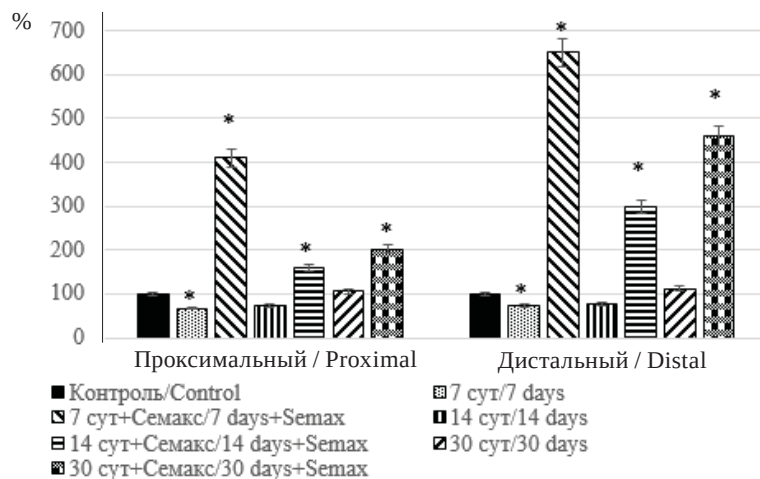


Рис. 1. Изменение общего уровня NGF в поврежденных соматических нервах при действии препарата «Семакс» (\* – достоверность отличия по отношению к интактной группе,  $p < 0.05$ )

Fig. 1. Change in the total level of NGF in damaged somatic nerves under the action of the drug «Semax» (\* – the significance of the difference in relation to the intact group,  $p < 0.05$ )

В серии опытов с использованием препарата к 7-м суткам эксперимента содержание NGF возрастает в проксимальном и дистальном участках нерва в 4,0 и 6,5 раз соответственно по отношению к контролю. С увеличением послеоперационных сроков до 30 суток уровень фактора роста нервов все еще превышает контроль в 2,0 и 4,6 раза в проксимальном и дистальном участках нерва соответственно.

Помимо изменения уровня NGF, в проксимальном и дистальном отделах нерва после его перерезки происходит увеличение концентрации NT-3 на 30,7 и 50,0% соответственно к 7-м суткам наблюдения. Увеличение продолжительности воздействия травмы до 30 суток приводит к снижению уровня NT-3, тем не менее его содержание все еще превышает контрольное значение в обеих частях исследуемого нервного проводника.

Использование препарата «Семакс» сопровождается уменьшением уровня NT-3 на 18,4% по отношению к контролю спустя 7 суток наблюдения и его увеличением на 54,6% к 30-м суткам эксперимента в варианте опыта в проксимальном отрезке нерва. При внутримышечном использовании «Семакса» в дистальном отделе нервного проводника происходят следующие изменения: спустя 7, 14 и 30 суток после повреждения уровень нейротрофина-3 повышается в среднем в 3,0; 2,6 и 1,6 раза соответственно по отношению к контролю (рис. 2).

Нейрорегулины представляют собой семейство нейротрофических факторов, воз-

действующих на тирозинкиназы ErbB (ErbB2, ErbB3 и ErbB4) и опосредующих нейронную дифференцировку, миелинизацию и формирование синапсов, благодаря чему сигнальный путь, связанный с их активацией, контролирует ключевые физиологические нейронные функции, необходимые для успешного протекания регенерационных процессов [12].

В связи с вышеизложенным следующим этапом эксперимента было определение содержания нейрорегулина-1 в интактных и поврежденных нервах при воздействии препарата «Семакс». В варианте опыта с повреждением в проксимальном участке нерва на 7-, 14- и 30-е сутки отмечается значительное увеличение концентрации NRG-1 на 85,6, 75,6 и 38,3% соответственно по сравнению с контрольными значениями. Следует отметить, что данная тенденция прослеживается и в дистальном отделе нервного проводника (рис. 3).

В серии опытов с использованием препарата в проксимальном участке нерва на 7-е и 14-е сутки наблюдения достоверных изменений количественного содержания нейрорегулина-1 по сравнению с перерезкой не наблюдается. На 30-е сутки после травмы содержание NRG-1 незначительно превышает контрольные значения. В дистальном отделе при введении препарата «Семакс» на 7-е, 14-е и 30-е сутки после повреждения количество NRG-1 по-прежнему превышает уровень контрольных значений на 41,6, 40,9 и 51% соответственно.

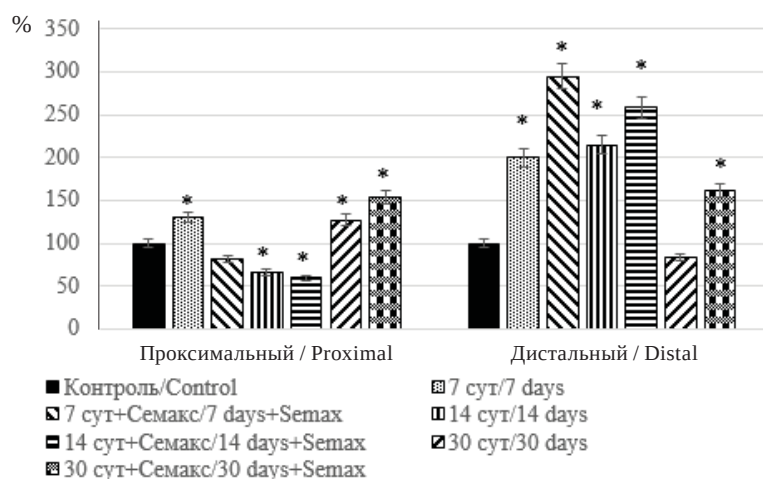


Рис. 2. Влияние препарата «Семакс» на изменение концентрации NT-3 в поврежденных соматических нервах (\* – достоверность отличия по отношению к интактной группе,  $p < 0.05$ )

Fig. 2. The effect of Semax on the change in the concentration of NT-3 in damaged somatic nerves (\* – the significance of the difference in relation to the intact group,  $p < 0.05$ )

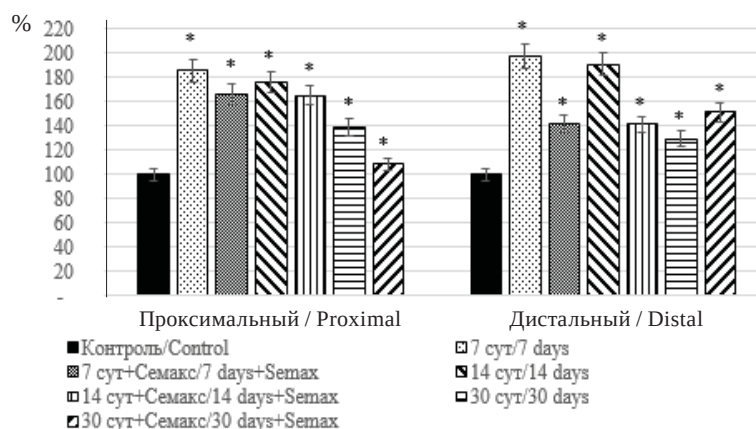


Рис. 3. Влияние препарата «Семакс» на изменение концентрации нейрорегулина-1 в поврежденных соматических нервах (\* – достоверность отличия по отношению к контролю,  $p < 0.05$ )

Fig. 3. The effect of Semax on the change in the concentration of neuroregulin-1 in damaged somatic nerves (\* – the significance of the difference in relation to the control,  $p < 0.05$ )

Принимая во внимание литературные данные, активация Akt в результате запуска фосфатидилинозитол-3-киназного сигнального пути под действием нейротрофических факторов сопровождается антиапоптотическим эффектом за счет экспрессии генов, участвующих в дифференцировке и выживаемости клеток. В частности, активация Akt по Thr308 приводит к повышению экспрессии транскрипционных факторов и рапамицинового комплекса млекопитающих (mTORC1) и p70S6K, которые усиливают синтез белка. Фосфорилирование

Akt по Ser473 mTORC2 способствует запуску антиапоптотических путей выживания клеток [13, 14]. С другой стороны, показано, что ERK1/2, один из участников MAP-киназного сигнального пути, также связан с активацией ветвления и аксонального роста нервных волокон за счет экспрессии антиапоптотических факторов транскрипции [15].

В соответствии с вышесказанным активация фосфатидилинозитол-3-киназного сигнального пути под действием нейротрофических факторов сопровождается интенсификацией



фикацией белкового синтеза. Исходя из этого, на следующем этапе эксперимента нами было исследовано изменение содержания отдельных белковых фракций, а также ключевого маркера аксонального роста белка GAP-43 при повреждении и внутримышечном введении препарата «Семакс».

С помощью метода электрофореза на ПААГ был изучен качественный состав белковой фракции исследуемых интактных и поврежденных нервов. В интактном нерве были выявлены белки нейрофиламентов-Н (NF-Н, 190-200 кДа), нейрофиламентов-М (NF-М, 140 - 160 кДа), тубулина (110 кДа), GAP-43 (27 кДа) (рис. 4).

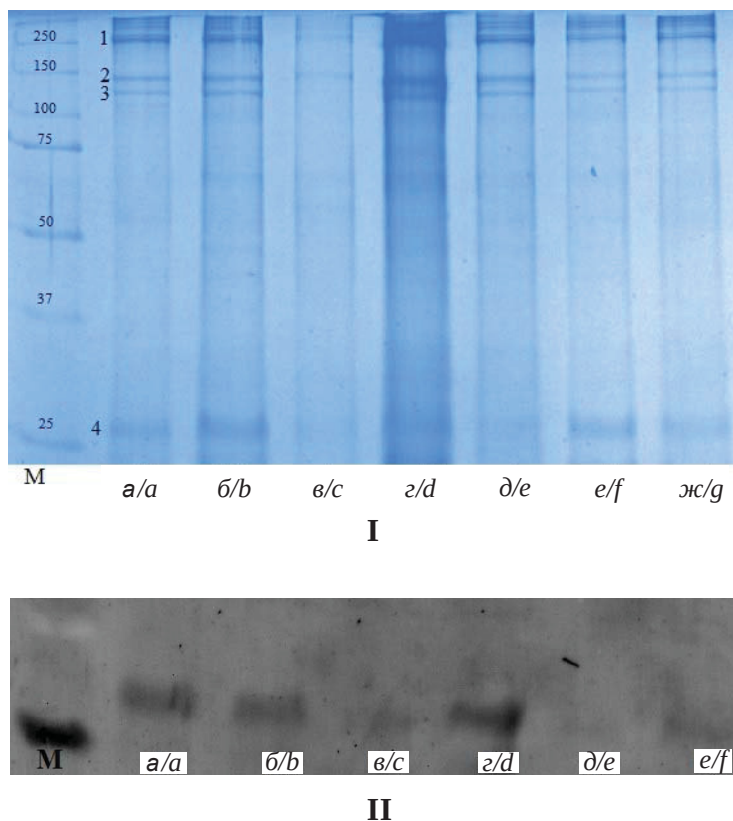


Рис. 4. Электрофореграмма белков (I) и вестерн-блотт анализ уровня GAP-43 (II) поврежденных соматических нервов, выделенных через 7, 14 и 30 суток после перерезки: М – маркер; а – контроль; б – проксимальный участок, 7-е сутки; в – дистальный участок, 7-е сутки; г – проксимальный участок, 14 суток; д – дистальный участок, 14 суток; е – проксимальный участок, 30 суток; ж – дистальный участок, 30 суток. 1 – нейрофиламенты-Н, 2 – нейрофиламенты-М; 3 – тубулин; 4 – GAP-43

Fig. 4. Electropherogram of proteins (I) and Western blot analysis of the level of GAP-43 (II) of damaged somatic nerves isolated 7, 14 and 30 days after transection: M – marker; a – control; b – proximal area, day 7; c – distal site, 7 days; d – proximal area, 14 days; e – distal site, 14 days; f – proximal area, 30 days; g – distal site, 30 days. 1 – neurofilaments-N, 2 – neurofilaments-M, 3 – tubulin; 4 – GAP-43

Было показано, что в проксимальном отрезке нерва содержание нейрофиламентов-Н, нейрофиламентов-М и тубулина после травмы снижается в среднем на 22% к 7-м суткам наблюдения. С увеличением послеоперационных сроков до 30 суток концентрация исследуемых белковых фракций превышает контрольные

значения, при этом максимальное увеличение наблюдается во фракции тубулина и превышает контроль на 34,8%.

В дистальном его отрезке спустя 7 суток после повреждения количественное содержание фракций NF-Н, NF-М и тубулина уменьшается более чем в 2 раза относительно



контроля. Было показано, что содержание нейрофиламента-Н, нейрофиламента-М и тубулина на 30-е сутки возрастает относительно контроля на 39,7, 26 и 14,5% соответственно (рис. 5).

Также было проведено качественное исследование белкового состава поврежденного нерва с ежедневным введением препарата «Семакс» в концентрации 37,5 мг/кг на протяжении 7, 14 и 30 суток (рис. 6).

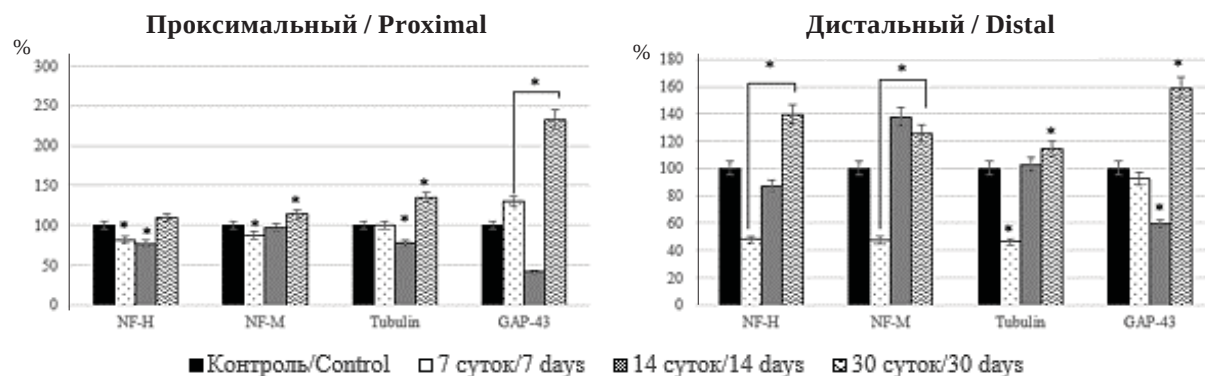


Рис. 5. Изменение содержания отдельных белковых фракций в поврежденных соматических нервах (\* –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем)

Fig. 5. Changes in the content of individual protein fractions in damaged somatic nerves (\* –  $p < 0.05$  compared to control)

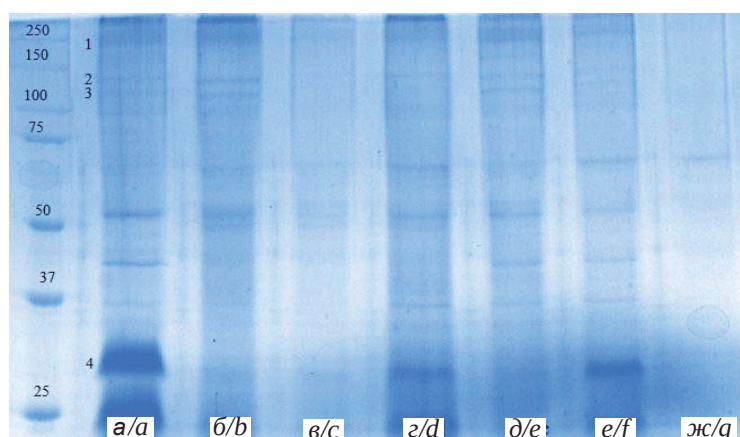


Рис. 6. Электрофореграмма белкового состава поврежденного нерва с введением препарата «Семакс» в концентрации 37,5 мг/кг: а – контроль; б – проксимальный участок, 7 суток; в – дистальный участок, 7 суток; г – проксимальный участок, 14 суток; д – дистальный участок, 14 суток; е – проксимальный участок, 30 суток; ж – дистальный участок, 30 суток. 1 – нейрофиламенты-Н, 2 – нейрофиламенты-М, 3 – тубулин; 4 – GAP-43

Fig. 6. The electrophoregram of the protein composition of the damaged nerve with the introduction of the drug «Semax» at a concentration of 37.5 mg/kg: a – control; b – proximal area, 7 days; c – distal site, 7 days; d – proximal area, 14 days; e – distal site, 14 days; f – proximal area, 30 days; g – distal site, 30 days. 1 – neurofilaments-N, 2 – neurofilaments-M, 3 – tubulin; 4 – GAP-43

Так, на 7-е сутки эксперимента в проксимальном отделе нерва содержание NF-M и тубулина снижается на 30,1 и 54,9% относительно контрольных значений. С увеличением послеоперационных сроков до 30 суток количество NF-M и тубулина уменьшается и становится ниже уровня контроля на 66,7 и 85% соответственно.

Количественное содержание белковой фракции с NF-H в варианте опыта с использованием препарата на 7-е, 14-е и 30-е сутки эксперимента увеличивается на 39,3, 40,1 и 21,1% соответственно.

В дистальном отделе поврежденного нерва содержание белков NF-H, NF-M и тубулина на





7-е сутки после травмы и внутримышечного введения препарата снижается на 22,2, 27,4 и 19,6% соответственно по сравнению с контролем. На 30-е сутки эксперимента содержание

NF-H уменьшается на 42,2% по отношению к контролю, а концентрация нейрофиламента-M и тубулина обнаруживается в следовых количествах (рис. 7).

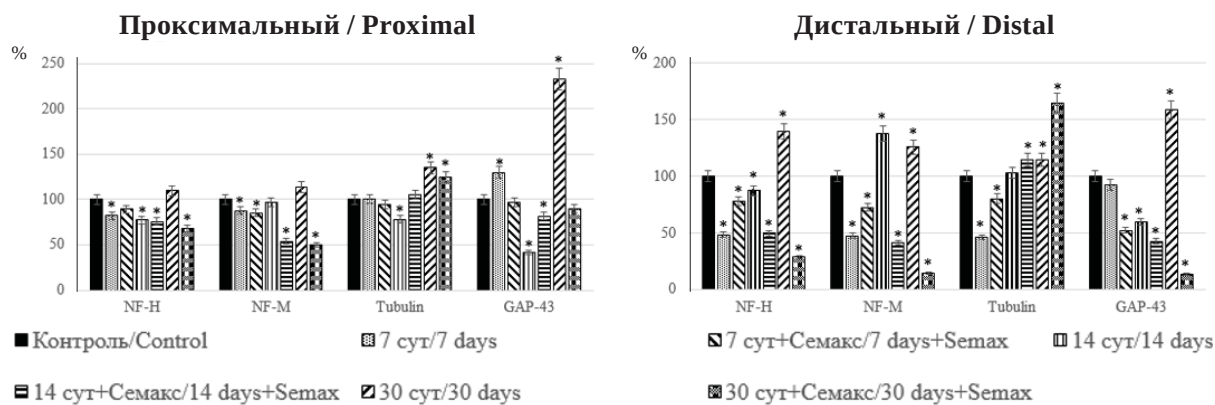


Рис. 7. Содержание белковых фракций в поврежденных нервах при действии препарата «Семакс» в концентрации 37,5 мг/кг (\* –  $p < 0,05$  по отношению к контролю)

Fig. 7. The content of protein fractions in damaged nerves under the action of the drug «Semax» at a concentration of 37.5 mg/kg (\* –  $p < 0.05$  in relation to control)

В последние годы появились данные о том, что фрагменты АКТГ<sub>1-27</sub> и АКТГ<sub>1-14</sub> способны взаимодействовать с клеточной мембраной и активировать сигнальный белок конуса роста – GAP-43. Считается, что GAP-43 связывает кальмодулин в неактивной форме и тем самым влияет на многие Ca<sup>2+</sup>-зависимые процессы в нервной терминали [16].

Согласно результатам проведенных исследований, уровень GAP-43 возрастает как на 7-е, так и на 30-е сутки эксперимента в 1,3 раза и в 2,3 раза соответственно по сравнению с неповрежденным нервом. В дистальном отрезке нерва содержание GAP-43 снижается к 14-м суткам наблюдения на 40,4% относительно контроля, однако с увеличением времени повреждающего воздействия до 30 суток отмечается увеличение данного показателя в 1,6 раза по сравнению с контрольным значением. В варианте опыта с использованием препарата «Семакс» в проксимальном участке нерва уровень GAP-43 на 7-е и 30-е сутки эксперимента снижается по сравнению с контрольными значениями на 34 и 49,2% соответственно. В дистальной его части на 7-е сутки внутримышечного введения препарата значительно уменьшается количественное содержание GAP-43 – на 47,5%, а к 30-м суткам – на 71,7% относительно контроля.

Известно, что способность нервных волокон проводить потенциал действия является

важнейшей характеристикой, отражающей эффективность протекания регенерационных процессов при травме соматических нервов. Исходя из этого, в следующей серии экспериментов нами была проведена регистрация электрической активности соматических нервов при повреждении и действии препарата «Семакс».

Из литературы известно, что скорость проведения возбуждения по нервным волокнам зависит, в первую очередь, от степени миелинизации и диаметра аксонов, а также определяется межперехватными расстояниями и характером распределения ионных каналов на поверхности аксона [17]. Эксперимент показал, что в результате полученной травмы проводимость нерва заметно снижается в проксимальном его участке и полностью утрачивается в дистальном отрезке нервного проводника (рис. 8).

С увеличением времени эксперимента восстановление способности проведения потенциала действия с небольшой амплитудой отмечается только в проксимальном отрезке нерва, что по-видимому объясняется сохранением центральной иннервации и частичным восстановлением нервно-мышечной передачи. В варианте опыта с повреждением амплитуда потенциала действия снижается в среднем на 50% по сравнению с контролем на протяжении всего периода наблюдения, в то время как внутримышечное введение препарата «Семакс» со-

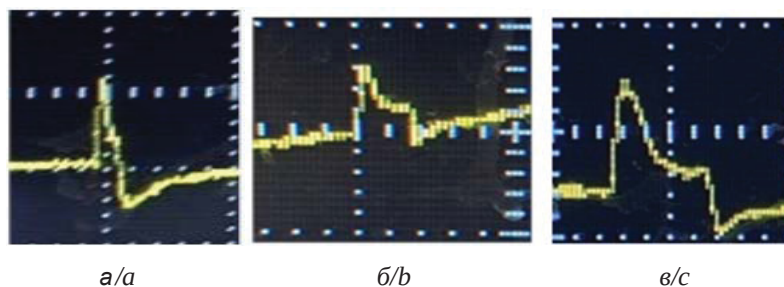


Рис. 8. Потенциал действия соматического нерва крысы. Масштаб по шкале потенциала: 100 мВ на клетку; масштаб по времени: а – 0,5 мс, б – 0,25 мс, в – 0,1 мс на клетку: интактный нерв (а); 24-е сутки после повреждения (б) и при в/м введении семакса в концентрации 37,5 мг/кг (в)

Fig. 8. Action potential of the rat somatic nerve. Potential scale: 100 mV per cell; time scale: a – 0.5 ms, b – 0.25 ms, c – 0.1 ms per cell: intact nerve (a); 24 days after injury (b) and with intramuscular injection of Semax at a concentration of 37.5 mg/kg (c)

проводится восстановлением проводимости в проксимальном отрезке нерва практически до контрольных значений к концу эксперимента.

Таким образом, полученные нами данные по исследованию влияния «Семакса» на содержание нейротрофических факторов и отдельных белковых фракций в проксимальном и дистальном отрезках травмированного нервного проводника коррелируют с восстановлением функциональной активности поврежденных соматических нервов.

### Заключение

В настоящее время ведется интенсивный поиск биологически активных соединений, способных стимулировать регенерацию аксонов и нейронов после аксотомии. Одним из перспективных нейротрофических агентов является препарат «Семакс», представляющий собой синтетический аналог фрагмента АКТГ<sub>4-10</sub>. Однако характер его действия на регенерацию периферических аксонов до сих пор не исследован.

Исходя из полученных данных, увеличение содержания нейротрофических факторов в поврежденном нервном проводнике до 14 суток наблюдения свидетельствует об активации регенерационных процессов на фоне травмы. Использование препарата «Семакс» сопровождается еще более выраженным возрастанием уровня NGF и NT-3 в обоих участках нерва на всем протяжении эксперимента. Следует отметить, что на фоне использования препарата достоверных изменений количественного содержания нейрорегулина-1 как в проксимальном, так и в дистальном отрезках нерва не наблю-

дается. Полученные данные позволяют предположить, что одним из механизмов действия препарата «Семакс» является его способность взаимодействовать со шванновскими клетками и стимулировать выброс таких нейротрофических факторов, как NGF и NT-3, облегчающих регенерацию поврежденных аксонов и не оказывающих влияния на синтез нейрорегулина-1. В пользу этого предположения свидетельствуют литературные данные о наличии рецепторов к фрагменту АКТГ<sub>4-10</sub> в центральной и периферической нервной системе [9]. В частности, в одной из работ было показано, что синтетический аналог АКТГ<sub>4-10</sub> приводит к стимуляции выработки молекул-рецепторов к NGF, стимулирующих регенерацию травмированных аксонов [18]. Таким образом, увеличение содержания NGF и NT-3 на фоне использования препарата «Семакс» приводит к запуску фосфатидилинозитол-3-киназного сигнального пути, что подтверждается полученными нами данными об активации белкового синтеза в поврежденных соматических нервах. Проведенный анализ количественного содержания отдельных белковых фракций показал, что препарат «Семакс» оказывает наиболее выраженное действие на содержание NF-H в обоих отрезках нервного проводника. Следует отметить, что в дистальном его участке наблюдается еще более существенная интенсификация синтеза NF-H при действии препарата. Полученные данные согласуются с данными литературы, свидетельствующими о важной роли и активации сигнального пути митогенактивируемой протеинкиназы (MAPK/ERK), осуществляющего регуляцию процессов



синтеза белков цитоскелета и рост аксонов [14, 15]. Тем не менее, было показано, что в варианте опыта с использованием «Семакса» наблюдается снижение уровня GAP-43, являющегося ключевым маркером аксонального роста, как в проксимальном, так и в дистальном отрезке нерва. Полученные данные, вероятнее всего, указывают на то, что «Семакс», в первую очередь, способствует не ускоренному росту, а выживанию поврежденных нейронов и восстановлению функционального состояния нервных волокон.

Таким образом, на основании совокупности полученных нами данных можно предположить наличие у пептидного препарата «Семакс» стимулирующего действия на посттравматическую регенерацию нервных проводников за счет взаимодействия с рецепторами шванновских клеток и повышением содержания таких нейротрофических факторов, как NGF и NT-3, запускающих внутриклеточные сигнальные каскады, связанные с усилением белкового синтеза и восстановлением функциональной проводимости поврежденных нервных волокон. Тем не менее, отсутствие положительного действия препарата на увеличение содержания GAP-43 в травмированных соматических нервах позволяет предположить, что внутримышечное введение «Семакса», вероятнее всего, не затрагивает процессы роста аксонов, а направлено на поддержание выживаемости нейронов и ускоренное восстановление их структурно-функционального состояния.

### Список литературы

1. *Hernández-Echeagaray E.* Chapter Four – Neurotrophin-3 modulates synaptic transmission // *Vitamins and Hormones*. 2020. Vol. 114. P. 71–89. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2020.04.008>
2. *Cespedes J.C., Liu M., Harbuzariu A., Nti A., Onyekaba J., Cespedes H. W., Bharti P. K., Solomon W., Anyaoha P., Krishna S., Adjei A., Botchway F., Ford B., Stiles J. K.* Neuregulin in health and disease // *Inter. J. Brain Disord. Treat.* 2018. Vol. 4, iss. 1. P. 024. <https://doi.org/10.23937/2469-5866/1410024>
3. *Sánchez-Alegría K., Flores-León M., Avila-Muñoz E., Rodríguez-Corona N., Arias C.* PI3K Signaling in neurons: A central node for the control of multiple functions // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. Vol. 19. P. 3725.
4. *Zhang X., He X., Li Q., Kong X., Ou Z., Zhang L., Gong Z., Long D., Li J., Zhang M., Ji W., Zhang W., Xu L., Xuan A.* PI3K/AKT/mTOR signaling mediates valproic acid-induced neuronal differentiation of neural stem cells through epigenetic modifications // *Stem Cell Reports*. 2017. Vol. 8, Iss. 5. P. 1256–1269. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.04.006>
5. *Pinyaev S. I., Kuzmenko T. P., Revina N. V., Parchaykina M. V., Pronin A. S., Syusin I. V., Novozhilova O. S., Revin V. V., Chudaikina E. V., Revina E. S.* Influence of resveratrol on oxidation processes and lipid phase characteristics in damaged somatic nerves // *Biomed. Res. Int.* 2019. Vol. 2019. P. 2381907. <https://doi.org/10.1155/2019/2381907>
6. *Bota O., Fodor L.* The influence of drugs on peripheral nerve regeneration // *Drug Metabolism Reviews*. 2019. Vol. 51, iss. 3. P. 266–292. <https://doi.org/10.1080/03602532.2019.1632885>
7. *Королева С. В., Мясоедов Н. Ф.* Семакс – универсальный препарат для терапии и исследований // *Известия Российской академии наук. Серия биологическая*. 2018. № 6. С. 669–682.
8. *Akimov M. G., Fomina-Ageeva E. V., Dudina P. V., Andreeva L. A., Myasoedov N. F., Bezuglov V. V.* ACTH(6-9)PGP peptide protects SH-SY5Y cells from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tert-Butyl hydroperoxide, and cyanide cytotoxicity via stimulation of proliferation and induction of prosurvival-related genes // *Molecules*. 2021. Vol. 26, iss. 7. P. 1878. <https://doi.org/10.3390/molecules26071878>
9. *Bakaeva Z. V., Surin A. M., Lizunova N. V., Zgodova A. E., Krasilnikova I. A., Fisenko A. P., Frolov D. A., Andreeva L. A., Myasoedov N. F., Pinelis V. G.* Neuroprotective potential of peptides HFRWPGP (ACTH6-9PGP), KKRRP, and PyrRP in cultured cortical neurons at glutamate excitotoxicity // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2020. Vol. 491, iss. 1. P. 62–66. <https://doi.org/10.1134/S1607672920020040>
10. *Кузьменко Т. П., Парчайкина М. В., Ревина Э. С., Гладышева М. Ю., Ревин В. В.* Влияние нейротрофических факторов на состав белков при повреждении и регенерации соматических нервов // *Биофизика*. 2023. Т. 68, № 2. С. 334–348. <https://doi.org/10.31857/S0006302923020138>
11. *Laemmli U.K.* Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 // *Nature*. 1970. Vol. 227. P. 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
12. *Newbern J., Birchmeier C.* Nrg1/ErbB signaling networks in Schwann cell development and myelination // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2010. Vol. 21. P. 922–928. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2010.08.008>
13. *Querfurth H., Lee H. K.* Mammalian/mechanistic target of rapamycin (mTOR) complexes in neurodegeneration // *Mol. Neurodegener.* 2021. Vol. 16, iss. 1. P. 44. <https://doi.org/10.1186/s13024-021-00428-5>
14. *Huang H., Liu H., Yan R., Hu M.* PI3K/Akt and ERK/MAPK signaling promote different aspects of neuron survival and axonal regrowth following rat facial nerve axotomy // *Neurochem. Res.* 2017. Vol. 42, iss. 12. P. 3515–3524. <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2399-1>
15. *Hutton S. R., Otis J. M., Kim E. M., Lamsal Y., Stuber G. D., Snider W. D.* ERK/MAPK signaling is required for pathway-specific striatal motor functions // *J. Neurosci.* 2017. Vol. 37, iss. 34. P. 8102–8115. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0473-17.2017>
16. *Wang C. Y., Lin H. C., Song Y. P., Hsu Y.T., Lin S. Y., Hsu P. C., Lin C. H., Hung C. C., Hsu M. C., Kuo Y. M., Lee Y. J., Hsu C. Y., Lee Y. H.* Protein kinase C-dependent

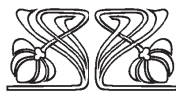
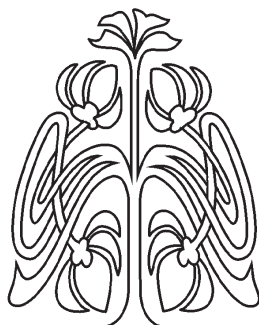


- growth-associated protein 43 phosphorylation regulates gephyrin aggregation at developing GABAergic synapses // *Mol. Cell Biol.* 2015. Vol. 35, iss. 10. P. 1712–1726. <https://doi.org/10.1128/MCB.01332-14>
17. Fyffe-Maricich S. L., Schott A., Karl M., Krasno J., Miller R. H. Signaling through ERK1/2 controls myelin thickness during myelin repair in the adult central nervous system // *J. Neurosci.* 2013. Vol. 33, iss. 47. P. 18402–18408. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2381-13.2013>
  18. Пожилова Е. В., Новиков В. Е. Фармакодинамика и клиническое применение нейропептида АКТГ<sub>4-10</sub> // *Вестник Смоленской государственной медицинской академии.* 2020. Т. 19, № 3. С. 76–86. <https://doi.org/10.37903/vsgma.2020.3.10>
- ### References
1. Hernández-Echeagaray E. Chapter Four – Neurotrophin-3 modulates synaptic transmission. *Vitamins and Hormones*, 2020, vol. 114, pp. 71–89. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2020.04.008>
  2. Cespedes J. C., Liu M., Harbuzariu A., Nti A., Onyekaba J., Cespedes H. W., Bharti P. K., Solomon W., Anyaoha P., Krishna S., Adjei A., Botchway F., Ford B., Stiles J. K. Neuregulin in health and disease. *Inter. J. Brain Disord. Treat.*, 2018, vol. 4, iss. 1, pp. 024. <https://doi.org/10.23937/2469-5866/1410024>
  3. Sánchez-Alegría K., Flores-León M., Avila-Muñoz E., Rodríguez-Corona N., Arias C. PI3K signaling in neurons: A central node for the control of multiple functions. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, vol. 19, pp. 3725.
  4. Zhang X., He X., Li Q., Kong X., Ou Z., Zhang L., Gong Z., Long D., Li J., Zhang M., Ji W., Zhang W., Xu L., Xuan A. PI3K/AKT/mTOR signaling mediates valproic acid-induced neuronal differentiation of neural stem cells through epigenetic modifications. *Stem Cell Reports*, 2017, vol. 8, iss. 5, pp. 1256–1269. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.04.006>
  5. Pinyaev S. I., Kuzmenko T. P., Revina N. V., Parchaykina M. V., Pronin A. S., Syusin I. V., Novozhilova O. S., Revin V. V., Chudaikina E. V., Revina E. S. Influence of resveratrol on oxidation processes and lipid phase characteristics in damaged somatic nerves. *Biomed Res Int.*, 2019, vol. 2019, pp. 2381907. <https://doi.org/10.1155/2019/2381907>
  6. Bota O., Fodor L. The influence of drugs on peripheral nerve regeneration. *Drug Metabolism Reviews*, 2019, vol. 51, iss. 3, pp. 266–292. <https://doi.org/10.1080/03602532.2019.1632885>
  7. Koroleva S. V., Miasoedov N. F. Semax is a universal drug for therapy and research. *Izvestiya Rossiiskoi Akademii Nauk. Biological series*, 2018, no. 6, pp. 669–682 (in Russian).
  8. Akimov M. G., Fomina-Ageeva E. V., Dudina P. V., Andreeva L. A., Myasoyedov N. F., Bezuglov V. V. ACTH(6-9)PGP Peptide Protects SH-SY5Y Cells from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tert-Butyl hydroperoxide, and cyanide cytotoxicity via stimulation of proliferation and induction of pro-survival-related genes. *Molecules*, 2021, vol. 26, iss. 7, pp. 1878. <https://doi.org/10.3390/molecules26071878>
  9. Bakaeva Z. V., Surin A. M., Lizunova N. V., Zgodova A. E., Krasilnikova I. A., Fisenko A. P., Frolov D. A., Andreeva L. A., Myasoyedov N. F., Pinelis V. G. Neuroprotective potential of peptides HFRWPGP (ACTH6-9PGP), KKRRPGP, and PyrRP in cultured cortical neurons at glutamate excitotoxicity. *Dokl. Biochem. Biophys.*, 2020, vol. 491, iss. 1, pp. 62–66. <https://doi.org/10.1134/S1607672920020040>
  10. Kuz'menko T. P., Parchajkina M. V., Revina Je. S., Gladysheva M. Ju., Revin V. V. Influence of neurotrophic factors on the composition of proteins during damage and regeneration of somatic nerves. *Biophysics*, 2023, vol. 68, no. 2, pp. 334–348 (in Russian). <https://doi.org/10.31857/S0006302923020138>
  11. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, pp. 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
  12. Newbern J., Birchmeier C. Nrg1/ErbB signaling networks in Schwann cell development and myelination. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2010, vol. 21, pp. 922–928. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2010.08.008>
  13. Querfurth H., Lee H. K. Mammalian/mechanistic target of rapamycin (mTOR) complexes in neurodegeneration. *Mol. Neurodegener.*, 2021, vol. 16, iss. 1, pp. 44. <https://doi.org/10.1186/s13024-021-00428-5>
  14. Huang H., Liu H., Yan R., Hu M. PI3K/Akt and ERK/MAPK signaling promote different aspects of neuron survival and axonal regrowth following rat facial nerve axotomy. *Neurochem. Res.*, 2017, vol. 42, iss. 12, pp. 3515–3524. <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2399-1>
  15. Hutton S. R., Otis J. M., Kim E. M., Lamsal Y., Stuber G. D., Snider W. D. ERK/MAPK signaling is required for pathway-specific striatal motor functions. *J. Neurosci.*, 2017, vol. 37, iss. 34, pp. 8102–8115. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0473-17.2017>
  16. Wang C. Y., Lin H. C., Song Y. P., Hsu Y.T., Lin S. Y., Hsu P. C., Lin C. H., Hung C. C., Hsu M. C., Kuo Y. M., Lee Y. J., Hsu C. Y., Lee Y. H. Protein kinase C-dependent growth-associated protein 43 phosphorylation regulates gephyrin aggregation at developing GABAergic synapses. *Mol. Cell Biol.*, 2015, vol. 35, iss. 10, pp. 1712–1726. <https://doi.org/10.1128/MCB.01332-14>
  17. Fyffe-Maricich S. L., Schott A., Karl M., Krasno J., Miller R. H. Signaling through ERK1/2 controls myelin thickness during myelin repair in the adult central nervous system. *J. Neurosci.*, 2013, vol. 33, iss. 47, pp. 18402–18408. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2381-13.2013>
  18. Pozhilova E. V., Novikov V. E. Pharmacodynamics and clinical use of the neuropeptide ACTH4-10. *Bulletin of the Smolensk State Medical Academy*, 2020, vol. 19, no. 3, pp. 76–86 (in Russian). <https://doi.org/10.37903/vsgma.2020.3.10>

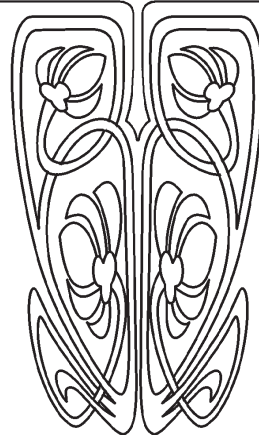
Поступила в редакцию 30.06.2023; одобрена после рецензирования 01.07.2023; принята к публикации 03.07.2023  
The article was submitted 30.06.2023; approved after reviewing 01.07.2023; accepted for publication 03.07.2023



## ЭКОЛОГИЯ



НАУЧНЫЙ  
ОТДЕЛ



Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 3. С. 356–366

*Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2023, vol. 23, iss. 3, pp. 356–366

<https://ichbe.sgu.ru>

<https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-3-356-366>

EDN: KTWEGD

Научная статья

УДК [582.747.2:581.2](470.44-25)

### Циркуляция грибов в системе конский каштан обыкновенный (*Aesculus hippocastanum*) – каштановая минирующая моль (*Cameraria ohridella*) на территории г. Саратова

А. В. Еремакина<sup>1</sup>, А. В. Тарасова<sup>1</sup>, О. В. Нечаева<sup>2</sup>, Е. В. Глинская<sup>1</sup>✉

<sup>1</sup>Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Россия, 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, д. 83

<sup>2</sup>Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю. А., Россия, 410054, г. Саратов, ул. Политехническая, д. 77

Еремакина Анастасия Викторовна, студент кафедры морфологии и экологии животных, [nastyaaerem90@mail.ru](mailto:nastyaaerem90@mail.ru), <https://orcid.org/0009-0007-3611-4658>

Тарасова Анастасия Викторовна, студент кафедры микробиологии и физиологии растений, [nastyusha.tarasova.01@gmail.com](mailto:nastyusha.tarasova.01@gmail.com), <https://orcid.org/0009-0003-4653-1499>

Нечаева Ольга Викторовна, доктор биологических наук, профессор кафедры «Экология и техносферная безопасность», [olgav.nechaeva@rambler.ru](mailto:olgav.nechaeva@rambler.ru), <https://orcid.org/0000-0003-3331-1051>

Глинская Елена Владимировна, кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии и физиологии растений, [elenavg-2007@yandex.ru](mailto:elenavg-2007@yandex.ru), <https://orcid.org/0000-0002-1675-5438>

**Аннотация.** Представлены данные по обнаружению плесневых грибов в системе конский каштан обыкновенный – каштановая минирующая моль, которая является инвазивным вредителем каштанов. Энтомологические и микологические исследования проводили стандартными методами. В ходе работы определяли видовой состав, индекс встречаемости и количественные показатели микромицетов, присутствующих в тканях листьев конского каштана обыкновенного и гусениц каштановой минирующей моли. Проведен анализ 135 образцов гусениц (три поколения насекомых), мин и здоровых листьев растений, собранных на территории г. Саратова с постоянных точек наблюдения (ул. Астраханская, ул. Большая Садовая, ул. Набережная Космонавтов). Выделено 18 видов грибов родов *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* и *Rhizopus*. Численные показатели грибов варьировали от  $10^2$  до  $10^5$  КОЕ/г. В течение вегетационного периода наблюдалось увеличение количественных показателей и видового разнообразия микромицетов. По численности в I поколении насекомых доминировали грибы рода *Aspergillus*, во II поколении – *Alternaria*, а в III поколении доминантным родом был *Cladosporium*. Таким образом, охридский минер может быть природным резервуаром различных грибов, в том числе фитопатогенных.

**Ключевые слова:** микромицеты, *Cameraria ohridella*, *Aesculus hippocastanum*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium*



**Для цитирования:** Еремакина А. В., Тарасова А. В., Нечаева О. В., Глинская Е. В. Циркуляция грибов в системе конский каштан обыкновенный (*Aesculus hippocastanum*) – каштановая минирующая моль (*Cameraria ohridella*) на территории г. Саратова // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 3. С. 356–366. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-3-356-366>, EDN: KTWEGD

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0)

Article

### Circulation of fungi in the system *Aesculus hippocastanum* – *Cameraria ohridella* on the territory of Saratov city

A. V. Eremakina<sup>1</sup>, A. V. Tarasova<sup>1</sup>, O. V. Nechaeva<sup>2</sup>, E. V. Glinskaya<sup>1</sup>✉

<sup>1</sup>Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia

<sup>2</sup>Gagarin State Technical University, 77 Polytechnicheskaya St., Saratov 410054, Russia

Anastasia V. Eremakina, nastyaerem90@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0007-3611-4658>

Anastasia V. Tarasova, nastyusha.tarasova.01@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0003-4653-1499>

Olga V. Nechaeva, olgav.nechaeva@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3331-1051>

Elena V. Glinskaya, elenavg-2007@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1675-5438>

**Abstract.** The article presents data on the detection of mould fungi in the system of *Aesculus hippocastanum* – *Cameraria ohridella* which is an invasive pest of chestnuts. Entomological and mycological studies were conducted using standard methods. The study determined the species composition, occurrence index and quantitative indicators of the micromycetes present in the leaf tissues of *Aesculus hippocastanum* and *Cameraria ohridella* caterpillars. 135 samples of the caterpillars of three generations of the insects, the mines and the healthy plant leaves collected at the permanent observation points in Saratov city (Astrakhanskaya St., Bolshaya Sadovaya St., Naberezhnaya Kosmonavtov St.) were analysed. 18 species of the fungi of the genera *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* and *Rhizopus* were identified. Numerical indicators of fungi ranged from 102 to 105 CFU/g. There was an increase in the quantitative indicators and species diversity of micromycetes during the vegetation period. *Aspergillus* was the dominant genus of fungi in the first generation of insects, *Alternaria* dominated in the second generation, and *Cladosporium* dominated in the third generation. Thus, Ochrid myner can be a natural reservoir of various fungi, including phytopathogenic ones. **Keywords:** micromycetes, *Cameraria ohridella*, *Aesculus hippocastanum*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium*

**For citation:** Eremakina A. V., Tarasova A. V., Nechaeva O. V., Glinskaya E. V. Circulation of fungi in the system *Aesculus hippocastanum* – *Cameraria ohridella* on the territory of Saratov city. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2023, vol. 23, iss. 3, pp. 356–366 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-3-356-366>, EDN: KTWEGD

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC-BY 4.0)

### Введение

Проникновение чужеродных видов насекомых на территорию городского озеленения можно отнести к экологическим катастрофам. Если в новых районах для организмов условия будут благоприятными для жизни и дальнейшего распространения, то их численность начнет быстро расти, а отсутствие естественных врагов приведет к свободному захвату этими видами новых территорий [1].

Инвазивные виды занимают второе место среди угроз биологическому разнообразию, потому любые данные о расселении вредителей невероятно важны [2].

Наиболее тревожным и актуальным за последние годы случаем подобного массового распространения стала каштановая минирующая моль (*Cameraria ohridella* Deschka et Dimić, 1986) [1].

С момента ее первого описания по сборам 1984 г. в районе Охридского озера в Македонии югославскими энтомологами Г. Дешкой и

Н. Димичем каштановая минирующая моль, или охридский минер, быстрыми темпами распространилась по территории почти всей Европы и европейской части России [3].

Каштан конский обыкновенный (*Aesculus hippocastanum* L., 1753) относится к древесным породам, широко используемым в декоративных насаждениях во многих странах Европы, однако с каждым годом в городах возрастает угроза уничтожения этого дерева, ведь оно подвергается массовому поражению каштановой молью [4, 5].

Процесс образования нескольких очагов массового повреждения с высокой численностью и отсутствием регуляции на уровне популяции с помощью естественных врагов и любых профилактических мер от городских властей может привести к дефолиации: частичной или полной потере листьев каштана. Поэтому уже в конце лета, а не следующей весной, происходит развитие спящих почек цветов и листьев, что свидетельствует о невероятно больших затратах энергии. Дефолиация в течение последних 10 лет



из-за распространения каштановой минирующей моли наблюдается в Чехии и Венгрии [6–8].

Для каштанового минера характерна зимовка на стадии куколки в опавшей листве внутри мин. Окукливание гусениц может происходить в конце сентября до того, как опала листва, либо гусеницы, которые еще не закончили развитие, могут находиться в уже опавших листьях, тогда процесс их окукливания осуществляется в начале октября. Это является показателем сильных повреждений дерева, поскольку в этом случае листопад происходит раньше срока [5, 9, 10].

Важно отметить, что куколки способны выжить под снежным покровом. Согласно данным литературы, куколки каштановой моли могут выживать даже при температуре от  $-19$  до  $-23^{\circ}\text{C}$ , при этом низкие температуры не влияют на нормальное протекание диапаузы и весенний вылет бабочек [5, 11].

Повреждения, которые наносят гусеницы моли, препятствуют нормальному накоплению минеральных веществ, из-за чего конский каштан зимой подвергается риску замерзания, слабеет и становится уязвимым к различным инфекциям. Конский каштан теряет свой первоначальный облик, что приводит к серьезному эстетическому ущербу городам, что является основанием для их замены на другие растения, способные противостоять вредоносным факторам. Эти мероприятия требуют значительных физических усилий и крупных финансовых вложений из государственного бюджета [12].

Помимо вреда, наносимого самими гусеницами, это насекомое является переносчиком грибов, которые вызывают различные заболевания каштана. Распространение каштановой моли происходит быстро: поразив множество регионов Европы, за последние годы она была обнаружена в таких городах России, как Москва, Саратов, Самара, Пенза, Хвалынский, Вольск, Волгоград и другие [13–15].

В Латвии в 2010–2012 гг. было проведено исследование с целью получения данных о смертности каштановой минирующей моли и выявления энтомопатогенных микроорганизмов. Выделяли несколько причин гибели охридского минера: паразиты, грибы, бактерии или какой-то другой фактор. По симптомам инфекции, к которым относились, например, снижение подвижности, изменение цвета, покрытие грибковым мицелием или конидиями, выделили 11 видов энтомопатогенных грибов, которые относились к 6 родам: *Aspergillus* sp., *Beauveria* sp., *Isaria* sp., *Hirsutella* sp., *Metarhizium* sp. и

*Lecanicillium* sp. Последние три рода были впервые выделены из чешуекрылых вредителей в Латвии [16].

В 2013–2014 гг. на юго-западе Словакии были собраны и исследованы на грибковую инфекцию 7070 куколок каштановой моли. В целом распространенность грибковых заболеваний была низкой и не превышала 7%, поскольку возбудители были выделены из 319 образцов. Учеными было идентифицировано 2 рода энтомопатогенных грибов – *Beauveria* и *Isaria*, среди которых доминирующим оказался *Beauveria* spp., на долю которого приходилось 84,6% [17].

В насаждениях конского каштана обыкновенного на территории Москвы и Подмосковья выявлено 26 видов грибов, из которых к отделу Ascomycota относится всего 1, к Basidiomycota – 13 и к анаморфным грибам – 12. Большинство из обнаруженных представителей являются эврихорными, некоторые из них – космополиты, например, *Chondrostereum purpureum*, *Irpex lacteus*, *Pleurotus ostreatus*, *Phellinus igniarius*, *Schizophyllum commune*, *Stereum hirsutum*, *Trametes pubescens*, *Tubercularia vulgaris* [18–21].

Пять видов несовершенных грибов (*Coniothyrium australe*, *Dothiorella aesculi*, *Fusicoccum aesculi*, *Phoma hippocastani* и *Phomopsis coneglanensis*) известны только в некоторых странах Европы, включая Украину и прибалтийские государства. Многие из них являются политрофными и способны развиваться на нескольких породах деревьев и кустарников.

Весьма широким кругом питающих растений характеризуются все базидиальные дереворазрушающие грибы, из несовершенных в этой связи следует отметить *Cytospora leucosperma*, *Tubercularia vulgaris* и *Truncatella angustata*.

Согласно данным литературы, 8 выявленных видов связаны в своем развитии только с конским каштаном (*Erysiphe flexuosa*, *Coniothyrium australe*, *Diplodia aesculi*, *Diplodina aesculi*, *Dothiorella aesculi*, *Fusicoccum aesculi*, *Phoma hippocastani*, *Phomopsis coneglanensis*) [20–23].

Среди обнаруженных микромицетов 12 видов грибов ранее не были отмечены на конском каштане обыкновенном и на других представителях рода *Aesculus*. Все они являются политрофными и имеют обширные ареалы, включающие территорию Московской области. Выявленные виды в большинстве своем являются патогенными (21), они инфицируют листья, ветви и стволы, вызывая различные заболевания. Наиболее



значимыми из них, приводящими к заболеванию листьев, являются *Erysiphe flexuosa* и *Phyllosticta sphaerospoidea* [24].

Исследований по грибковым поражениям каштана конского обыкновенного, ассоциированных с охридским минером, в Поволжском регионе не было.

Целью работы являлось определение возможности циркуляции грибов в системе конский каштан обыкновенный (*Aesculus hippocastanum* L., 1753) – каштановая минирующая моль (*Cameraria ohridella* Deschka et Dimić, 1986).

### Материалы и методы

Работа проводилась с июня по октябрь 2022 г. на базе кафедры микробиологии и физиологии растений Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н. Г. Чернышевского.

В ходе энтомологического исследования А. В. Еремакиной были собраны пробы гусениц (3 поколения насекомых), мин и «здоровых» (без мин) листьев с постоянных точек наблюдения на территории г. Саратова, представленных на рис. 1 [25].

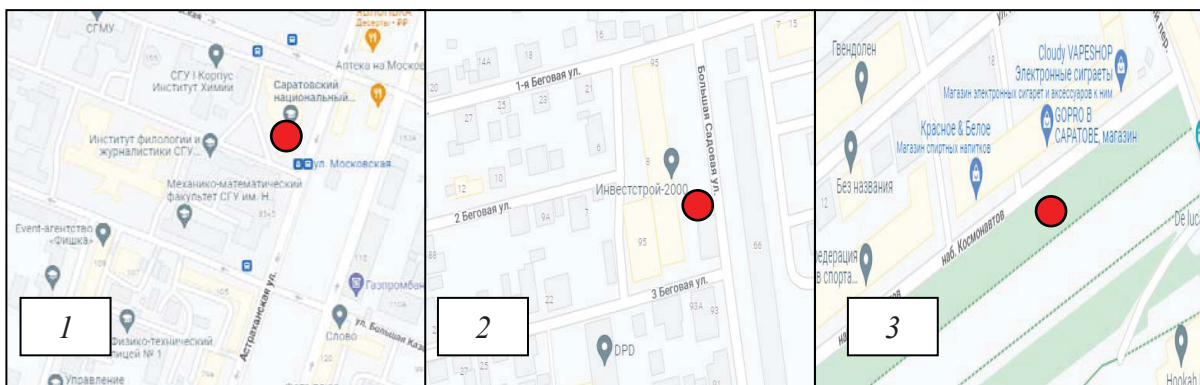


Рис. 1. Места сбора листьев конского каштана в г. Саратове на ул. Астраханской (1), Большой Садовой (2) и Набережной Космонавтов (3)

Fig. 1. Places for collecting horse chestnut leaves in Saratov on Astrakhanskaya street (1), Bolshaya Sadovaya street (2) and Embankment of Cosmonauts (3)

Идентификацию личинок каштановой моли осуществлял доктор биологических наук, заведующий кафедрой морфологии и экологии животных Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н. Г. Чернышевского В. В. Аникин.

Энтомологические и микологические исследования полученных проб осуществляли стандартными методами. Идентификацию выделенных грибов проводили на основании изучения их фенотипических свойств по определителю микромицетов [26].

В ходе исследования определяли видовой состав, индекс встречаемости (ИВ) и количественные показатели (КОЕ/г) грибов «здоровых» листьев конского каштана обыкновенного, гусениц каштановой минирующей моли и мин [27–29].

В программе Cluster Analysis рассчитывали коэффициент Жаккара как определение числа видов, общих для двух площадок, выраженное в процентах от общего числа видов.

### Результаты исследований

По результатам энтомологического исследования, представленным в табл. 1, степень поражения охридским минером листьев конского каштана обыкновенного в г. Саратове в 2022 г. с I по III поколение выросла в 33,5 раз.

Микологический анализ исследуемых объектов показал, что разнообразие грибов и их численность менялись в зависимости от поколения каштановой моли. Анализ образцов I поколения каштановой моли позволил установить, что в пробах, собранных на улице Астраханской, грибы были выделены только из мин и по результатам идентификации отнесены к роду *Aspergillus* (табл. 2). В образцах, полученных с точки отбора № 2, расположенной на улице Большая Садовая, *Aspergillus niger* был выделен только из здоровых листьев, а из мин – грибы родов *Cladosporium* и *Rhizopus*. В точке отбора № 3, расположенной на Набережной Космонавтов, инфицированными оказались только мины каштановой моли, из которых был выделен 1 вид грибов *Cladosporium*





Таблица 1 / Table 1

**Степень поражения охридским минером листьев конского каштана обыкновенного  
на территории г. Саратова**  
**The degree of damage by the Ohrid miner to the leaves of horse chestnut in the territory of Saratov**

г. Саратов / Saratov			
Показатель / Indicator	Степень поражения листьев, % / The degree of damage to the leaves, %		
	ул. Астраханская / Astrakhanskaya St.	ул. Большая Садовая / Bolshaya Sadovaya St.	Набережная Космонав- тов / Embankment of Cosmonauts
I поколение / I generation			
Среднее значение (по 3 деревьям) / Average value (over 3 trees)	1,3	1,5	2
Среднее значение макс. / Avg. Max.	3,90		
Среднее значение мин. / Avg. Min	0,33		
Среднее значение поражения / Avg. Defeat	1,6		
II поколение / II generation			
Среднее значение (по 3 деревьям) / Avg. (over 3 trees)	9,0	16,6	22,2
Среднее значение макс. / Avg. Max.	36,33		
Среднее значение мин. / Avg. Min	3,43		
Среднее значение поражения / Avg. Defeat	15,93		
III поколение / III generation			
Среднее значение (по 3 деревьям) / Avg. (over 3 trees)	51,5	49,1	60,2
Среднее значение макс. / Avg. Max.	72,9		
Среднее значение мин. / Avg. Min	34,7		
Среднее значение поражения / Avg. Defeat	53,6		

*herbarum*. Количественные показатели микромицетов в точке отбора на улице Астраханская составляли от  $10^2$  до  $3 \times 10^2$  КОЕ/г, на улице Большая Садовая варьировали в диапазоне от  $10^2$  до  $10^3$  КОЕ/г, а на Набережной Космонавтов были в пределах  $2 \cdot 10^2$  КОЕ/г. Индекс встречаемости грибов на всех точках не превышал 20 %.

Таким образом, из проб I поколения каштановой моли было выделено 3 рода грибов (*Aspergillus*, *Cladosporium*, *Rhizopus*), среди которых доминантным являлся род *Aspergillus*. Индекс встречаемости микромицетов находился в диапазоне от 20 до 100%.

Анализ образцов II поколения каштановой моли показал, что в минах, собранных на улице Астраханской, грибы отсутствовали, в здоровых листьях были обнаружены грибы рода *Aspergillus*, а в гусеницах – только грибы рода *Penicillium* (табл. 3). Наибольшее видовое разнообразие выявлено в пробах, полученных с точки отбора

на улице Большая Садовая. Так, из здоровых листьев были выделены два вида микромицетов – *Aspergillus niger* и *Fusarium proliferatum*, из гусениц – *Alternaria alternata*. Однако наибольшее количество видов грибов ( $n = 4$ ) было обнаружено в минах каштановой моли – *Aspergillus niger*, *Rhizopus microsporus*, *Penicillium chrysogenum* и *Rhizopus stolonifer*. Видовое разнообразие образцов, полученных с Набережной Космонавтов было небольшим ( $n = 2$ ), однако грибы рода *Aspergillus* были изолированы из всех исследуемых проб, а из мин также выделялся *Rhizopus stolonifer*. Количественные показатели микромицетов на улице Астраханская варьировали от  $10^2$  до  $2 \cdot 10^2$  КОЕ/г, на улице Большая Садовая и Набережная Космонавтов находились в диапазоне от  $10^2$  до  $10^5$  КОЕ/г. Индекс встречаемости в точке отбора № 1 составил 40% для *Aspergillus niger*, в точке отбора № 2 – для всех грибов 20%, тогда как для точки отбора № 3 варьировал от 20 до 60%.

Таблица 2 / Table 2

**Видовой состав и количественные показатели грибов I поколения на территории г. Саратова**  
**Species composition and quantitative indicators of fungi I generation in the territory of Saratov**

г. Саратов (I поколение) / Saratov (I generation)						
Грибы / Fungi	ул. Астраханская / Astrakhanskaya St.					
	Здоровые листья / Healthy leaves		Гусеницы / Caterpillars		Мины / Mines	
	КОЕ/г / UI/g	ИВ, % / OI, %	КОЕ/г / UI/g	ИВ, % / OI, %	КОЕ/г / UI/g	ИВ, % / OI, %
<i>Aspergillus flavus</i>	–	–	–	–	3·10 <sup>2</sup>	20
<i>Aspergillus niger</i>	–	–	–	–	10 <sup>2</sup>	20
Грибы / Fungi	ул. Большая Садовая / Bolshaya Sadovaya St.					
	Здоровые листья / Healthy leaves		Гусеницы / Caterpillars		Мины / Mines	
	КОЕ/г / UI/g	ИВ, % / OI, %	КОЕ/г / UI/g	ИВ, % / OI, %	КОЕ/г / UI/g	ИВ, % / OI, %
<i>Aspergillus niger</i>	10 <sup>3</sup>	20	–	–	–	–
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	–	–	–	–	3·10 <sup>2</sup>	20
<i>Rhizopus microsporus</i>	–	–	–	–	10 <sup>2</sup>	20
Грибы / Fungi	ул. Набережная Космонавтов / Embankment of Cosmonauts					
	Здоровые листья / Healthy leaves		Гусеницы / Caterpillars		Мины / Mines	
	КОЕ/г / UI/g	ИВ, % / OI, %	КОЕ/г / UI/g	ИВ, % / OI, %	КОЕ/г / UI/g	ИВ, % / OI, %
<i>Cladosporium herbarum</i>	–	–	–	–	2·10 <sup>2</sup>	20

Таблица 3 / Table 3

**Видовой состав и количественные показатели грибов II поколения на территории г. Саратова**  
**Species composition and quantitative indicators of fungi II generation in the territory of Saratov**

г. Саратов (II поколение) / Saratov (II generation)						
Грибы / Fungi	ул. Астраханская / Astrakhanskaya St.					
	Здоровые листья / Healthy leaves		Гусеницы / Caterpillars		Мины / Mines	
	КОЕ/г / UI/g	ИВ, % / OI, %	КОЕ/г / UI/g	ИВ, % / OI, %	КОЕ/г / UI/g	ИВ, % / OI, %
<i>Aspergillus flavus</i>	10 <sup>2</sup>	20	–	–	–	–
<i>Aspergillus niger</i>	2·10 <sup>2</sup>	40	–	–	–	–
<i>Penicillium notatum</i>	–	–	10 <sup>2</sup>	20	–	–
Грибы / Fungi	ул. Большая Садовая / Bolshaya Sadovaya St.					
	Здоровые листья / Healthy leaves		Гусеницы / Caterpillars		Мины / Mines	
	КОЕ/г / UI/g	ИВ, % / OI, %	КОЕ/г / UI/g	ИВ, % / OI, %	КОЕ/г / UI/g	ИВ, % / OI, %
<i>Aspergillus niger</i>	10 <sup>2</sup>	20	–	–	5·10 <sup>2</sup>	40
<i>Fusarium proliferatum</i>	3·10 <sup>2</sup>	20	–	–	–	–
<i>Alternaria alternata</i>	–	–	10 <sup>5</sup>	20	–	–
<i>Rhizopus microsporus</i>	–	–	–	–	2·10 <sup>2</sup>	20
<i>Penicillium chrysogenum</i>	–	–	–	–	2·10 <sup>2</sup>	20
<i>Rhizopus stolonifer</i>	–	–	–	–	2·10 <sup>2</sup>	20
Грибы / Fungi	Набережная Космонавтов / Embankment of Cosmonauts					
	Здоровые листья / Healthy leaves		Гусеницы / Caterpillars		Мины / Mines	
	КОЕ/г / UI/g	ИВ, % / OI, %	КОЕ/г / UI/g	ИВ, % / OI, %	КОЕ/г / UI/g	ИВ, % / OI, %
<i>Aspergillus niger</i>	10 <sup>3</sup>	40	10 <sup>2</sup>	20	5·10 <sup>2</sup>	60
<i>Rhizopus stolonifer</i>	–	–	–	–	10 <sup>5</sup>	20



Таким образом, из исследуемого материала II поколения каштановой моли выделены грибы, которые по результатам идентификации были отнесены к 5 родам (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Rhizopus*). Среди них, как и при исследовании I поколения каштановой моли, доминантными оказались грибы рода *Aspergillus*.

В образцах III поколения каштановой моли, собранных на улице Астраханской, грибы рода *Aspergillus* были обнаружены во всех исследуемых объектах третьего поколения каштановой минирующей моли, а наибольшее видовое разнообразие плесневых грибов было характерно для гусениц ( $n = 8$ ) (табл. 4).

Таблица 4 / Table 4

**Видовой состав и количественные показатели грибов III поколения на территории г. Саратова**  
**Species composition and quantitative indicators of fungi III generation in the territory of Saratov**

г. Саратов (III поколение) / Saratov (III generation)						
Грибы / Fungi	ул. Астраханская / Astrakhanskaya St.					
	Здоровые листья / Healthy leaves		Гусеницы / Caterpillars		Мины / Mines	
	КОЕ/г / UI/g	ИВ, % / OI, %	КОЕ/г / UI/g	ИВ, % / OI, %	КОЕ/г / UI/g	ИВ, % / OI, %
<i>Fusarium oxysporum</i>	10 <sup>5</sup>	80	2·10 <sup>5</sup>	80	–	–
<i>Aspergillus fumigatus</i>	5·10 <sup>4</sup>	100	10 <sup>3</sup>	20	10 <sup>5</sup>	60
<i>Aspergillus parasiticus</i>	10 <sup>3</sup>	40	10 <sup>3</sup>	20	5·10 <sup>3</sup>	20
<i>Aspergillus ochraceus</i>	–	–	5·10 <sup>3</sup>	40	–	–
<i>Rhizopus microsporus</i>	–	–	5·10 <sup>2</sup>	40	5·10 <sup>2</sup>	20
<i>Penicillium janthinellum</i>	–	–	10 <sup>2</sup>	20	–	–
<i>Aspergillus terreus</i>	–	–	3·10 <sup>2</sup>	20	5·10 <sup>2</sup>	20
<i>Aspergillus niger</i>	–	–	10 <sup>2</sup>	20	–	–
ул. Большая Садовая / Bolshaya Sadovaya St.						
Грибы / Fungi	Здоровые листья / Healthy leaves		Гусеницы / Caterpillars		Мины / Mines	
	КОЕ/г / UI/g	ИВ, % / OI, %	КОЕ/г / UI/g	ИВ, % / OI, %	КОЕ/г / UI/g	ИВ, % / OI, %
	<i>Fusarium oxysporum</i>	10 <sup>4</sup>	40	10 <sup>5</sup>	60	10 <sup>4</sup>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	10 <sup>4</sup>	80	2·10 <sup>4</sup>	20	5·10 <sup>4</sup>	60
<i>Aspergillus parasiticus</i>	10 <sup>5</sup>	80	5·10 <sup>3</sup>	40	5·10 <sup>4</sup>	80
<i>Aspergillus ochraceus</i>	10 <sup>3</sup>	20	–	–	–	–
<i>Penicillium janthinellum</i>	–	–	10 <sup>2</sup>	20	–	–
<i>Penicillium digitatum</i>	10 <sup>3</sup>	20	5·10 <sup>2</sup>	40	5·10 <sup>3</sup>	20
<i>Aspergillus niger</i>	–	–	–	–	5·10 <sup>4</sup>	20
Набережная Космонавтов / Embankment of Cosmonauts						
Грибы / Fungi	Здоровые листья / Healthy leaves		Гусеницы / Caterpillars		Мины / Mines	
	КОЕ/г / UI/g	ИВ, % / OI, %	КОЕ/г / UI/g	ИВ, % / OI, %	КОЕ/г / UI/g	ИВ, % / OI, %
	<i>Fusarium oxysporum</i>	5·10 <sup>4</sup>	60	5·10 <sup>4</sup>	60	10 <sup>5</sup>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	10 <sup>2</sup>	20	–	–	–	–
<i>Aspergillus parasiticus</i>	10 <sup>5</sup>	100	10 <sup>5</sup>	40	5·10 <sup>3</sup>	40
<i>Penicillium janthinellum</i>	5·10 <sup>2</sup>	20	–	–	3·10 <sup>2</sup>	20
<i>Penicillium digitatum</i>	10 <sup>3</sup>	40	5·10 <sup>3</sup>	60	10 <sup>3</sup>	40
<i>Fusarium proliferatum</i>	5·10 <sup>3</sup>	60	5·10 <sup>3</sup>	20	2·10 <sup>3</sup>	40
<i>Aspergillus flavus</i>	5·10 <sup>3</sup>	20	5·10 <sup>2</sup>	20	5·10 <sup>2</sup>	20
<i>Aspergillus nidulans</i>	10 <sup>2</sup>	20	–	–	–	–
<i>Cladosporium herbarum</i>	–	–	–	–	10 <sup>5</sup>	20
<i>Aspergillus niger</i>	2·10 <sup>2</sup>	40	10 <sup>2</sup>	20	10 <sup>3</sup>	20



Из всех образцов, полученных с точки отбора на улице Большая Садовая, были выделены грибы родов *Aspergillus* и *Fusarium*. Наиболее разнообразной оказалась микофлора, выделенная со здоровых листьев на Набережной Космонавтов ( $n = 9$ ) и мин ( $n = 8$ ). В точке отбора № 1 максимальная численность была установлена для грибов рода *Aspergillus*, в точке отбора № 2 – родов *Aspergillus* и *Fusarium*, а в точке отбора № 3 – родов *Fusarium*, *Aspergillus* и *Penicillium*. Количественные показатели грибов на всех точках варьировали от  $10^2$  до  $10^5$  КОЕ/г. Индекс встречаемости микромицетов в точке № 1 варьировал от 20 до 80%, тогда как в точках № 2 и 3 достигал 100%.

Таким образом, из образцов исследуемого материала III поколения каштановой моли было выделено 5 родов грибов (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Rhizopus*), среди которых доминантными были рода *Aspergillus* и *Fusarium*.

Полученные результаты позволили установить доминирующие виды микромицетов для каждого поколения каштановой моли: для I поколения было характерно доминирование грибов рода *Aspergillus*, для II поколения – родов *Aspergillus* и *Fusarium*, а для III поколения – рода *Fusarium*.

Таким образом, по результатам микологического исследования образцов здоровых листьев, гусениц и мин каштановой моли, полученных с контрольных точек в г. Саратове, всего было выделено 18 видов грибов родов *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* и *Rhizopus*. Количественные показатели грибов варьировали от  $10^2$  до  $10^5$  КОЕ/г. Для грибов были характерны рост общей обсемененности объектов, увеличение видового разнообразия и/или замещение видов.

Статистическую оценку видового и количественного разнообразия грибов конского каштана обыкновенного и гусениц каштановой минирующей моли проводили с использованием кластерного анализа (рис. 2, 3).

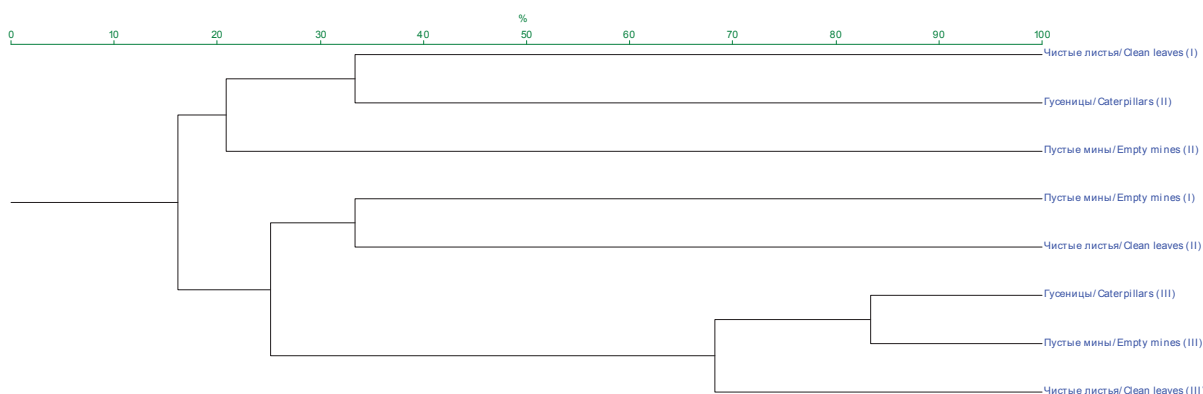


Рис. 2. Сходство видового состава грибов по коэффициенту Жаккара (качественный анализ)  
 Fig. 2. Similarity of the species composition of fungi by the Jacquard coefficient (qualitative analysis)

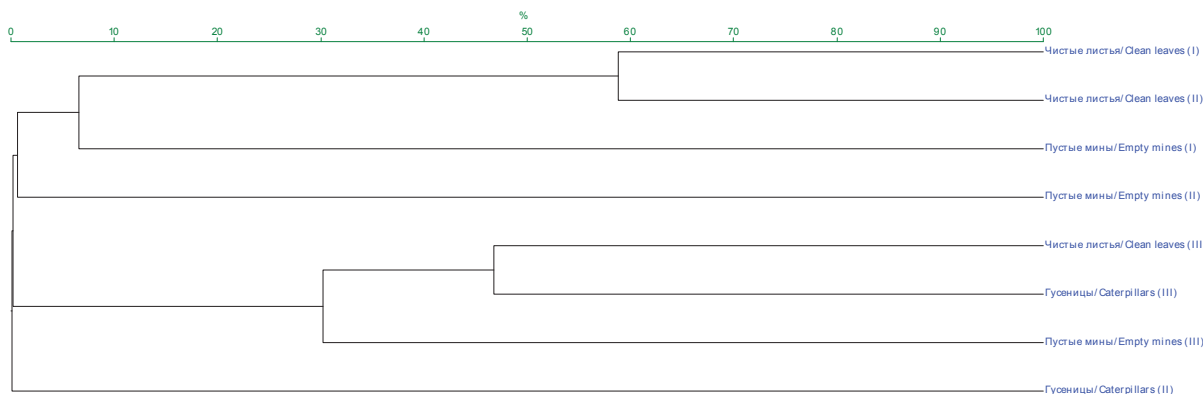


Рис. 3. Сходство количественного состава грибов по коэффициенту Жаккара (количественный анализ)  
 Fig. 3. Similarity of the quantitative composition of fungi by the Jacquard coefficient (quantitative analysis)



Наибольшее сходство видового состава микромицетов наблюдали в III поколении у гусениц и мин ( $K_f = 83\%$ ). Здоровые листья третьего поколения моли также имели с ними высокое сродство – 68%.

Кластерный анализ определил наибольший показатель сходства количественного состава грибов между здоровыми листьями конского каштана I и II поколения каштановой моли ( $K_f = 59\%$ ). Пробы здоровых листьев и гусениц третьего поколения были сходны на 48%.

Таким образом, наибольшее сходство видового состава грибов наблюдали в III поколении гусениц охридского минера и листьев, пораженных минером. На основании количественного анализа грибов максимальным сродством обладали здоровые листья конского каштана I и II поколения каштановой моли.

### Заключение

Циркуляция грибов в системе конский каштан обыкновенный (*Aesculus hippocastanum*) – каштановая минирующая моль (*Cameraria ohridella*) является актуальной проблемой во многих городах Европы. Каштаны одни из наиболее предпочитаемых декоративных растений в городских ландшафтах, и их поражение данным инвазивным насекомым может нанести серьезный вред экологической и эстетической стороне городов. Каштановая моль – это фитофаг, который зарекомендовал себя как один из наиболее значимых вредителей каштанов. Она широко распространена на территории г. Саратова и, активно размножаясь, значительно увеличивает численность популяции, что, в свою очередь, приводит к быстрому пожелтению и опаданию листьев конского каштана обыкновенного и в конечном итоге к гибели растения.

Многочисленная эндофитная микофлора в гусеницах охридского минера свидетельствует о том, что насекомые выступают в качестве резервуара и переносчика различных грибов. Кроме того, большое количество микромицетов обнаружено в здоровых листьях растения, на основе чего можно сделать вывод, что каштановая минирующая моль способствует быстрому и направленному распространению грибов, дополнительно заражая листья каштана конского обыкновенного и приводя к развитию грибковых поражений.

Повышение информированности населения и выделение средств на борьбу с каштановой

минирующей молью являются эффективными методами в предотвращении распространения инвазивного вредителя и гибели каштанов. Кроме того, необходимо вести систематическую борьбу против каштановой минирующей моли в местах насаждений каштанов, а также регулярно проводить санитарную обрезку пораженных растений.

### Список литературы

1. Лесной вестник. Научно-информационный журнал. Мытищи : Московский государственный университет леса, 2009. Вып. 5. 234 с.
2. Kirichenko N. I. Tracing the invasion of a leaf-mining moth in the Palearctic through DNA barcoding of historical herbaria // Scientific Reports. 2022. Vol. 12, iss. 1. P. 50–65. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08894-7>
3. Гниненко Ю. И., Мухамадиев Н. С., Ашикбаев Н. Ж. Охридский минер *Cameraria ohridella* (Lepidoptera, Gracillariidae) – обнаружение в Центральной Азии // Российский журнал биологических инвазий. 2016. Т. 9, вып. 4. С. 14–18.
4. Аникин В. В., Мосолова Е. Ю. К распространению и экологии каштановой минирующей моли *Cameraria ohridella* на территории г. Саратова в 2019 г. // Энтомологические и паразитические исследования в Поволжье. 2019. Вып. 16. С. 79–84.
5. Голосова М. А., Гниненко Ю. И., Голосова Е. И. Каштановый минер *Cameraria ohridella* – опасный карантинный вредитель на объектах городского озеленения. М. : ВПРС МОББ, МГУЛ, ВНИИЛМ. 2008. 27 с.
6. Зерова М. Д. Каштановая минирующая моль в Украине / науч. ред. И. Г. Плющ. Киев : Велес, 2007. 90 с.
7. Алексакина О. В. Аспекты распространения каштановой минирующей моли в урбанизированных экосистемах в условиях Центрально-черноземного района Российской Федерации // Вестник сельского развития и социальной политики. 2017. № 3 (15). С. 38–39.
8. Szaboky C. Verbreitung der Roßkastanienminiermotte in Ungarn // Forstschutz Aktuell. 1997. Iss. 21. P. 4.
9. Skuhavy V. Zur Kenntnis der Blattminenmotte *Cameraria ohridella* Desch. & Dim. (Lep., Lithocolletidae) an *Aesculus hippocastanum* L. in der Tschechischen Republik // Anzeiger für Schadlingskunde Pflanzenschutz Umweltschutz. 1998. Bd. 71. S. 82–84. <https://doi.org/10.1007/BF02770638>
10. Buszko J. Invasive Alien Species Fact Sheet – *Cameraria ohridella*. Web-page, 2006. URL: <https://www.nobanis.org>. (дата обращения: 05.05.2023).
11. Kovacs Z. Megfigyelesek a vadgesztenyelevel – aknazomoly *Cameraria ohridella* Deschka & Dimic 1986 (Lep., Lithocolletidae) attelelesevel es egyedfe – jlodesevel Kapcsolatban // Novenyvedeiem. 1999. Vol. 35, iss. 2. P. 57–59.
12. Селиховкин А. В., Барышникова С. В., Денисова Н. В. Видовой состав и динамика плотности популяций



- доминирующих чешуекрылых дендрофагов (Lepidoptera) в Санкт-Петербурге и его окрестностях // Энтомологическое обозрение. 2018. Т. 97, вып. 4. С. 617–639. <https://doi.org/10.1134/S0367144518040032>
13. Аникин В. В. Насекомые инвайдеры в Поволжье в XXI веке // Природа Симбирского Поволжья. 2019. Вып. 20. С. 92–97.
  14. Аникин В. В., Аникин Д. Б. Полное заселение охридским минером конского каштана г. Саратова в 2021 году // Энтомологические и паразитологические исследования в Поволжье. 2021. Вып. 18. С. 95–101.
  15. Anikin V. Present day bio-invasions in the Volga-Ural Region: from the South to the North or from the East to the West? *Cameraria ohridella* (Lepidoptera: Gracillariidae) in the Lower and Middle Volga // Zootaxa. 2019. Vol. 4624, № 4. P. 583–588. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4624.4.9>
  16. Metla Z., Voitekāne S., Seškēna R. Presence of entomopathogenic fungi and bacteria in Latvian population of horse-chestnut leaf miner *Cameraria ohridella* // Acta Biol. Univ. Daugavp. 2013. Vol. 13, iss. 1. P. 69–76.
  17. Schemmer R., Chládeková P., Medo J. Natural Prevalence of Entomopathogenic Fungi in Hibernating Pupae of *Cameraria ohridella* (Lepidoptera: Gracillariidae) and Virulence of Selected Isolates // Plant Protect. Sci. 2016. Vol. 52, iss. 3. P. 199–208. <https://doi.org/10.17221/110/2015-PPS>
  18. Бондарцева М. А. Определитель грибов России. Порядок афиллофоровые. Семейства альбатрелловые, апорпиевые и др. СПб. : Наука, 1998. Вып. 2. 391 с.
  19. Давыдкина Т. А. Стереумовые грибы Советского Союза. Л. : Наука, 1980. 143 с.
  20. Sutton B. C. The Coelomycetes. Fungi imperfecti with ruznidia, acervuli and stromata. England, Commonwealth Mycological Institute, 1980. 696 p.
  21. Farr D. F. Fungi on plants products in the United States – USA, Minnesota : APS PRESS, 1989. 1252 p.
  22. Визначник грибів України. Т. 3. Незавершені гриби / С. Ф. Морочковський и др. Київ : Наукова думка, 1971. 696 с.
  23. Шевченко С. В. Лесная фитопатология. Киев : Вища школа, 1986. 381 с.
  24. Колганихина Г. Б., Соколова Э. С. Фитопатогенные грибы на *Aesculus hippocastanum* L. в Москве и Подмосковье // Вестник МГУЛ – Лесной вестник. 2013. № 6 (98). С. 112–116.
  25. Голуб В. Б., Цуриков М. Н., Прокин А. А. Коллекции насекомых: сбор, обработка и хранение материала. М. : Т-во науч. изд. КМК, 2012. 339 с.
  26. Благовещенская Е. Ю. Фитопатогенные микромицеты: учебный определитель. М. : URSS, 2015. 232 с.
  27. Элафори А. Б. А. И., Глинская Е. В., Дымнич А. С. Ассоциативные микроорганизмы трофической цепи конский каштан обыкновенный *Aesculus hippocastanum* L., 1753 – каштановая минирующая моль *Cameraria ohridella* Deschka et Dimić, 1986 // Исследования молодых ученых в биологии и экологии. 2021. Вып. 17. С. 160–161.
  28. Глинская Е. В., Тарасова А. В., Еремакина А. В. Каштановая минирующая моль *Cameraria ohridella* Deschka et Dimić, 1986 (Lepidoptera: Gracillariidae) как резервуар сапрофитных микроорганизмов. М. : Т-во науч. изд. КМК, 2022. 107 с.
  29. Еремакина А. В., Глинская Е. В. Ассоциативные микроорганизмы трофической цепи конский каштан *Aesculus hippocastanum* – каштановая минирующая моль *Cameraria ohridella* на территории Хвалынского и Саратова в 2021–2022 гг. // Энтомологические и паразитологические исследования в Поволжье. 2022. Вып. 19. С. 111–115.

## References

1. *Forest Bulletin. Scientific and Informational Journal*. Mytishchi, Moscow State University of Forest, 2009, iss. 5. 234 p. (in Russian).
2. Kirichenko N. I. Tracing the invasion of a leaf-mining moth in the Palearctic through DNA barcoding of historical herbaria. *Scientific Reports*, 2022, vol. 12, iss. 1, pp. 50–65. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08894-7>
3. Gninenko Yu. I., Mukhamadiev N. S., Ashikbayev N. J. Ohrid miner *Cameraria ohridella* (Lepidoptera, Gracillariidae) – detection in Central Asia. *Russian Journal of Biological Invasions*, 2016, vol. 9, iss. 4, pp. 14–18 (in Russian).
4. Anikin V. V., Mosolova E. Y. On the distribution and ecology of the chestnut mining moth *Cameraria ohridella* on the territory of Saratov in 2019. *Entomological and Parasitological Studies in the Volga Region*, 2019, iss. 16, pp. 79–84 (in Russian).
5. Golosova M. A., Gninenko Yu. I., Golosova E. I. *Kashtanovyi miner Cameraria ohridella – opasnyy karantinnyy vreditel' na ob'yektakh gorodskogo oze-leneniya* [Chestnut miner *Cameraria ohridella* – a dangerous quarantine pest at urban landscaping facilities]. Moscow, VPRS MOBB, MGUL, VNIILM, 2008. 27 p. (in Russian).
6. Plyushch I. G., ed. Zerova M. D. *Kashtanovaya miniruyushchaya mol' v Ukraine* [Chestnut mining moth in Ukraine]. Kiev, Veles, 2007. 90 p. (in Russian).
7. Aleksashkina O. V. Aspects of the spread of the chestnut mining moth in urbanized ecosystems in the conditions of the Central chernozem region of the Russian Federation. *Herald of Rural Development and Social Policy*, 2017, no. 3 (15), pp. 38–39 (in Russian).
8. Szaboky C. Verbreitung der Roßkastanienminiermotte in Ungarn. *Forstschutz Aktueli*, 1997, iss. 21, pp. 4.
9. Skuhavy V. Zur Kenntnis der Blattminenmotte *Cameraria ohridella* Desch. & Dim. (Lep., Lithocolletidae) an *Aesculus hippocastanum* L. in der Tschechischen Republik. *Anzeiger für Schadlingskunde Pflanzenschutz Umweltschutz*, 1998, vol. 71, pp. 82–84. <https://doi.org/10.1007/BF02770638>
10. Buszko J. *Invasive Alien Species Fact Sheet – Cameraria ohridella*. Web-page, 2006. Available at: <https://www.nobanis.org> (accessed May 5, 2023).



11. Kovacs Z. Megfigyelesek a vadgesztenyelevel – aknazomoly *Cameraria ohridella* Deschka & Dimic 1986 (Lep., Lithocolletidae) attelelesevel es egyedfe – jlodesevel Kapcsolatban. *Novenyvedeiem*, 1999, vol. 35, iss. 2, pp. 57–59.
12. Selikhovkin A.V., Baryshnikova S. V., Denisova N. V. Species composition and population density dynamics of dominant Lepidopteran dendrophages (Lepidoptera) in St. Petersburg and its environs. *Entomological Review*, 2018, vol. 97, iss. 4, pp. 617–639 (in Russian). <https://doi.org/10.1134/S0367144518040032>
13. Anikin V. V. Insect invaders in the Volga region in the XXI century. *Nature of the Simbirsk Volga Region*, 2019, iss. 20, pp. 92–97 (in Russian).
14. Anikin V. V., Anikin D. B. Full settlement of the horse chestnut of Saratov by the Ohrid miner in 2021. *Entomological and Parasitological Studies in the Volga Region*, 2021, iss. 18, pp. 95–101 (in Russian).
15. Anikin V. Present day bio-invasions in the Volga-Ural Region: from the South to the North or from the East to the West? *Cameraria ohridella* (Lepidoptera: Gracillariidae) in the Lower and Middle Volga. *Zootaxa*, 2019, vol. 4624, no. 4, pp. 583–588. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4624.4.9>
16. Metla Z., Voitkane S., Sešķēna R. Presence of entomopathogenic fungi and bacteria in Latvian population of horse-chestnut leaf miner *Cameraria ohridella*. *Acta Biol. Univ. Daugavp.*, 2013, vol. 13, iss. 1, pp. 69–76.
17. Schemmer R., Chládeková P., Medo J. Natural Prevalence of Entomopathogenic Fungi in Hibernating Pupae of *Cameraria ohridella* (Lepidoptera: Gracillariidae) and Virulence of Selected Isolates. *Plant Protect. Sci.*, 2016, vol. 52, iss. 3, pp. 199–208. <https://doi.org/10.17221/110/2015-PPS>
18. Bondartseva M. A. *Opredelitel' gribov Rossii. Poryadok afilloforovye. Semeystva al'batrellovye, aporpiyevye i dr.* [Determinant of mushrooms of Russia. The order is aphyllophorous. Families Albatrellaceae, aporpia, etc.]. Saint Petersburg, Nauka, 1998, iss. 2. 391 p. (in Russian).
19. Davydkina T. A. *Stereumovye griby Sovetskogo Soyuz* [Stereum mushrooms of the Soviet Union]. Leningrad, Nauka, 1980. 143 p. (in Russian).
20. Sutton B. C. *The Coelomycetes. Fungi imperfecti with rycnidia, acervuli and stromata*. England, Commonwealth Mycological Institute, 1980. 696 p.
21. Farr D. F. *Fungi on plants products in the United States – USA*. Minnesota, APS PRESS, 1989. 1252 p.
22. *Visnachnik gribiv Ukrapni. Vol. 3. Nezavisimemi gribi* [Determinant of Mushrooms of Ukraine. Vol. 3. Unfinished Mushrooms]. C. F. Morochkovsky et al. Kyiv, Naukova dumka, 1971. 696 p. (in Ukrain).
23. Shevchenko S. V. *Lesnaya fitopatologiya* [Forest Phytopathology]. Kiev, Vysshaya shkola, 1986. 381 p. (in Russian).
24. Kolganikhina G. B., Sokolova E. S. Phytopathogenic fungi on *Aesculus hippocastanum* L. in Moscow and the Moscow region. *Bulletin of MGUL – Lesnoy vestnik*, 2013, no. 6 (98), pp. 112–116 (in Russian).
25. Golub V. B., Tsurikov M. N., Prokin A. A. *Kollektsii nasekomykh: sbor, obrabotka i khraneniye materiala* [Collections of insects: Collection, processing and storage of material]. Moscow, KMK Scientific Press, 2012. 339 p. (in Russian).
26. Blagoveshchenskaya E. Y. *Fitopatogennyye mikromitsety: uchebnyy opredelitel'* [Phytopathogenic micromycetes: educational determinant]. Moscow, URSS, 2015. 232 p. (in Russian).
27. Elkafori A. B. A. I., Glinskaya E. V., Dymnich A. S. Associative microorganisms of the trophic chain horse chestnut *Aesculus hippocastanum* L., 1753 – chestnut mining moth *Cameraria ohridella* Deschka et Dimić, 1986. *Studies of Young Scientists in Biology and Ecology*, 2021, iss. 17, pp. 160–161 (in Russian).
28. Glinskaya E. V., Tarasova A. V., Eremakina A. V. *Kashtanovaya miniruyushchaya mol' Cameraria ohridella Deschka et Dimić, 1986 (Lepidoptera: Gracillariidae) kak rezervuar saprofitnykh mikroorganizmov* [Chestnut mining moth *Cameraria ohridella* Deschka et Dimić, 1986 (Lepidoptera: Gracillariidae) as a reservoir of saprophytic microorganisms]. Moscow, KMK Scientific Press, 2022. 107 p. (in Russian).
29. Eremakina A. V., Glinskaya E. V. Associative microorganisms of the trophic chain horse chestnut *Aesculus hippocastanum* – chestnut mining moth *Cameraria ohridella* on the territory of Khvalynsk and Saratov in 2021–2022. *Entomological and Parasitological Studies in the Volga Region*, 2022, iss. 19, pp. 111–115 (in Russian).

Поступила в редакцию 25.06.2023; одобрена после рецензирования 30.06.2023; принята к публикации 05.07.2023  
The article was submitted 25.06.2023; approved after reviewing 30.06.2023; accepted for publication 05.07.2023



ISSN 1816-9775 (Print). ISSN 2541-8971 (Online)  
Известия Саратовского университета. Новая серия.  
Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Том 23, выпуск 3

## ИЗВЕСТИЯ САРАТОВСКОГО УНИВЕРСИТЕТА Новая серия

- Серия: Акмеология образования. Психология развития
- Серия: История. Международные отношения
- Серия: Математика. Механика. Информатика
- Серия: Науки о Земле
- Серия: Социология. Политология
- Серия: Физика
- Серия: Филология. Журналистика
- Серия: Философия. Психология. Педагогика
- Серия: Химия. Биология. Экология**
- Серия: Экономика. Управление. Право

