

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

ИЗВЕСТИЯ САРАТОВСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

Новая серия

Серия: Химия. Биология. Экология

2023

Том 23

Выпуск 4



IZVESTIYA OF SARATOV UNIVERSITY
CHEMISTRY. BIOLOGY. ECOLOGY

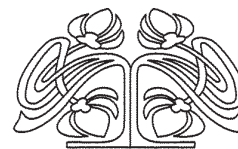


Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского»

ИЗВЕСТИЯ САРАТОВСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

Новая серия
Серия Химия. Биология. Экология, выпуск 4

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



Научный журнал
2023 Том 23

ISSN 1816-9775 (Print)

ISSN 2541-8971 (Online)

Издается с 2005 года

СОДЕРЖАНИЕ

Научный отдел

Химия

Кутина А. А., Сумина Е. Г., Угланова В. З. Сравнение двух типов подвижных фаз для определения витаминов группы В методом тонкослойной хроматографии 370

Устинова М. Н., Золотухина К. А. Инактивация ксенобиотиков: некоторых азокрасителей, нитропроизводных фенола и тетрациклинов 382

Кетруш Е. Ф., Мурсалов Р. К., Силаев Д. В., Русанова Т. Ю. Спектрофотометрическое определение некоторых β-лактамных антибиотиков в их бинарных смесях с использованием метода проекций на латентные структуры 392

Мухомодьярова Д. М., Ибрагимова Д. Н. 5-(1-Арил-3-оксо-3-фенилпропил)-2,2-диметил-1,3-диоксан-4,6-дионы: синтез и реакции с N-нуклеофилами 404

Шипенко К. М., Шиповская А. Б. Структура и надмолекулярное упорядочение L- и D-аспарагината хитозана 411

Биология

Мокеев Д. И., Телешева Е. М., Волохина И. В., Евстигнеева С. С., Пылаев Т. Е., Петрова Л. П., Филипьевичева Ю. А., Шелудько А. В. Геномные перестройки влияют на устойчивость биопленок почвенных бактерий *Azospirillum brasilense* к абиотическим стрессам 426

Коврижников А. В., Балькова А. Н., Куклева Л. М., Нарышкина Е. А., Федоров А. В., Червякова Н. С., Ерошенко Г. А., Кутырев В. В. Молекулярно-генетический анализ штаммов *Yersinia pestis*, выделенных в различные эпизоотические периоды на территории Урало-Эмбенского пустынного природного очага чумы в XX веке 437

Булуктаев А. А. Биологические свойства почв Надеждинского и Северо-Камышанского нефтяных месторождений, расположенных на территории заказника «Меклетинский» 447

Филинкова Т. Н. Цитогенетическая характеристика видов рода *Chironomus* группы "*plumosus*" (Diptera, Chironomidae) природно-территориальных комплексов Уральского региона 461

Соловьева А. А., Лебедева О. Е., Фам Т. Ч. Оценка активности пероксидаз, содержащихся в различных растительных источниках 472

Экология

Пушкова А. Е., Мосолова Е. Ю. Городская популяция кряквы (*Anas platyrhynchos*) в Саратове: зимовка, гнездование, степень синантропизации 479

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 18.12.2023.
Подписано в свет 25.12.2023.
Формат 60 × 84 1/8.
Усл. печ. л. 14,42 (15,5).
Тираж 100 экз. Заказ 133-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; 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

Kutina A. A., Sumina E. G., Uglanova V. Z. Comparison of two types of mobile phases for the determination of B vitamins by thin layer chromatography 370

Ustinova M. N., Zolotukhina K. A. Inactivation of xenobiotics: Some azo dyes, phenol nitro derivatives, and tetracyclines 382

Ketrush E. F., Mursalov R. K., Silaev D. V., Rusanova T. Yu. Spectrophotometric determination of some β -lactam antibiotics in their binary mixtures using the method of partial least squares 392

Mukhomodyarova D. M., Ibragimova D. N. 5-(1-Aryl-3-oxo-3-phenylpropyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4,6-diones: Synthesis and reactions with N-nucleophiles 404

Shipenok X. M., Shipovskaya A. B. Structure and supramolecular ordering of chitosan L- and D-aspartates 411

Biology

Mokeev D. I., Telesheva E. M., Volokhina I. V., Evstigneeva S. S., Pylaev T. E., Petrova L. P., Filip'echeva Yu. A., Shelud'ko A. V. Genomic rearrangements affect the resistance of biofilms of soil bacteria *Azospirillum brasilense* to abiotic stress 426

Kovrizhnikov A. V., Balykova A. N., Kukleva L. M., Naryshkina E. A., Fedorov A. V., Chervyakova N. S., Eroshenko G. A., Kutuyev V. V. Molecular genetic analysis of *Yersinia pestis* strains isolated in different epizootic periods on the territory of the Ural-Embensky desert natural plague focus area in the twentieth century 437

Buluktaev A. A. Biological properties of soils of the "Nadedzhdinsky" and "Severo-Kamyshtansky" oil fields located in the territory of the "Mekletsy" reserve 447

Filinkova T. N. Cytogenetic characteristics of species of the genus *Chironomus* of the group "*plumosus*" (Diptera, Chironomidae) in natural-territorial complexes of the Ural region 461

Solovyeva A. A., Lebedeva O. E., Pham T. T. Evaluation of activity of peroxidases contained in various plant sources 472

Ecology

Pushkova A. E., Mosolova E. Yu. Urban mallard population (*Anas platyrhynchos*) in Saratov: Wintering, nesting, degree of synanthropization 479



**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)

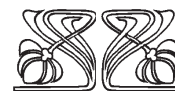
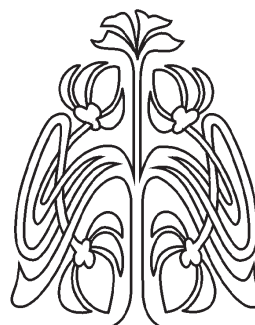
Khidmet S. Shikhaliev (Voronezh, Russia)

Sergey N. Shtykov (Saratov, Russia)

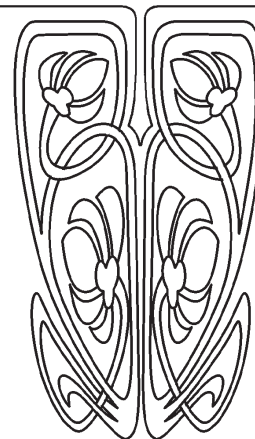
Sergey Ju. Shchyogolev (Saratov, Russia)

Olga I. Yudakova (Saratov, Russia)

Vladimir M. Zakharov (Moscow, Russia)

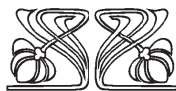
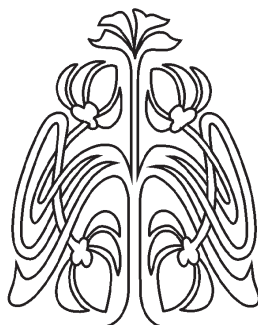


**РЕДАКЦИОННАЯ
КОЛЛЕГИЯ**

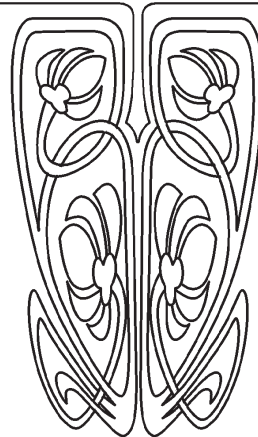




ХИМИЯ



НАУЧНЫЙ
ОТДЕЛ



Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 4. С. 370–381
Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology, 2023, vol. 23, iss. 4, pp. 370–381
<https://ichbe.sgu.ru> <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-4-370-381>
EDN: FASKKF

Научная статья
УДК 543.645: 543.544.943.3

Сравнение двух типов подвижных фаз для определения витаминов группы В методом тонкослойной хроматографии

А. А. Кутина, Е. Г. Сумина , В. З. Углонова

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

Кутина Ангелина Александровна, студент Института химии, kutina2000@mail.ru

Сумина Елена Германовна, доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии и химической экологии Института химии, suminaeg@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7310-9459>

Углонова Варсения Загидовна, кандидат химических наук, доцент кафедры нефтехимии и техногенной безопасности Института химии, uglanovavz@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6638-4508>

Аннотация. Методом тонкослойной хроматографии изучено влияние ряда факторов (природы неподвижной фазы, природы и концентрации органических растворителей и поверхностно-активных веществ, pH буферного раствора) на хроматографические характеристики витаминов группы В: В₁ (тиамин), В₆ (пиридоксин), В₁₂ (цианокобаламин). В качестве неподвижных фаз использовали пластины с полярным (Сорбфил на полимерной (высокоэффективные пластины, высокопроизводительная тонкослойная хроматография) и алюминиевой подложках), слабополярным (Полиамид-6) и неполярным (RP-18 на алюминиевой подложке) сорбентами. В качестве мицеллярных подвижных фаз – мицеллярные растворы хлорида цетилпиридиния в интервале концентраций 5–10⁻⁴ – 5–10⁻¹ М, додецилсульфата натрия в интервале концентраций 2,5–10⁻⁴ – 5–10⁻¹ М. Установлено, что среди водно-органических подвижных фаз лучшие результаты получены для подвижной фазы состава ацетонитрил – вода (15:85) на полярных высокоэффективных пластинах. Более эффективной является подвижная фаза состава ацетонитрил – цетилпиридиний хлорид (15:85) в присутствии фосфатного буферного раствора с pH 3. Для последней подвижной фазы разработано ТСХ-определение витаминов В₁, В₆, В₁₂ в фармацевтических препаратах со значением S_r 0,01 – 0,06.

Ключевые слова: витамины группы В, тонкослойная хроматография, органические растворители, фосфатный буферный раствор, мицеллярные подвижные фазы

Образец для цитирования: Кутина А. А., Сумина Е. Г., Углонова В. З. Сравнение двух типов подвижных фаз для определения витаминов группы В методом тонкослойной хроматографии // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 4. С. 370–381. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-4-370-381>, EDN: FASKKF

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



Article

Comparison of two types of mobile phases for the determination of B vitamins by thin layer chromatographyA. A. Kutina, E. G. Sumina , V. Z. Uglanova

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

Angelina A. Kutina, kutina2000@mail.ru

Elena G. Sumina, suminaeg@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7310-9459>Varseniya Z. Uglanova, uglanovavz@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6638-4508>

Abstract. Thin-layer chromatography (TLC) has been used to study the influence of a number of factors (the nature of the stationary phase, the nature and concentration of the organic solvents and surfactants, the pH of the buffer solution) on the chromatographic characteristics of B vitamins: B₁ (thiamine), B₆ (pyridoxine), B₁₂ (cyanocobalamin). The stationary phases were plates with polar (Sorbfil on a polymer (high-performance plates, HTLC) and aluminum substrates), weakly polar (Polyamide-6), and nonpolar (RP-18 on an aluminum substrate) sorbents. As micellar mobile phases – micellar solutions of cetylpyridinium chloride in the concentration range $5 \cdot 10^{-4}$ – $5 \cdot 10^{-1}$ M, sodium dodecyl sulfate in the concentration range $2,5 \cdot 10^{-4}$ – $5 \cdot 10^{-1}$ M. It has been established that among aqueous-organic mobile phases (MF) the best results have been obtained for MF of the composition acetonitrile – water (15:385) on polar high-performance plates. More effective than acetonitrile – water is the PF of the composition acetonitrile – cetylpyridinium chloride (15:85) in the presence of a phosphate buffer solution with pH = 3. For the last PF, TLC determination of vitamins B₁, B₆, B₁₂ in pharmaceutical preparations with a Sr value of interval 0.01–0.06 has been developed.

Keywords: vitamins B, thin layer chromatography, organic solvents, phosphate buffer solution, micellar mobile phases

For citation: Kutina A. A., Sumina E. G., Uglanova V. Z. Comparison of two types of mobile phases for the determination of B vitamins by thin layer chromatography. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2023, vol. 23, iss. 4, pp. 370–381 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-4-370-381>, EDN: FASKKF

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 одной из актуальных проблем аналитической химии и медицины является изучение различных медикаментозных препаратов, используемых для реабилитации людей после перенесенного COVID-19. Учитывая необычность самой ситуации пандемии и особенности патогенеза заболевания, применение общепринятых методов может быть небезопасным или неэффективным [1].

Исходя из проведенных на сегодняшний день исследований, вирус затрагивает все органы и системы, в том числе повреждение головного мозга вследствие своей нейротропности [2, 3].

Водорастворимые витамины группы В – B₁, B₆, B₁₂ относят к препаратам, которые локализируются в мембранах нервных клеток, оказывают существенное влияние на процессы регенерации поврежденных вирусом нервных волокон, а также участвуют в энергетических процессах в нервных клетках [4].

Дополнительный интерес к витаминам группы В вызван их влиянием на процессы свободнорадикального окисления, играющего важную роль в патогенезе многих заболеваний, что позволило отнести их к витаминам-антиоксидантам [4–6]. Эти вещества активно участвуют в образовании и функционировании ферментов, регуляции энергетического обмена сердца, способствуют усвоению питательных веществ, нормализуют рост клеток и развитие всего организма.

Исходя из значимости этих препаратов, перспективным является разработка новых и совершенствование известных методов и приемов определения витаминов, что возможно реализовать с помощью современных хроматографических методов.

Вследствие сложного состава, нелетучести и необходимости определения как отдельных составляющих, так и примесей наиболее часто для их определения применяют метод обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) [7–16] с разными вариантами детектирования: спектрофотометрическим [9, 17–20], флуориметрическим [11, 21], масс-спектрометрическим [11, 22, 23] и другими детекторами [11]. Кроме этого, водорастворимые витамины определяют методами ЯМР- [24, 25], УФ-спектроскопии [11, 26, 27], капиллярным электрофорезом [28–33].

В отдельных работах для определения витаминов применяется также планарный вариант жидкостной хроматографии в варианте тонкослойной хроматографии (ТСХ) [34–37], который вследствие своей простоты, скорости, необходимости минимальной очистки образца, высокой прецизионности находит все более широкое применение. В настоящей работе проведено дальнейшее развитие этого метода на примере определения витаминов B₁, B₆, B₁₂ с двумя типами подвижных фаз (ПФ) с целью выявления лучшей для практического применения в анализе.



Материалы и методы

Реагенты. Использовали витамины группы В: тиамин (B_1 , 5%-ный водный раствор, «Борисовский завод медицинских препаратов», Россия), пиридоксин (B_6 , 5%-ный водный раствор, «Биосинтез», Россия), цианокобаламин (B_{12} , 500 мкг витамина в ампуле, ОАО «Дальхимфарм», Россия) (рис. 1). Модельные растворы исследуемых витаминов (50 мг/мл для тиамина

и пиридоксина, 0,5 мг/мл для цианокобаламина) готовили разбавлением ампульных растворов бидистиллированной водой. Рабочие растворы витаминов B_1 и B_6 с концентрациями $1-10^{-3}$ мг/мл готовили разбавлением модельных систем в воде. Раствор витамина B_{12} из ампулы использовали в качестве рабочего, так как разбавление уменьшало чувствительность детектирования. Все растворы хранили в холодильной камере.

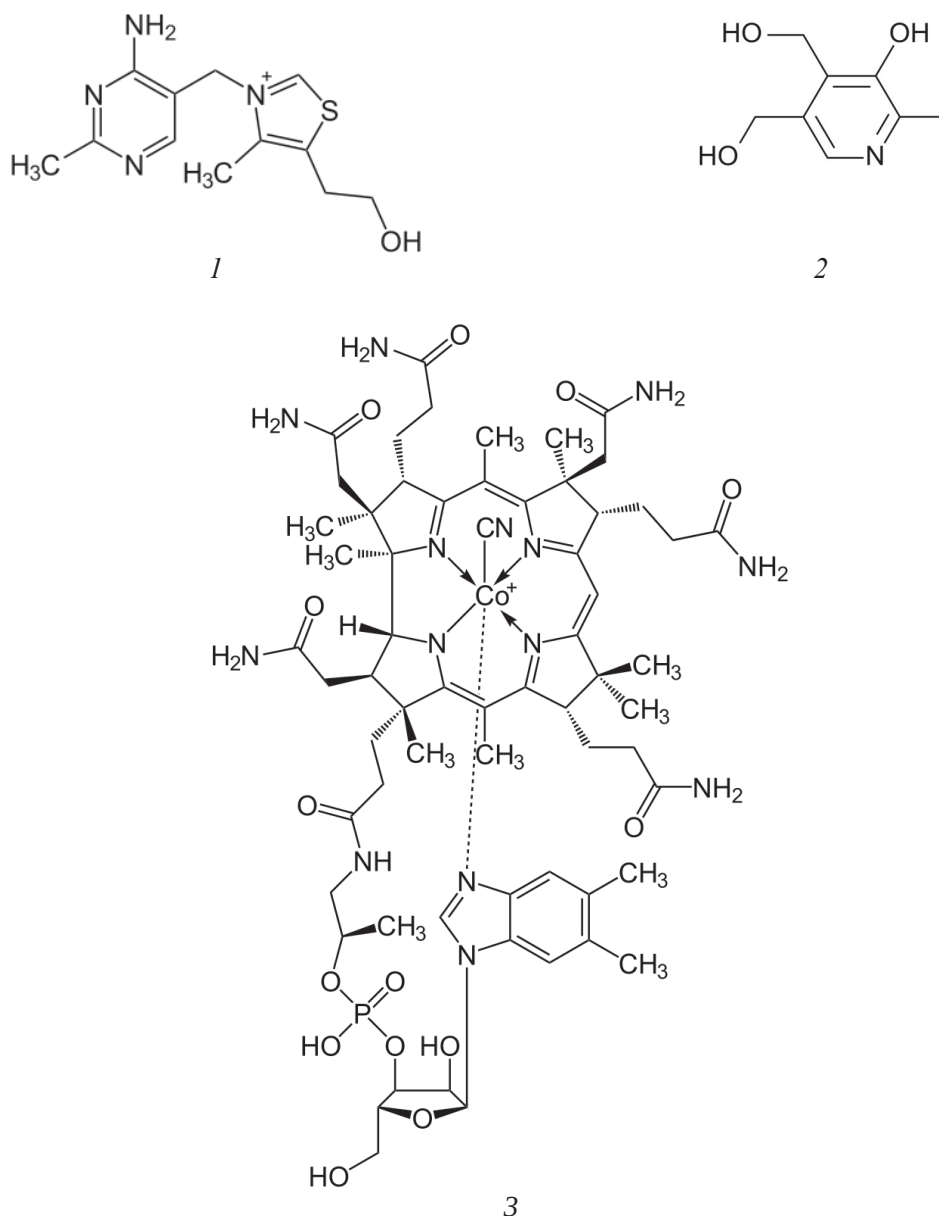


Рис. 1. Структура исследуемых витаминов группы В: 1 – тиамин, B_1 (3-[(4-амино-2-метил-5-пиримидил) метил]-5-(2-гидроксиэтил)-4-метил-тиазол); 2 – пиридоксин, B_6 (4,5-дигидроксиметил-2-метилпиридин-3-ол); 3 – цианокобаламин, B_{12} (Со- α -[α -(5,6-диметил-бензимидазолил)]-(Со- β -циано)кобамид)

Fig. 1. Structure of the studied vitamins of group В: 1 – thiamine, B_1 (2-[3-[(4-amino-2-methylpyrimidin-5-yl)methyl]-4-methyl-1,3-thiazol-3-ium-5-yl]ethanol); 2 – pyridoxinum, B_6 (4,5-Bis(hydroxymethyl)-2-methylpyridin-3-ol); 3 – cyanocobalamin, B_{12} (Cyano-5,6-dimethylbenzimidazole-cobalamin)



Для приготовления водно-органических ПФ использовали этанол ректифицированный, ацетонитрил (о.с.ч.), уксусную кислоту (ч.д.а.); фосфатный буфер готовили растворением в колбе объемом 100 мл 0,68 г калия дигидрофосфата, доводя до нужного рН потенциометрически с помощью концентрированной фосфорной кислоты [38].

Для приготовления мицеллярных ПФ использовали растворы катионных (хлорида цетилпиридиния (ЦПХ), 96%, НПО «Синтез ПАВ», Россия) и анионных (додецилсульфата натрия (ДДСNa), 98%, НПО «Синтез ПАВ», Россия) поверхностно-активных веществ (ПАВ). Исходные растворы ПАВ с концентрацией 0,2 М готовили по точной навеске, растворением в дистиллированной воде при нагревании до 40–50° С. Рабочие растворы всех веществ готовили разбавлением исходных перед употреблением.

Аппаратура. Исследования проводили методом восходящей ТСХ на коммерческих пластинах с полярной – Сорбфил на полимерной (высокоэффективные пластины, высокопроизводительная тонкослойная хроматография (ВТСХ)) и алюминиевой подложках (Сорбполимер, Краснодар, Россия), слабополярной – Полиамид-6 на полимерной (Fluka, Германия) и неполярной – RP-18 (Merck, Дармштадт, Германия) алюминиевой подложке фазами.

После хроматографирования пластинки сушили в течение 4–5 мин при 80°С в сушильном шкафу, охлаждали на воздухе, детектировали в УФ-свете при $\lambda = 254$ нм и рассчитывали значения подвижности (R_f) витаминов, а также параметры эффективности разделения (число теоретических тарелок (N) и высоту, эквивалентную теоретической тарелке (ВЭТТ) (H)) и селективность (α). Обработку параметров хроматограмм проводили с помощью многофункционального графического редактора «Adobe Photoshop CC 2018» (США).

Значения рН буферных растворов контролировали на приборе рН-метр (рН-673.М, Россия) со стеклянным индикаторным электродом и хлоридсеребряным электродом сравнения.

Результаты и их обсуждение

Хроматографические характеристики витаминов в водно-органических ПФ. Выбор оптимальной НФ

При выборе оптимальных условий проводили сравнение четырех неподвижных фаз (НФ): Сорбфил на алюминиевой подложке, высокоэффективные пластины Сорбфил на полимерной подложке, Полиамид-6, RP-18 в сочетании с ПФ ацетонитрил – вода в соотношении 15:85, выбранной на основе данных литературы [35, 39, 40]. Результаты исследований представлены на рис. 2.

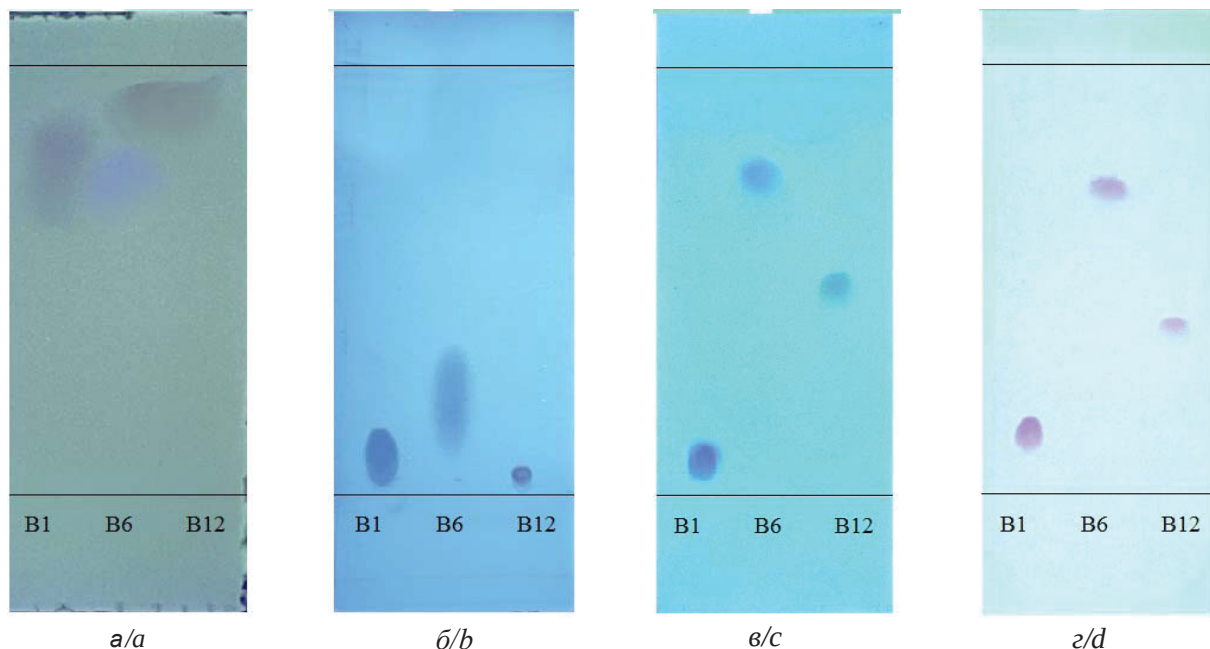


Рис. 2. Влияние природы НФ на хроматографические характеристики витаминов группы В (B_1 – тиамин, B_6 – пиридоксин, B_{12} – цианокобаламин): а – Полиамид-6, б – RP-18, в – Сорбфил, г – Сорбфил, ВТСХ. ПФ: ацетонитрил – вода (15:85). $C_R = 1 \cdot 10^{-3}$ мг/мл

Fig. 2. Influence of the nature of SP on the chromatographic characteristics of vitamins of group B (B_1 – thiamine, B_6 – pyridoxinum, B_{12} – cyanocobalamin): а – Polyamide-6, б – RP-18, в – Sorbfil, д – Sorbfil, HP TLC. MP: acetonitrile – water (15:85). $C_R = 1 \cdot 10^{-3}$ mg/ml



Хроматограммы позволяют заключить, что оптимальными неподвижными фазами в данных условиях являются пластины Сорбфил высокоэффективные на полимерной подложке, так как в этом случае образуются наиболее разрешенные и компактные зоны, в то время как на пластинах Полиамид-6 зоны размыты (см. рис. 2). Использование неподвижных фаз

RP-18 непригодно для определения витаминов, поскольку хроматографические зоны витаминов В₁ и В₆ остаются на линии старта. Полученные результаты подтверждены расчетом параметров эффективности (табл. 1).

Исходя из рассчитанных параметров можно сделать вывод, что неподвижная фаза ϵ (см. рис. 2) является оптимальной.

Таблица 1 / Table 1

Хроматографические характеристики анализируемых систем (В₁ – тиамин, В₆ – пиридоксин, В₁₂ – цианокобаламин) на различных НФ. ПФ: ацетонитрил – вода (15 : 85). C_R = 1·10⁻³ мг/мл (n = 3, P = 0,95)
Chromatographic characteristics of the analyzed systems (В₁ – thiamine, В₆ – pyridoxinum, В₁₂ – cyanocobalamin) in various SP. MP: acetonitrile – water (15 : 85). C_R = 1·10⁻³ mg/ml (n = 3, P = 0,95)

НФ / SP	$\overline{R_f}$			N			H, мм / H, mm		
	В ₁	В ₆	В ₁₂	В ₁	В ₆	В ₁₂	В ₁	В ₆	В ₁₂
Полиамид-6 / Polyamide-6	–	–	–	–	–	–	–	–	–
RP-18 / RP-18	0,07	0,24	0,04	7,1	1,4	1,7	9,8	49	40
Сорбфил / Sorbfil	0,08	0,76	0,49	12	1600	615	5,9	0,044	0,11
Сорбфил, ВТСХ / Sorbfil, HP TLC	0,14	0,74	0,44	41	2601	841	1,7	0,027	0,083

Выбор оптимальной ПФ

Водно-органические подвижные фазы

Согласно известным литературным данным для определения витаминов группы В часто используют метанол, бензол, хлороформ, гексан, этилацетат, н-бутанол и другие токсичные органические растворители. Известна работа [39], в которой применяют смеси ацетонитрила

и воды. Учитывая перспективность этих систем, отмеченную авторами [39], нами проведено их дальнейшее исследование.

Выбор оптимальной ПФ проводили при варьировании объема СН₃CN и Н₂O в отсутствие и присутствии буферного раствора. На рис. 3 представлены результаты эксперимента при использовании в качестве ПФ системы

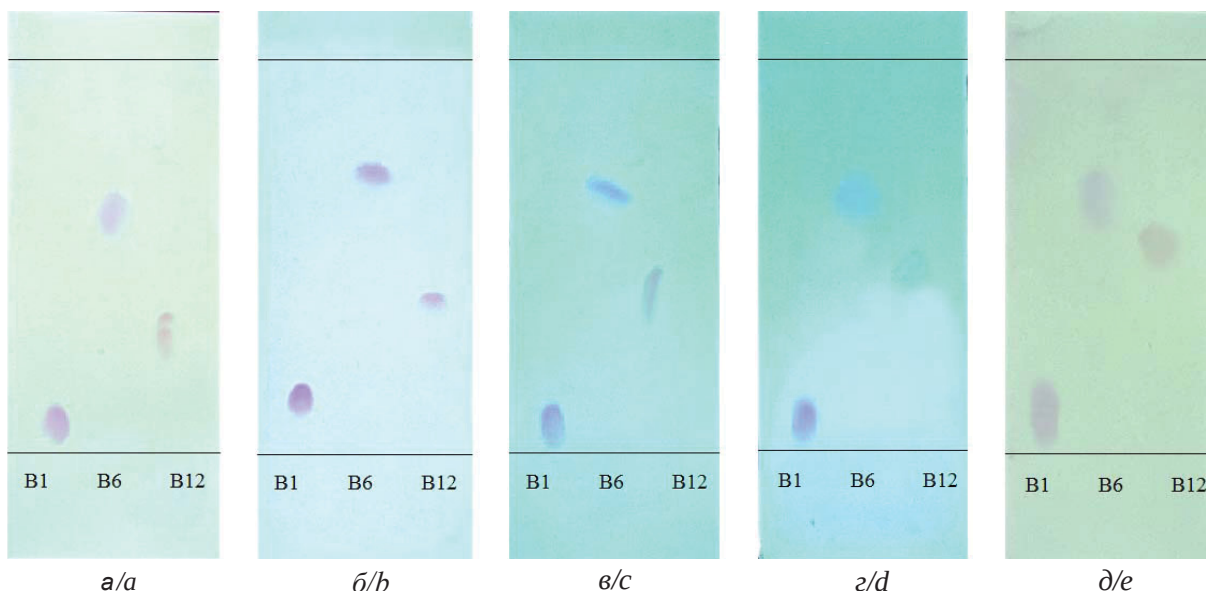


Рис. 3. Влияние соотношения СН₃CN – Н₂O в ПФ на хроматографические характеристики витаминов. НФ: Сорбфил (ПП), ВТСХ. C_R = 1·10⁻³ мг/мл. В₁ – тиамин, В₆ – пиридоксин, В₁₂ – цианокобаламин. ПФ: ацетонитрил – вода, а – 10:90, б – 15:85, в – 20:80, г – 30:70, д – 50:50

Fig. 3. Influence of the СН₃CN – Н₂O Ratio in MP on the chromatographic characteristics of vitamins. SP: Sorbfil (PP), HP TLC. C_R = 1·10⁻³ mg/ml. В₁ – thiamine, В₆ – pyridoxinum, В₁₂ – cyanocobalamin. MP: acetonitrile – water, a – 10:90, b – 15:85, c – 20:80, d – 30:70, e – 50:50



ацетонитрил – вода в следующих соотношениях компонентов: 10:90, 15:85, 20:80, 30:70, 50:50. На основании полученных результатов установлено, что вариант б на рис. 3 является оптимальным для дальнейшего модифицирования ПФ фос-

фатными буферами, лучший из которых при pH 3 представлен на рис. 4 и использовался далее. В табл. 2 приведено подтверждение этого выбора на основании расчета параметров эффективности разделения витаминов.

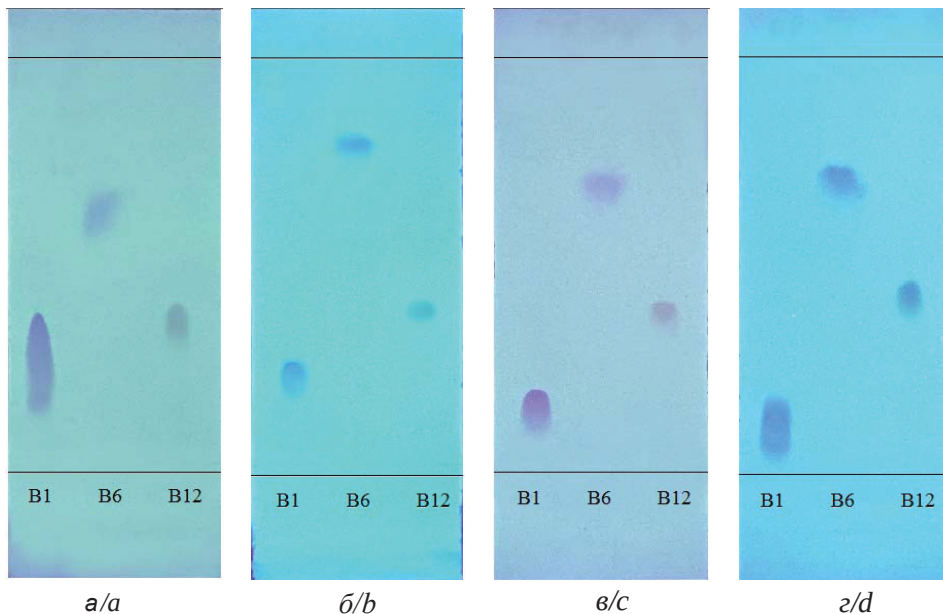


Рис. 4. Хроматограммы витаминов B_1 – тиамин, B_6 – пиридоксин, B_{12} – цианокобаламин в водно-органических ПФ, содержащих фосфатный буферный раствор. НП: Сорбфил (ПП), ВТСХ. $C_R = 1 \cdot 10^{-3}$ мг/мл. ПФ: CH_3CN – ФБ (15:85). а – 2; б – 3; в – 4; г – 5

Fig. 4. Chromatograms of vitamins B_1 – thiamine, B_6 – pyridoxinum, B_{12} – cyanocobalamin in aqueous organic MP containing phosphate buffer solution. SP: Sorbfil (PP), HP TLC. $C_R = 1 \cdot 10^{-3}$ mg/ml. MP: CH_3CN – PhB (15:85). а – 2; б – 3; в – 4; г – 5

Таблица 2 / Table 2

Хроматографические характеристики анализируемых систем (B_1 – тиамин, B_6 – пиридоксин, B_{12} – цианокобаламин) при различных значениях pH фосфатного буферного раствора. НП: Сорбфил, ВТСХ. $C_R = 1 \cdot 10^{-3}$ мг/мл. ПФ: ацетонитрил – ФБ (15:85) ($n = 3, P = 0,95$)

Chromatographic characteristics of the analyzed systems in various (B_1 – thiamine, B_6 – pyridoxinum, B_{12} – cyanocobalamin) MP. SP: Sorbfil, HP TLC. $C_R = 1 \cdot 10^{-3}$ mg/ml MP: acetonitrile – PhB (15:85) ($n = 3, P = 0,95$)

pH ФБ / pH PhB	$\overline{R_f}$			N			H, мм / H, mm		
	B_1	B_6	B_{12}	B_1	B_6	B_{12}	B_1	B_6	B_{12}
2	0,26	0,64	0,37	4,9	549	173	14	0,13	0,40
3	0,24	0,83	0,42	87	2916	1393	0,80	0,024	0,050
4	0,16	0,73	0,40	9,1	1474	625	7,7	0,047	0,11
5	0,12	0,72	0,44	2,3	1218	324	31	0,058	0,22

Мицеллярные подвижные фазы

Особенность мицеллярных растворов в том, что в гомогенной водной или неводной среде гидрофильные молекулы ПАВ при определенной концентрации (критической концентрации мицеллообразования (ККМ) спонтанно образуют наноразмерные (радиусом 1,5–3 нм) динамич-

еские дисперсные агрегаты, состоящие из нескольких десятков ионов или молекул ПАВ, которые называют мицеллами [41]. Главная особенность мицелл заключается в том, что среда внутри мицелл противоположна по полярности воде (основному растворителю подвижной фазы), что позволяет в мицеллярном растворе



растворять как полярные (в водной макрофазе), так и неполярные (в наноразмерных мицеллах) вещества. Таким образом, в хроматографической системе разделяемые соединения участвуют не только в равновесии «неподвижная фаза – подвижная фаза», но и в дополнительном равновесии «растворитель – мицелла» внутри самой подвижной фазы, которое влияет на селективность хроматографического разделения. Жидкостную хроматографию (ЖХ), основанную на применении в качестве подвижных фаз мицеллярных растворов ПАВ сначала называли псевдофазной ЖХ [42, 43], а затем мицеллярной ЖХ (МЖХ) [44, 45], а подвижные фазы, содержащие мицеллы ПАВ – мицеллярными подвижными фазами (МПФ) [41, 46–48].

Ранее для витаминов в работе [34] было показано, что МПФ улучшают хроматографические характеристики анализируемых веществ. Однако системного определения в этом случае не проводилось.

При выборе оптимального состава МПФ использовали хлорид цетилпиридиния в интервале $5 \cdot 10^{-4}$ – $5 \cdot 10^{-1}$ М и додецилсульфат натрия в интервале $2,5 \cdot 10^{-4}$ – $2,5 \cdot 10^{-1}$ М на высокоэффективных пластинах Сорбфил (ПП).

Установлено, что лучшие хроматографические характеристики витаминов получены для систем ЦПХ – CH_3CN при концентрации кПАВ $5 \cdot 10^{-4}$ М и соотношении ЦПХ – CH_3CN = 85:15 (об. %), найденные значения R_f , N и H представлены в табл. 3.

Таблица 3 / Table 3

Хроматографические характеристики анализируемых систем (B_1 – тиамин, B_6 – пиридоксин, B_{12} – цианокобаламин) в ПФ: ацетонитрил (15 об. %) – ПАВ. НПФ: Сорбфил, ВТСХ. $C_R = 1 \cdot 10^{-3}$ мг/мл ($n = 3, P = 0,95$)
Chromatographic characteristics of the analyzed systems (B_1 – thiamine, B_6 – pyridoxinum, B_{12} – cyanocobalamin) in various MP: acetonitrile (15 об. %) – surfactants. SP: Sorbfil, HP TLC. $C_R = 1 \cdot 10^{-3}$ mg/ml ($n = 3, P = 0,95$)

ПАВ Surfactant	$\overline{R_f}$			N			H, мм / H, mm		
	B_1	B_6	B_{12}	B_1	B_6	B_{12}	B_1	B_6	B_{12}
ЦПХ ($5 \cdot 10^{-4}$ М) СРС ($5 \cdot 10^{-4}$ М)	0,11	0,86	0,50	25	2657	1521	2,8	0,026	0,046
ДДСNa ($5 \cdot 10^{-3}$ М) ДДСNa ($5 \cdot 10^{-3}$ М)	0,14	0,77	0,49	28	1798	484	2,5	0,039	0,140

Исходя из результатов определения был проведен анализ смеси витаминов при их соотношении 1:1:1 в анализируемой системе (табл. 4) и проведено сравнительное определение B_1 , B_6 , B_{12} в лучших водно-органических и МПФ при анализе препаратов «Комбилипен»,

«Пентовит» и «Эллигамин». S_r изменяется в диапазоне 0,01–0,06 (рис. 5). Правильность определения установлена методом стандартной добавки. Содержание цианокобаламина (B_{12}) не найдено, так как лежит за пределами чувствительности метода ТСХ.

Таблица 4 / Table 4

Селективность разделения витаминов (B_1 – тиамин, B_6 – пиридоксин, B_{12} – цианокобаламин) в различных ПФ. НПФ: Сорбфил, ВТСХ. $C_R = 1 \cdot 10^{-3}$ мг/мл ($n = 3, P = 0,95$)

Selectivity of separation of vitamins (B_1 – thiamine, B_6 – pyridoxinum, B_{12} – cyanocobalamin) in different MP. SP: Sorbfil, HP TLC. $C_R = 1 \cdot 10^{-3}$ mg/ml ($n = 3, P = 0,95$)

ПФ / MP	Исследуемые вещества Test substances	R_s	α
CH_3CN – вода (15:85) CH_3CN – water (15:85)	B_1+B_6	1,26	0,04
	B_1+B_{12}	1,01	0,24
	$B_{12}+B_6$	1,52	0,18
CH_3CN – ФБ (15:85) (рН 3) CH_3CN – PhB (15:85) (рН 3)	B_1+B_6	1,40	0,07
	B_1+B_{12}	1,18	0,36
	$B_{12}+B_6$	1,60	0,19
CH_3CN (15 об.%) – ЦПХ ($5 \cdot 10^{-4}$ М) CH_3CN (15 vol. %) – СРС ($5 \cdot 10^{-4}$ М)	B_1+B_6	1,22	0,02
	B_1+B_{12}	0,99	0,11
	$B_{12}+B_6$	1,60	0,20

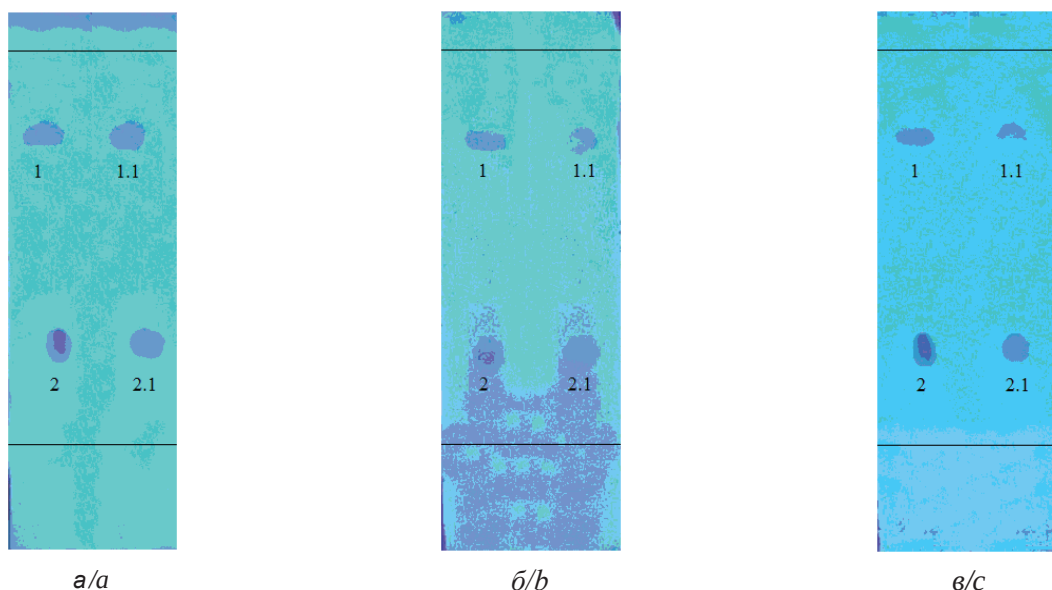


Рис. 5. Хроматограммы витаминов в исследуемых объектах: а – «Комбилипен», б – «Пентовит», в – «Эллигамин»; 1 – пиридоксин (витамин В₆), 2 – тиамин (витамин В₁), 1.1 – стандартное вещество В₆, 2.1 – стандартное вещество В₁. ПФ: ацетонитрил (15 об.%) – ЦПХ (5·10⁻⁴ М). НФ: Сорбфил, ВТСХ
 Fig. 5. Chromatograms of vitamins in the studied objects: а – “Combilipen”, б – “Pentovit”, с – “Elligamine”. 1 – pyridoxinum (vitamin В₆), 2 – thiamine (vitamin В₁), 1.1 – standard substance В₆, 2.1 – standard substance В₁. MP: acetonitrile (15 об. %) – CPC (5·10⁻⁴ М). SP: Sorbfil, HP TLC

Расчет разрешения R_s в исследуемых системах свидетельствует о практически полном разделении витаминов.

Заключение

Методом ТСХ изучены хроматографические характеристики тиамина, пиридоксина и цианокобаламина в водно-органических и мицеллярных подвижных фазах при варьировании содержания органического растворителя, pH подвижной фазы и концентрации ПАВ. Установлено, что введение фосфатного буферного раствора в оба типа подвижных фаз улучшает хроматографические характеристики исследуемых витаминов. Эффективность и селективность разделения витаминов лучше в мицеллярных подвижных фазах.

Проведенные исследования использованы для определения пиридоксина и тиамина в фармацевтических препаратах «Комбилипен», «Пентовит» и «Эллигамин», со значениями S_r 0,01–0,06. Разработанный метод ТСХ с мицеллярными подвижными фазами практически исключает применение летучих, канцерогенных, высокотоксичных растворителей и не уступает по эффективности органическим элюентам, а разработанные в работе подходы позволяют решать основные задачи зеленой химии.

Список литературы

1. Иванова Г. Е., Шмонин А. А., Мальцева М. Н., Мишина И. Е., Мельникова Е. В., Бодрова Р. А., Цыкунов М. Б., Бахтина И. С., Калинина С. А., Баландина И. Н., Соловьёва Л. Н., Иванова Н. Е., Суворов А. Ю., Дидур М. Д. Реабилитационная помощь в период эпидемии новой коронавирусной инфекции COVID-19 на первом, втором и третьем этапах медицинской реабилитации // Физическая и реабилитационная медицина, медицинская реабилитация. 2020. Т. 2, № 2. С. 98–117. <https://doi.org/10.36425/rehab34148>
2. Щербак Д. Д., Ахмедов В. А. Тактика реабилитации пациентов с неврологическими осложнениями COVID-19 // Медицинский оппонент. 2022. Т. 4, № 20. С. 72–75.
3. Белобородова Н. В., Гречко А. В., Зурабов А. Ю., Зурабов Ф. М., Кузовлев А. Н., Петрова М. В., Черневская Е. А., Яковлев А. А. Перспективы применения технологии адаптивной фаготерапии в реабилитации пациентов, перенесших новую коронавирусную инфекцию // Физическая и реабилитационная медицина, медицинская реабилитация. 2021. Т. 3, № 3. С. 254–259. <https://doi.org/10.36425/rehab80658>
4. Строчков И. А., Ахмеджанова Л. Т., Солоха О. А. Витамины группы В в лечении неврологических заболеваний // Российский медицинский журнал. 2009. Т. 17, № 11. С. 776–783.
5. Чугунов А. В., Казаков К. А., Казаков А. Ю. Применение нейротропных витаминов при лечении



- пациентов с различными поражениями периферической нервной системы // РМЖ. Медицинское обозрение. 2020. Т. 4, № 9. С. 606–611. <https://doi.org/10.32364/2587-6821-2020-4-9-606-611>
6. Morava E. Guidelines on homocystinurias and methylation defects: A harmonized approach to diagnosis and management // J. Inherit. Metab. Dis. 2017. Vol. 40, № 1. P. 1–2. <https://doi.org/10.1007/s10545-016-9998-x>
 7. Филимонов В. Н., Сирицо С. И., Макрушин Н. А. Особенности хроматографического разделения водорастворимых витаминов в изократической ОФ ВЭЖХ // Сорбционные и хроматографические процессы. 2006. Т. 6, № 2. С. 191–198.
 8. Буланова А. В., Полякова Ю. Л. Хроматография в медицине и биологии. Самара : Изд-во Самарского университета, 2006. 105 с.
 9. Pérez-Cejuela H. M., Mon M., Ferrando-Soria J., Pardo E., Armentano D., Simo-Alfonso E. F., Herrero-Martínez J. M. Bio-metal-organic frameworks for molecular recognition and sorbent extraction of hydrophilic vitamins followed by their determination using HPLC-UV // Microchim. Acta. 2020. Vol. 187, № 201. <https://doi.org/10.1007/s00604-020-4185-z>
 10. Бендрышев А. А., Пашкова Е. Б., Пирогов А. В., Шпунгун О. А. Определение водорастворимых витаминов в витаминных премиксах, биологически активных добавках и фармацевтических препаратах методом высоко эффективной жидкостной хроматографии с градиентным элюированием // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. 2010. Т. 51, № 4. С. 315–324.
 11. Yuan Zhang, Wei-e Zhou, Jia-qing Yan, Min Liu, Yu Zhou, Xin Shen, Ying-lin Ma, Xue-song Feng, Jun Yang, Guo-hui Li. A review of the extraction and determination methods of thirteen essential vitamins to the human body: An update from 2010 // Molecules. 2018. Vol. 23, № 6. P. 1484–1508. <https://doi.org/10.3390/molecules23061484>
 12. Chamkouri N. SPE-HPLC-UV for simultaneous determination of vitamins B group concentrations in *Suaeda vermiculata* // Technical Journal of Engineering and Applied Sciences. 2014. Vol. 4, № 4. P. 439–443.
 13. Chamkouri N. HPLC DAD determination of some vitamins b group concentrations in *Suaeda aegyptiaca* // Advances in Environmental Biology. 2014. Vol. 8, № 13. P. 911–915.
 14. Berton P., Monasterio R. P., Wuilloud R. G. Selective extraction and determination of vitamin B12 in urine by ionic liquid-based aqueous two-phase system prior to high-performance liquid chromatography // Talanta. 2012. Vol. 15, № 97. P. 521–526. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.05.008>
 15. Hasan M., Akhtaruzzaman M., Sultan M. Estimation of vitamins B-complex (B₂, B₃, B₅ and B₆) of Some Leafy Vegetables Indigenous to Bangladesh by HPLC Method // Journal of Analytical Sciences, Methods and Instrumentation. 2013. Vol. 3, № 3A. P. 24–29. <https://doi.org/10.4236/jasmi.2013.33A004>
 16. Leacock R. E., Stankus J. J., Davis J. M. Simultaneous determination of caffeine and vitamin B6 in energy drinks by high-performance liquid chromatography (HPLC) // J. Chem. Educ. 2011. Vol. 88, № 2. P. 232–234. <https://doi.org/10.1021/ed100146s>
 17. Руденко А. О., Карцова Л. А. Определение водорастворимых витаминов группы В и витамина С в комбикормах, премиксах и биологически-активных добавках методом обращенно-фазовой ВЭЖХ // Журн. аналит. химии. 2010. Т. 65, № 1. С. 73–78.
 18. Moreno P., Salvado V. Determination of eight water- and fat-soluble vitamins in multi-vitamin pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography // J. Chromatogr. A. 2000. Vol. 870, № 18. P. 207–215. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)01021-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)01021-3)
 19. Markopoulou C. K., Kagkadis K. A., Koundourellis J. E. An optimized method for the simultaneous determination of vitamins B1, B6, B12 in multivitamin tablets by high performance liquid chromatography // J. Pharm. Biomed. Anal. 2022. Vol. 30, № 4. P. 1403–1410. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(02\)00456-9](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(02)00456-9)
 20. Perveen S., Yasmina A., Khan M. Kh. Quantitative simultaneous estimation of water soluble vitamins, riboflavin, pyridoxine, cyanocobalamin and folic acid in nutraceutical products by HPLC // The Open Analytical Chemistry Journal. 2009. № 3. P. 1–5. <https://doi.org/10.2174/1874065000903010001>
 21. Гармонов С. Ю., Салахов И. А., Нурисламова Г. Р., Исмаилова Р. Н., Иртуганова Э. А., Сопин В. Ф. Определение аскорбиновой кислоты, тиамина, рибофлавина, никотинамида и пиридоксина в лекарственном препарате «Гексавит» методом ВЭЖХ // Химико-фармацевтический журнал. 2011. Т. 45, № 7. С. 48–51.
 22. Жижин Н. А. Определение витамина В12 в сухих смесях для детского питания методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с хроматомасс-спектрометрическим детектированием // Аграрная наука. 2022. № 5. С. 132–136. <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2022-359-5-132-136>
 23. Santos J., Mendiola J. A., Oliveira M. B., Ibáñez E., Herrero M. Sequential determination of fat- and water-soluble vitamins in green leafy vegetables during storage // J. Chromatogr. A. 2012. Vol. 1261. P. 179–188. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.04.067>
 24. Harner M. J., Mueller L., Robbins K. J., Reily M. D. NMR in drug design // Arch. Biochem. Biophys. 2017. Vol. 628. P. 132–147. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2017.06.005>
 25. Medek A., Frydman L. A Multinuclear solid-state nmr analysis of vitamin B₁₂ in its different polymorphic forms // J. Am. Chem. Soc. 2000. Vol. 122, № 4. P. 684–691. <https://doi.org/10.1021/ja992939u>
 26. Барыкин Н. В., Черданцева Е. В., Матерн А. И. Количественное определение витаминов группы В при совместном присутствии методом молекулярной спектроскопии в УФ и видимой областях // Бутлеровские сообщения. 2012. Т. 31, № 7. С. 33–37.
 27. Xiao X., Hou Y., Du J., Sun D., Bai G., Luo G. Determination of vitamins B2, B3, B6 and B7 in corn steep liquor



- by NIR and PLSR // *Trans. Tianjin Univ.* 2012. Vol. 18. P. 372–377. <https://doi.org/10.1007/s12209-012-1932-1>
28. Стурова И. В., Комарова Н. В., Страшила Н. Ю., Калач А. В. Определение витамина В1 в растительных премиксах методами зонного капиллярного электрофореза и флуориметрии // *Химия растительного сырья*. 2007. №4. С. 121–122.
 29. Морзунова Т. Г. Капиллярный электрофорез в фармацевтическом анализе (обзор) // *Химико-фармацевтический журнал*. 2006. Т. 40, № 3. С. 39–52.
 30. Da Silva D. C., Visentainer J. V., de Souza N. E., Oliveira C. C. Micellar electrokinetic chromatography method for determination of the ten water-soluble vitamins in food supplements // *Food Anal. Methods*. 2013. Vol. 6. P. 1592–1606. <https://doi.org/10.1007/s12161-013-9576-x>
 31. Yin C., Cao Y., Ding S., Wang Y. Rapid determination of water- and fat-soluble vitamins with microemulsion electrokinetic chromatography. // *J. Chromatogr. A*. 2008. Vol. 1193. P. 172–177. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.04.016>
 32. Aurora-Prado M. S., Silva C. A., Tavares M. F. M., Altria K. D. Rapid determination of water-soluble and fat-soluble vitamins in commercial formulations by МЕЕКС // *Chromatographia*. 2010. Vol. 72. P. 687–694. <https://doi.org/10.1365/s10337-010-1704-9>
 33. Liu Q., Jia L., Hu C. On-Line concentration methods for analysis of fat-soluble vitamins by MEKC // *Chromatographia*. 2010. Vol. 72. P. 95–100. <https://doi.org/10.1365/s10337-010-1608-8>
 34. Карцова Л. А., Королева О. А. Совместное определение водо- и жирорастворимых витаминов методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии с использованием водно-мицеллярной подвижной фазы // *Журн. аналит. химии*. 2007. Т. 62, № 3. С. 281–286.
 35. Panahi H. A., Kalal H. S., Rahimi A., Moniri E. Isolation and quantitative analysis of B₁, B₂, B₆ and B₁₂ vitamins using high-performance thin-layer chromatography // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2011. Vol. 45, № 2. P. 125–129. <https://doi.org/10.1007/s11094-011-0574-2>
 36. Cimpoiu C., Casoni D., Hosu A., Miclaus V., Hodisan T., Damian G. Separation and identification of eight hydrophilic vitamins using a new TLC method and raman spectroscopy // *J. of Liquid Chromatography and Related Technologies*. 2005. Vol. 28, № 16. P. 2561–2569. <https://doi.org/10.1080/10826070500189737>
 37. Elzanfaly E. S., Nebsen M., Ramadan N. K. Development and validation of PCR, PLS, and TLC densitometric methods for the simultaneous determination of vitamins B(1), B(6) and B(12) in pharmaceutical formulations // *Pak. J. Pharm. Sci.* 2010. Vol. 23, № 4. P. 409–415.
 38. ОФС.1.3.0003.15 Буферные растворы // Государственная фармакопея Российской Федерации. 13-е изд., 2015.
 39. Карцова Л. А., Хмельницкий И. К., Печенко Т. В., Алексеева А. В., Березкин В. Г. Одновременное определение водо- и жирорастворимых витаминов в различных режимах высокоэффективной тонкослойной хроматографии // Сорбционные и хроматографические процессы. 2007. Т. 7, вып. 6. С. 909–917.
 40. Сумина Е. Г., Штыков С. Н., Тюрина Н. В. Тонкослойная хроматография. Теоретические основы и практическое применение: учебное пособие для студентов, обучающихся по специальности 011000 «Химия». Саратов: Изд-во Сарат. ун-та, 2006. 110 с.
 41. Савин С. Б., Чернова Р. К., Штыков С. Н. Поверхностно-активные вещества. Аналитические реагенты. М.: Наука, 1991. 251 с.
 42. Armstrong D. W., Terril R. Q. Thin layer chromatography separation of pesticides, decachlorobiphenyl and nucleosides with micellar solution // *Anal. Chem.* 1979. Vol. 51, № 13. P. 2160–2164. <https://doi.org/10.1021/ac50049a025>
 43. Armstrong D. W., McNeely M. Use of micelles in the TLC separation of polynuclear aromatic compounds and amino acids // *Analytical Letters*. 1979. Vol. 12, № 12. P. 1285–1291. <https://doi.org/10.1080/00032717908067919>
 44. Armstrong D. W., Bui K. H., Barry R. M. Use of pseudo-phase TLC in teaching laboratories // *Journal of Chemical Education*. 1984. Vol. 61, № 5. P. 457. <https://doi.org/10.1021/ed061p457>
 45. Штыков С. Н. Химический анализ в нанореакторах: основные понятия и применение // *Журн. аналит. химии*. 2002. Т. 57, № 10. С. 1018–1028.
 46. Pramauro E., Pelizzetti E. Surfactants in Analytical Chemistry. Application of Organized Amphiphilic Media. Elsevier, 1996. 521 p.
 47. Сумина Е. Г., Штыков С. Н., Тюрина Н. В. Поверхностно-активные вещества в тонкослойной хроматографии // *Журн. аналит. химии*. 2003. Т. 58, № 8. С. 808–818. <https://doi.org/10.1023/A:102527409149>
 48. Штыков С. Н., Сумина Е. Г., Тюрина Н. В. Расчет коэффициентов межфазного распределения органических реагентов в мицеллярной ТСХ // *Журн. аналит. химии*. 2002. Т. 57, № 4. С. 383–387. <https://doi.org/10.1023/A:1014950314681>

References

1. Ivanova G. E., Shmonin A. A., Maltseva M. N., Mishina I. E., Mel'nikova E. V., Bodrova R. A., Tsykunov M. B., Bakhtina I. S., Kalinina S. A., Balandina I. N., Solov'eva L. N., Ivanova N. E., Suvorov A. Yu., Didur M. D. Rehabilitation care during the new COVID-19 coronavirus infection epidemic at first, second and third medical rehabilitation phases. *Physical and Rehabilitation Medicine, Medical Rehabilitation*, 2020, vol. 2, no. 2, pp. 98–117 (in Russian). <https://doi.org/10.36425/rehab34148>
2. Shcherbakova D. D., Akhmedov V. A. Rehabilitation patients with neurological complications of COVID-19. *Medical Opponent*, 2022, vol. 4, no. 20, pp. 72–75 (in Russian).
3. Beloborodova N. V., Grechko A. V., Zurabov A. Yu., Zurabov F. M., Kuzovlev A. N., Petrova M. V., Chernevskaya E. A., Yakovlev A. A. Prospects of using adaptive phage therapy in the rehabilitation of post-COVID-19



- patients. *Physical and Rehabilitation Medicine, Medical Rehabilitation*, 2021, vol. 3, no. 3, pp. 254–259 (in Russian). <https://doi.org/10.36425/rehab80658>
4. Stokov I. A., Ahmedganova L. T., Soloha O. A. Group B vitamins in the treatment of neurological diseases. *Medical Journal of the Russian Federation*, 2009, vol. 17, no. 11, pp. 776–783 (in Russian).
 5. Chugunov A. V., Kazakov K. A., Kazakov A. Yu. Neurotropic vitamins use in the patient management with various lesions of the peripheral nervous system. *Russian Medical Inquiry*, 2020, vol. 4, no. 9, pp. 606–611 (in Russian). <https://doi.org/10.32364/2587-6821-2020-4-9-606-611>
 6. Morava E. Guidelines on homocystinurias and methylation defects: A harmonized approach to diagnosis and management. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 2017, vol. 40, no. 1, pp. 1–2. <https://doi.org/10.1007/s10545-016-9998-x>
 7. Filimonov V. N., Siritso S. I., Makrushin N.A. Peculiarities of chromatographic separation of water-soluble vitamins in isocratic RP HPLC. *Sorption and Chromatographic Processes*, 2006, vol. 6, no. 2, pp. 191–198 (in Russian).
 8. Bulanova A. V., Polyakova Yu. L. *Khromatografiya v meditsine i biologii* [Chromatography in Medicine and Biology]. Samara, Izdatel'stvo Samarskogo universiteta, 2006. 105 p. (in Russian).
 9. Pérez-Cejuela H. M., Mon M., Ferrando-Soria J., Pardo E., Armentato D., Simo-Alfonso E. F., Herrero-Martinez J. M. Bio-metal-organic frameworks for molecular recognition and sorbent extraction of hydrophilic vitamins followed by their determination using HPLC-UV. *Microchim. Acta*, 2020, vol. 187, no. 201. <https://doi.org/10.1007/s00604-020-4185-z>
 10. Bendryshev A. A., Pashkova E. B., Pirogov A. V., Shpigun O. A. Determination of water soluble vitamins in vitamin premixes, biologically active dietary supplements and pharmaceutical preparation by hplc with gradient elution. *Moscow University Chemistry Bulletin*, 2010, vol. 65, no. 4, pp. 260–268 (in Russian).
 11. Yuan Zhang, Wei-e Zhou, Jia-qing Yan, Min Liu, Yu Zhou, Xin Shen, Ying-lin Ma, Xue-song Feng, Jun Yang, Guo-hui Li. A review of the extraction and determination methods of thirteen essential vitamins to the human body: An update from 2010. *Molecules*, 2018, vol. 23, no. 6, pp. 1484–1508. <https://doi.org/10.3390/molecules23061484>
 12. Chamkouri N. SPE-HPLC-UV for simultaneous determination of vitamins B group concentrations in *Suaeda vermiculata*. *Technical Journal of Engineering and Applied Sciences*, 2014, vol. 4, no. 4, pp. 439–443.
 13. Chamkouri N. HPLC DAD determination of some vitamins B group concentrations in *Suaeda aegyptiaca*. *Advances in Environmental Biology*, 2014, vol. 8, no. 13, pp. 911–915.
 14. Berton P., Monasterio R.P., Wuilloud R.G. Selective extraction and determination of vitamin B12 in urine by ionic liquid-based aqueous two-phase system prior to high-performance liquid chromatography. *Talanta*, 2012, vol. 15, no. 97, pp. 521–526. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.05.008>
 15. Hasan M., Akhtaruzzaman M., Sultan M. Estimation of vitamins B-complex (B₂, B₃, B₅ and B₆) of some leafy vegetables indigenous to bangladesh by HPLC Method. *Journal of Analytical Sciences, Methods and Instrumentation*, 2013, vol. 3, no. 3A, pp. 24–29. <https://doi.org/10.4236/jasmi.2013.33A004>
 16. Leacock R. E., Stankus J. J., Davis J. M. Simultaneous determination of caffeine and vitamin B6 in energy drinks by high-performance liquid chromatography (HPLC). *J. Chem. Educ.*, 2011, vol. 88, no. 2, pp. 232–234. <https://doi.org/10.1021/ed100146s>
 17. Rudenko A. O., Kartsova L. A. Determination of water-soluble vitamin B and vitamin C in combined feed, premixes, and biologically active supplements by reversed-phase HPLC. *J. Anal. Chem.*, 2010, vol. 65, no. 1, pp. 71–76 (in Russian). <https://doi.org/10.1134/S1061934810010132>
 18. Moreno P., Salvado V. Determination of eight water- and fat-soluble vitamins in multi-vitamin pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 2000, vol. 870, no. 18, pp. 207–215. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(99\)01021-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(99)01021-3)
 19. Markopoulou C. K., Kagkadis K. A., Koundourellis J. E. An optimized method for the simultaneous determination of vitamins B1, B6, B12 in multivitamin tablets by high performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2022, vol. 30, no. 4, pp. 1403–1410. [https://doi.org/10.1016/s0731-7085\(02\)00456-9](https://doi.org/10.1016/s0731-7085(02)00456-9)
 20. Perveen S., Yasmina A., Khan M. Kh. Quantitative simultaneous estimation of water soluble vitamins, riboflavin, pyridoxine, cyanocobalamin and folic acid in nutraceutical products by HPLC. *The Open Analytical Chemistry Journal*, 2009, no. 3, pp. 1–5. <https://doi.org/10.2174/1874065000903010001>
 21. Garmonov S. Yu., Salakhov I. A., Nurislamova G. R., Ismailova R. N., Irtuganova E. A., Sopin V. F. Assay of ascorbic acid, thiamine, riboflavin, nicotinamide, and pyridoxine in «Hexavit» by HPLC. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2011, vol. 45, no. 7, pp. 440–443 (in Russian).
 22. Zhizhin N. A. Determination of vitamin B₁₂ in dry mixtures for baby food by the method of high performance liquid chromatography with chromatomass-spectrometric detection. *Agrarian Science*, 2022, no. 5, pp. 132–136 (in Russian). <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2022-359-5-132-136>
 23. Santos J., Mendiola J. A., Oliveira M. B., Ibáñez E., Herrero M. Sequential determination of fat- and water-soluble vitamins in green leafy vegetables during storage. *J. Chromatogr. A*, 2012, vol. 1261, pp. 179–188. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.04.067>
 24. Harner M. J., Mueller L., Robbins, K. J., Reily M. D. NMR in drug design. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2017, vol. 628, pp. 132–147. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2017.06.005>
 25. Medek A., Frydman L. A multinuclear solid-state NMR analysis of vitamin B₁₂ in its different polymorphic forms. *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, vol. 122, no. 4, pp. 684–691. <https://doi.org/10.1021/ja992939u>



26. Barykin N. V., Cherdantseva E. V., Matern A. I. Quantitative determination of B vitamins in the presence of molecular spectroscopy in the UV and visible regions. *Butlerov Communications*, 2012, vol. 31, no. 7, pp. 33–37 (in Russian).
27. Xiao X., Hou Y., Du J., Sun D., Bai G., Luo G. Determination of vitamins B2, B3, B6 and B7 in corn steep liquor by NIR and PLSR. *Trans. Tianjin Univ.*, 2012, vol. 18, pp. 372–377. <https://doi.org/10.1007/s12209-012-1932-1>
28. Sturova I. V., Komarova N. V., Strashilina N. Yu., Kalach A. V. Determination of vitamin B1 in vegetable premixes by zone capillary electrophoresis and fluorimetry. *Chemistry of Plant Raw Materials*, 2007, no. 4, pp. 121–122 (in Russian).
29. Morzunova T. G. Capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis (a review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2006, vol. 40, no. 3, pp. 158–170 (in Russian).
30. Da Silva D. C., Visentainer J. V., de Souza N. E., Oliveira C. C. Micellar electrokinetic chromatography method for determination of the ten water-soluble vitamins in food supplements. *Food Anal. Methods*, 2013, vol. 6, pp. 1592–1606. <https://doi.org/10.1007/s12161-013-9576-x>
31. Yin C., Cao Y., Ding S., Wang Y. Rapid determination of water- and fat-soluble vitamins with microemulsion electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr. A*, 2008, vol. 1193, pp. 172–177. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.04.016>
32. Aurora-Prado M. S., Silva C. A., Tavares M. F. M., Altria K. D. Rapid determination of water-soluble and fat-soluble vitamins in commercial formulations by MEEKC. *Chromatographia*, 2010, vol. 72, pp. 687–694. <https://doi.org/10.1365/s10337-010-1704-9>
33. Liu Q., Jia L., Hu C. On-Line concentration methods for analysis of fat-soluble vitamins by MEKC. *Chromatographia*, 2010, vol. 72, pp. 95–100. <https://doi.org/10.1365/s10337-010-1608-8>
34. Kartsova L. A., Koroleva O. A. Simultaneous determination of water- and fat-soluble vitamins by high-performance thin-layer chromatography using an aqueous micellar mobile phase. *J. Anal. Chem.*, 2007, vol. 62, no. 3, pp. 255–259 (in Russian).
35. Panahi H. A., Kalal H. S., Rahimi A., Moniri E. Isolation and quantitative analysis of B₁, B₂, B₆ and B₁₂ vitamins using high-performance thin-layer chromatography. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2011, vol. 45, no. 2, pp. 125–129. <https://doi.org/10.1007/s11094-011-0574-2>
36. Cimpoiu C., Casoni D., Hosu A., Miclaus V., Hodisan T., Damian G. Separation and identification of eight hydrophilic vitamins using a new TLC method and raman spectroscopy. *J. Liquid Chromatography and Related Technologies*, 2005, vol. 28, no. 16, pp. 2561–2569. <https://doi.org/10.1080/10826070500189737>
37. Elzanfaly E. S., Nebsen M., Ramadan N. K. Development and validation of PCR, PLS, and TLC densitometric methods for the simultaneous determination of vitamins B(1), B(6) and B(12) in pharmaceutical formulations. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 2010, vol. 23, no. 4, pp. 409–415.
38. OFS.1.3.0003.15 Buffer solutions. In: *State Pharmacopoeia of the Russian Federation*. 13th edition, 2015 (in Russian).
39. Kartsova L. A., Khmel'nitsky I. K., Pechenko T. V., Alekseeva A. V., Berezkin V. G. Simultaneous determination of water- and fat-soluble vitamins in different modes of high-performance thin-layer chromatography. *Sorption and Chromatographic Processes*, 2007, vol. 7, iss. 6, pp. 909–917 (in Russian).
40. Sumina E. G., Shtykov S. N., Tyurina N. V. *Tonkosloynaya khromatografiya. Teoreticheskiye osnovy i prakticheskoye primeneniye: uchebnoye posobiye dlya studentov, obuchayushchikhsya po spetsial'nosti 011000 «Khimiya»* [Thin layer chromatography. Theoretical foundations and practical application: A textbook for students studying in the specialty 011000 “Chemistry”]. Saratov, Saratov State University Publ., 2006. 110 p. (in Russian).
41. Savin S. B., Chernova R. K., Shtykov S. N. *Poverkhnostno-aktivnyye veshchestva. Analiticheskiye reagenty* [Surfactants. Analytical reagents]. Moscow, Nauka, 1991. 250 p. (in Russian).
42. Armstrong D. W., Terril R. Q. Thin layer chromatography separation of pesticides, Decachlorobiphenyl and nucleosides with micellar solution. *J. Anal. Chem.*, 1979, vol. 51, no. 13, pp. 2160–2164. <https://doi.org/10.1021/ac50049a025>
43. Armstrong D. W., McNeely M. Use of micelles in the TLC separation of polynuclear aromatic compounds and amino acids. *Analytical Letters*, 1979, vol. 12, no. 12, pp. 1285–1291. <https://doi.org/10.1080/00032717908067919>
44. Armstrong D. W., Bui K. H., Barry R. M. Use of pseudophase TLC in teaching laboratories. *Journal of Chemical Education*, 1984, vol. 61, no. 5, pp. 457. <https://doi.org/10.1021/ed061p457>
45. Shtykov S. N. Chemical analysis in nanoreactors: Main concepts and applications. *J. Anal. Chem.*, 2002, vol. 57, no. 10, pp. 859–868 (in Russian).
46. Pramauro E., Pelizzetti E. *Surfactants in Analytical Chemistry. Application of Organized Amphiphilic Media*. Elsevier, 1996. 521 p.
47. Sumina E. G., Shtykov S. N., Tyurina N. V. Surfactants in thin layer chromatography. *J. Anal. Chem.*, 2003, vol. 58, no. 8, pp. 720–730 (in Russian). <https://doi.org/10.1023/A:102527409149>
48. Shtykov S. N., Sumina E. G., Tyurina N. V. Calculation of partition coefficients of organic reagents in micellar thin-layer chromatography. *J. Anal. Chem.*, 2002, vol. 57, no. 4, pp. 322–325 (in Russian). <https://doi.org/10.1023/A:1014950314681>

Поступила в редакцию 16.06.2023; одобрена после рецензирования 29.06.2023; принята к публикации 30.06.2023
 The article was submitted 16.06.2023; approved after reviewing 29.06.2023; accepted for publication 30.06.2023



Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 4. С. 382–391

Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology, 2023, vol. 23, iss. 4, pp. 382–391

<https://ichbe.sgu.ru>

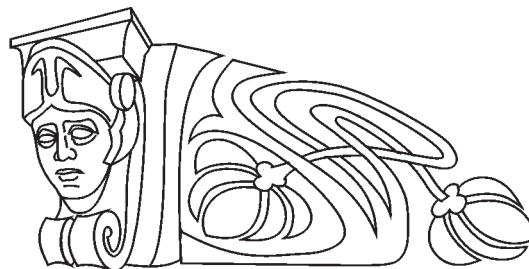
<https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-4-382-391>, EDN: DYDGWL

Научная статья

УДК 544.45.454.542.943-92

Инактивация ксенобиотиков: некоторых азокрасителей, нитропроизводных фенола и тетрациклинов

М. Н. Устинова ✉, К. А. Золотухина



Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Россия, 308015, г. Белгород, ул. Победы, д. 85

Устинова Мария Николаевна, кандидат химических наук, доцент кафедры общей химии Института фармации, химии и биологии, ustinova@bsu.edu.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5739-5339>

Золотухина Ксения Андреевна, студент Института фармации, химии и биологии, 1389050@bsu.edu.ru

Аннотация. Проблема загрязнения окружающей среды продуктами человеческой жизнедеятельности в настоящее время критически актуальна. Органические фрагменты подвергаются деструкции медленно и в результате накапливаются в экосистемах. Множество исследований подтверждают наличие различных загрязнителей в реках, почвах, атмосфере. Несмотря на большой массив работ по поиску методов инактивации и очистки подобных загрязнителей, нет универсального, применимого к различным классам ксенобиотиков. Целью данной работы являлось изучение деструктивных процессов модельных систем ксенобиотиков различной природы. В качестве метода деструкции применяли УФ-облучение. Изучали деструкцию модельных веществ: двух красителей, двух фармацевтических препаратов и двух нитропроизводных фенола; деструктивные процессы модельных систем различных загрязнителей. Показано, что изученные субстраты уже в течение первого часа подвергаются фотодеструкции. Рассчитаны кинетические характеристики данных процессов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что УФ-облучение можно рассматривать как перспективный метод инактивации различных загрязнителей.

Ключевые слова: инактивация, ксенобиотики, фотолиз

Для цитирования: Устинова М. Н., Золотухина К. А. Инактивация ксенобиотиков: некоторых азокрасителей, нитропроизводных фенола и тетрациклинов // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 4. С. 382–391. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-4-382-391>, EDN: DYDGWL

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

Article

Inactivation of xenobiotics and their mixtures

М. N. Ustinova ✉, К. A. Zolotukhina

Belgorod State University, 85 Pobedy St., Belgorod 308015, Russia

Maria N. Ustinova, ustinova@bsu.edu.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5739-5339>

Kseniya A. Zolotukhina, 1389050@bsu.edu.ru

Abstract. The problem of environmental pollution by human waste products is currently critically relevant. Organic fragments undergo degradation slowly and as a result accumulate in ecosystems. Many studies confirm the presence of various pollutants in rivers, soils, atmosphere. Despite a large body of work on the search for methods of inactivation and purification of such pollutants, there is no universal method, applicable to various classes of xenobiotics. The purpose of this work has been to study the destructive processes of model systems of xenobiotics of various nature. UV irradiation has been used as a method of destruction. The destruction of model substances has been studied in the work: two dyes, two pharmaceuticals and two nitro derivatives of phenol. Destructive processes of model systems of various pollutants have been studied. It is shown that many substrates undergo photodestruction within the first hour. Kinetic characteristics of these processes are calculated. The results obtained indicate that UV irradiation can be considered as a promising method of inactivation of various pollutants.

Keywords: inactivation, xenobiotics, photolysis

For citation: Ustinova M. N., Zolotukhina K. A. Inactivation of xenobiotics: Some azo dyes, phenol nitro derivatives, and tetracyclines. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2023, vol. 23, iss. 4, pp. 382–391 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-4-382-391>, EDN: DYDGWL

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



Введение

Поллютанты – это различного рода загрязнители объектов окружающей среды [1–6]. Их присутствие крайне отрицательно сказывается на среде обитания различных бионтов, и как следствие, на их здоровье. На сегодняшний день проблема загрязнения окружающей среды выбросами отходов производства как никогда актуальна [7, 8].

Одним из основных источников ксенобиотиков, загрязняющих окружающую среду, является текстильная промышленность. Такие предприятия используют огромное количество разнообразных реагентов, красителей, которые впоследствии становятся серьёзными загрязнителями вод, особенно вблизи производства [9].

Не стоит забывать и о фармацевтических предприятиях. Чаще всего такие производства не оборудованы под переработку отходов после получения лекарственных препаратов. А они, в свою очередь, могут крайне негативно влиять на окружающую среду [10–12].

Пестициды также являются опасными поллютантами, это химические или биологические препараты, массово используемые для борьбы с вредителями и сорными растениями из-за технологической простоты, эффективности и невысокой стоимости. Другая сторона – влияние на экосистемы, ввиду сокращения биоразнообразия, а также в результате прямого действия на бионтов и опосредованного вследствие накопления остаточных количеств в сельскохозяйственных продуктах и питьевой воде [13, 14].

Данная экологическая проблема есть результат производства и потребления, которые сопутствуют развитию человечества. Видимые изменения в биосфере появились вследствие активного прогресса человечества. Но такой прогресс – это прежде всего загрязнение природной среды огромным количеством разнообразных синтетических веществ. Переработка или хотя бы инактивация таких отходов имеет серьёзную значимость для сохранности биогеоценоза в целом.

Существует множество способов переработки загрязняющих веществ. Одним из них можно считать очищение объектов окружающей среды деструктивными методами. Выбор того или иного способа зависит от свойств поллютанта и агрегатного состояния [15, 16].

Целью данной работы являлось изучение деструктивных процессов модельных систем различных поллютантов. В качестве метода деструкции применяли УФ-облучение.

Материалы и методы

В работе в качестве объектов исследования использовали модельные вещества различного назначения. Были выбраны красители, пестициды и лекарственные препараты.

В качестве модельных систем отходов текстильной и лакокрасочной промышленности выбраны два металлохромных индикатора: эриохром чёрный Т (ЭХЧТ / ЕВТ) и эриохром синий (ЭС / ЕВ) (табл. 1). В данной работе были использованы металлоиндикаторы классификации ЧДА.

В качестве модельной системы отходов фармацевтической промышленности выбраны лекарственные препараты тетрациклинового ряда: тетрациклин (Т / Т) и доксициклин (Д / D). Тетрациклин выбран ввиду того, что его деструкция различными методами и системами исследовалась ранее, что позволит сделать рациональный анализ [17, 18]. Доксициклин является изомером тетрациклина, что также представляет интерес.

Тетрациклин выпускается в виде таблеток, покрытых пленочной оболочкой розового цвета и имеющих двояковыпуклую форму. Одна таблетка содержит 100 мг основного вещества, тетрациклина гидрохлорида, в состав таблетки также входят: стеарат кальция, диоксид титана, целлюлоза. Доксициклин выпускается в виде капсул, содержит 100 мг основного вещества – доксициклина гиклата, вспомогательные вещества: лактозы моногидрат, крахмал, кальция стеарат.

В работе без дополнительной обработки использовали коммерческие лекарственные препараты (см. табл. 1), при этом изучали только изменение концентрации действующего вещества. Превращения, которые могут претерпевать вспомогательные вещества, в данной работе не рассматривались, поскольку фармацевтические препараты попадают в окружающую среду со вспомогательными веществами, то их присутствие и влияние на деструкцию основного действующего вещества исключать нецелесообразно.

В качестве модельных систем отходов химической промышленности и производства пестицидов нами были выбраны 4-нитрофенол (НФ / NPh) и 2,6-динитрофенол (ДНФ / dNPh), оба реактива классификации ЧДА (см. табл. 1).

В эксперименте изучали деструкцию субстратов при температуре 20°C в водных растворах.



Таблица 1 / Table 1

Исследуемые вещества
Compounds under study

Название исследуемого образца Name of the reagents	Структурная формула Structural formula	Брутто-формула Gross formula	λ_{\max} , нм λ_{\max} , nm
Красители / Dyes			
Эриохром чёрный Т / Eriochrome black T		$C_{20}H_{12}N_3O_7SNa$	540
Эриохром синий / Eriochrome blue		$C_{16}H_9ClN_2Na_2O_9S_2$	530
Лекарственный препарат / Medicinal product			
Тетрациклин «Биосинтез», таблетки / Tetracycline “Biosynthesis”, tablets		$C_{22}H_{24}N_2O_8$	365
Доксициклин «Велфарм», капсулы / Doxycycline “Velpharm”, capsules		$C_{22}H_{24}N_2O_8$	350
Пестициды / Pesticides			
4-нитрофенол / 4-nitrophenol		$C_6H_5O_3N$	320
2,6-динитрофенол / 2,6-dinitrophenol		$C_6H_4O_5N_2$	425



За изменением концентрации субстратов следили спектрофотометрическим методом по изменению интенсивности поглощения. Максимум поглощения определяли на спектрофотометре Specord Plus 210 в диапазоне длин волн от 200 до 600 нм с шагом 1 нм.

В фотолизную камеру Вольта ФК-12М, оснащенную ртутной лампой ДРТ-1000 мощностью 1000 Вт с лучистым потоком 128 Вт, поток излучения которой лежит в области спектра 240–320 нм, помещали 25 мл водного раствора исследуемого образца в специальной кварцевой пробирке и подвергали облучению в течение 5 мин. По истечении времени облучения раствору давали охладиться, отбирали пробу и регистрировали спектр поглощения.

Отобранную пробу возвращали в раствор. Фотолиз проводили в течение 60–90 мин.

Результаты и их обсуждение

Изначально изучали деструкцию чистых компонентов. Эриохром черный Т является органическим азокрасителем группы диоксиазонафталина. В его молекулу входят хромофорная азогруппа и две фенольные группы. Эриохром синий также относится к группе азокрасителей, содержит азогруппу, которая соединяет ароматические циклы с сульфогруппами и гидроксогруппами.

На рис. 1 представлена деструкция данных красителей при трех значениях концентраций (мМ).

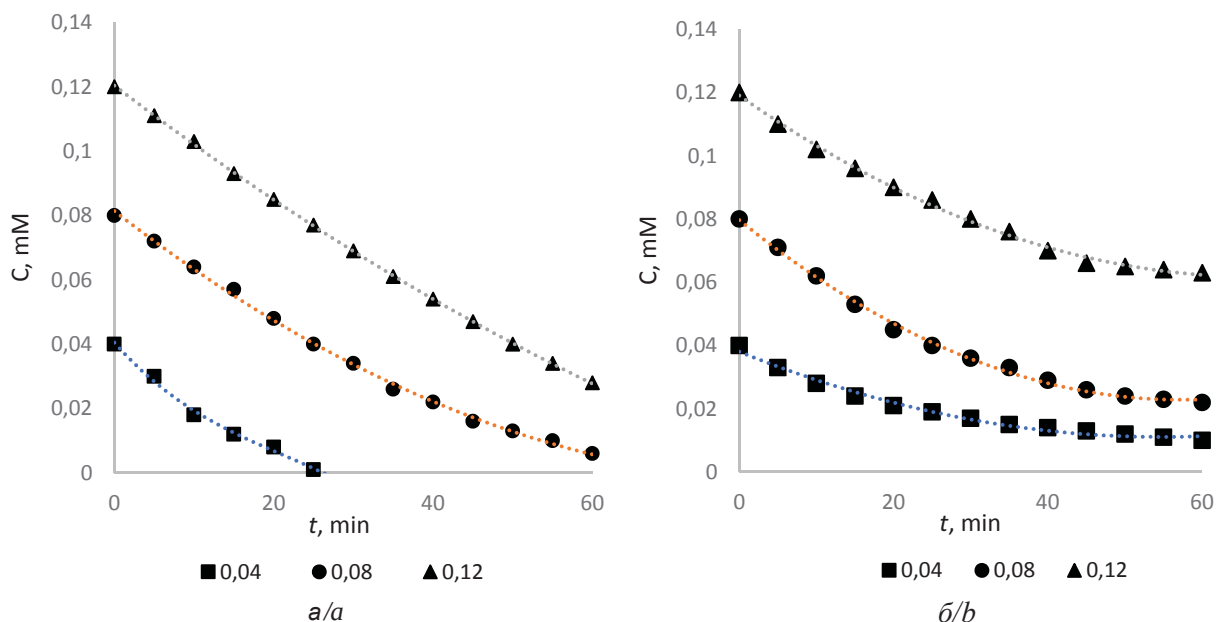


Рис. 1. Кинетическая кривая фотодеструкции эриохрома синего (а) и эриохрома чёрного Т (б)
 Fig. 1. Kinetic photodestruction curve of blue eriochrome (a) and black eriochrome T (b)

Обесцвечивание растворов красителей и убыль оптической плотности видимого диапазона спектров является свидетельством разрыва азосвязи с образованием бесцветных ароматических аминов. Продуктами окисления аминопроизводных могут быть нитропроизводные, однако при наличии значительного количества окислителя возможна полная минерализация субстрата. В работе [19] при изучении биодegradации азокрасителей предложен механизм, в котором за стадией образования ароматических аминов следует дезаминирование, деароматизация и дециклизация с образованием линейных структур, среди продуктов деструкции азокрасителей были обнаружены спирты и карбоновые кислоты.

Линеаризация зависимостей в координатах $\ln(C_0/C_t)$ от времени облучения (рис. 2) свидетельствует о первом порядке реакции. Константы скоростей соответствующих процессов определены по линейному уравнению каждой прямой.

Тетрациклины – группа антибиотиков, полифункциональные гидронафтаценовые соединения. Их окраска обусловлена наличием хромофоров в структуре. В электронном спектре тетрациклина наблюдается несколько характерных полос поглощения с максимумами при 220, 265 и 335 – 365 нм. Химические свойства тетрациклинов во многом определяются наличием в молекуле различных функциональных групп.

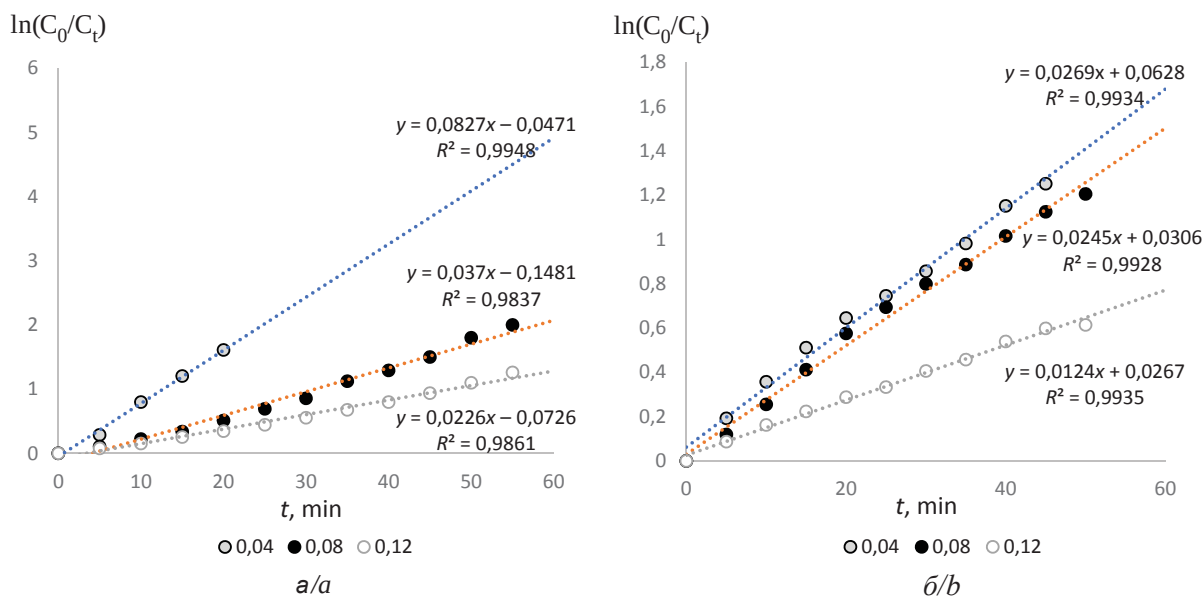


Рис. 2. Зависимость $\ln(C_0/C_t)$ от времени облучения для эриохрома синего SE (а) и эриохрома черного Т (б)
Fig. 2. Dependence of $\ln(C_0/C_t)$ on the irradiation time for blue eriochrome SE (a) and black eriochrome T (b)

На рис. 3 представлена фотодеструкция действующего вещества тетрациклина и доксициклина при трех варьируемых концентрациях (mM). Видно, что степень деструкции тетрациклина выше доксициклина. Доксициклин

является изомером тетрациклина, в результате перегруппировки одной гидроксигруппы между соседними циклами в структуре конденсированной четырехциклической системы, что влияет на способность к деструктивным процессам.

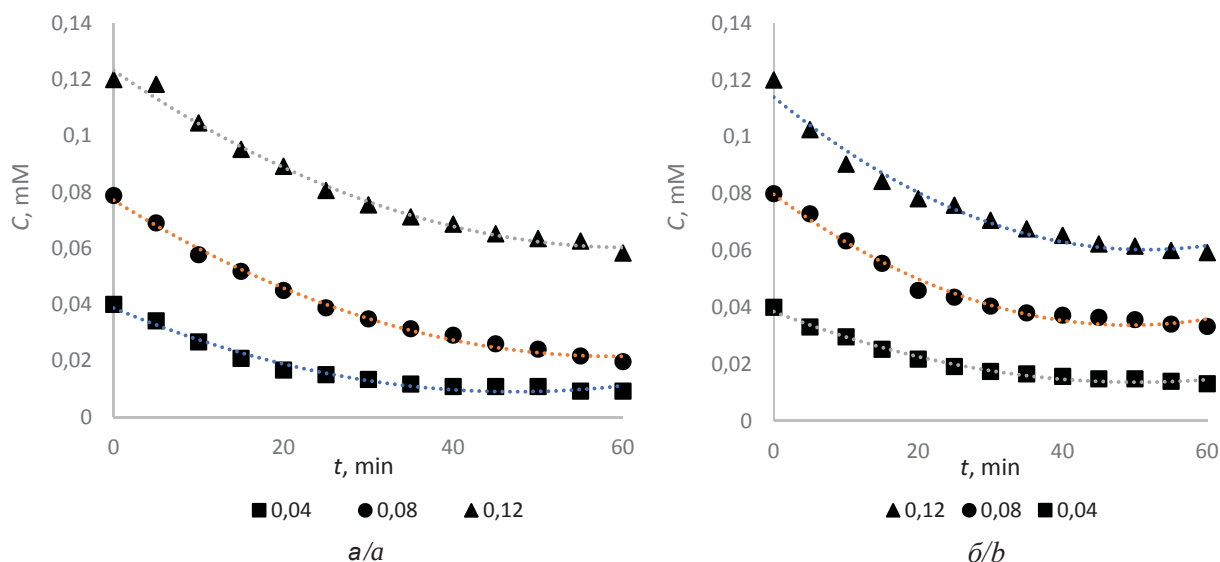


Рис. 3. Кинетическая кривая фотодеструкции действующего вещества (а) тетрациклина и (б) доксициклина
Fig. 3. Kinetic photodestruction curve of the active substance (a) tetracycline and (b) doxycycline

На рис. 4 представлена деструкция 4-нитрофенола и 2,6-динитрофенола. Ранее говорилось о механизме деструкции красителей, результатом которой могут являться нитроароматические соединения, не менее токсичные чем amino-.

Видно, что с течением времени 4-нитрофенол при трех изучаемых концентрациях достигает высокой степени деструкции, более 90%. Интересен вид полученных кривых деструкции 2,6-динитрофенола, в течение 30 мин

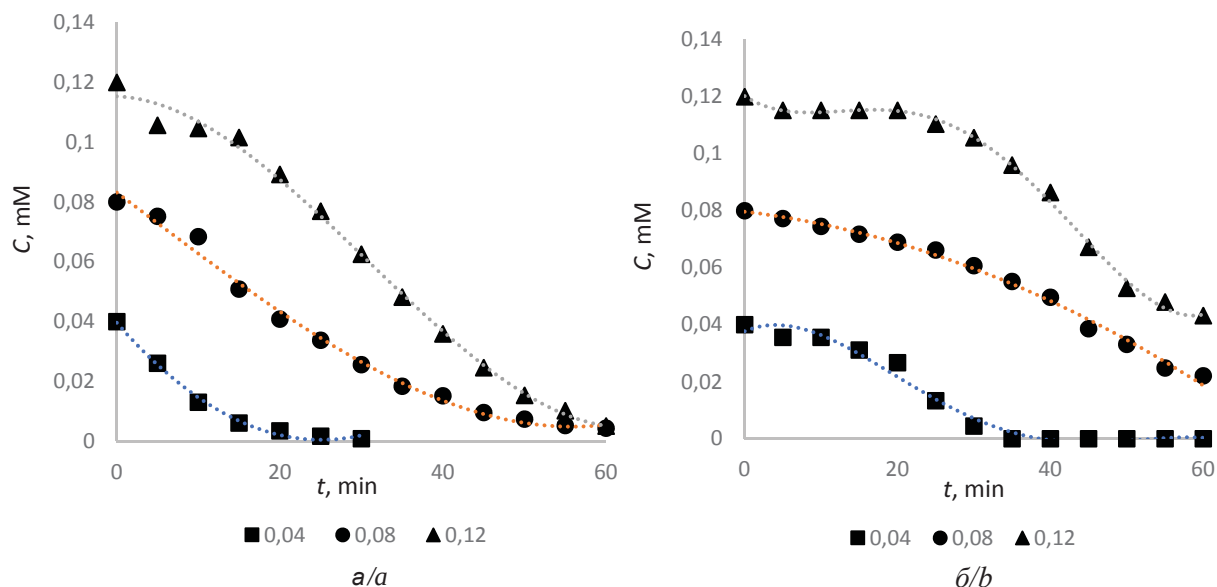


Рис. 4. Кинетическая кривая фотодеструкции (а) 4-нитрофенола и (б) 2,6-динитрофенола
 Fig. 4. Kinetic curve of photodestruction of (a) 4-nitrophenol and (b) 2,6-dinitrophenol

реакция идет с одной скоростью, достигая 30% деструкции, и далее резко ускоряется. Вероятно, для деструкции такого устойчивого поллютан-

та необходимо накопление фотонов в системе. Все кинетические характеристики процессов деструкции сведены в табл. 2.

Таблица 2 / Table 2

Кинетические характеристики изучаемых систем
Kinetic characteristics of the studied systems

№	Система / System	Концентрация исходная, ммоль/л / Initial concentration, mmol/l	Степень деструкции, час % / Degree of destruction, hour %	Начальная скорость деструкции, мкмоль/л×мин / Initial destruction rate, mmol/l×min
Красители / Dyes				
1	ЭС / EB	0,04	99,90	2,0
2		0,08	92,50	1,6
3		0,12	76,66	1,8
4	ЭХЧТ / EBТ	0,04	75,00	1,4
5		0,08	72,50	1,8
6		0,12	47,50	2,0
Лекарственные препараты / Medicinal preparations				
1	Т / T	0,04	77,08	1,2
2		0,08	74,98	1,9
3		0,12	51,43	0,3
4	Д / D	0,04	67,39	1,4
5		0,08	58,42	1,4
6		0,12	50,63	3,5
Пестициды / Pesticides				
1	4НФ / NPh	0,04	99,90	2,8
2		0,08	94,50	1,0
3		0,12	93,73	2,9
4	2,6ДНФ / dNPh	0,04	88,89	0,9
5		0,08	72,41	0,5
6		0,12	64,00	1,0



Теоретическое значение химического потребления кислорода (ХПК) формально определяется как такая масса окислителя в пересчёте на кислород, выраженная в мг/мг, при которой весь углерод, водород, сера, фосфор и другие элементы (кроме азота), если они присутствуют в органическом веществе, окисляются до их высших оксидов.

Расчет ХПК производили по формуле вещества (1):

$$\text{ХПК}_{\text{вещ}} = \frac{16}{M_{\text{вещ}}} \sum N_I K_I, \quad (1)$$

исходя из количества атомов элементов N_I , стехиометрии окисления элемента K_I и молекулярной массы вещества [12].

При сопоставлении величины ХПК с полученными данными степени деструкции (рис. 5) показано, что строение вещества и высокая молекулярная масса не всегда может определить ход деструктивного процесса, зачастую стабильность органического поллютанта и его устойчивость к деструкции определяется взаимным влиянием заместителей в структуре молекулы, однако в большинстве случаев величина ХПК является информативной единицей: его высокие значения соответствуют низким значениям полученной деструкции и наоборот.

Также были рассчитаны квантовые выходы фотодеструкции субстратов для средних значений концентраций (0,08 мМ), табл. 3.

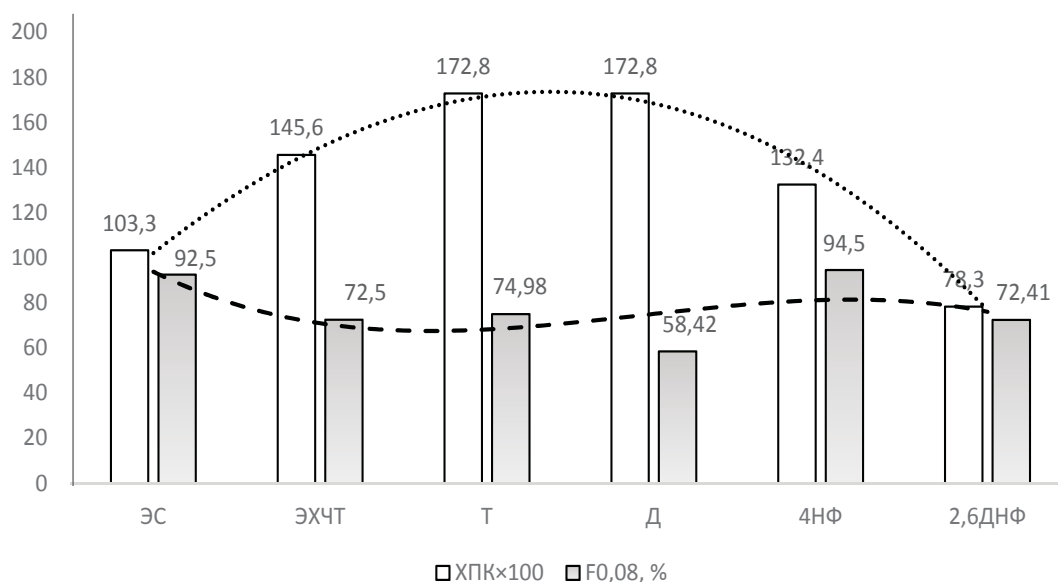


Рис. 5. Сопоставление величины ХПК со степенью деструкции субстратов при средних значениях концентраций (0,08 мМ)

Fig. 5. Comparison of the amount of chemical oxygen consumption with the degree of destruction of substrates at average concentrations (0.08 mM)

Таблица 3 / Table 3

Квантовые выходы реакций фотолиза
Quantum yields of photolysis reactions

№	Система / System	$\phi \times 100$	Погрешность расчета / Calculation error
1	ЭХЧТ	1.38	0,01-0,02 ± 0,002 0,02-0,03 ± 0,004 0,04-0,05 ± 0,007 0,09-0,11 ± 0,015
2	ЭС	4.92	
3	Т	1.43	
4	Д	2.89	
5	4НФ	2.06	
6	2,6ДНФ	11.08	

Световой поток $0,5114 \times 10^{-7}$ Энштейн/с = $3,079 \times 10^{16}$ квант/с определяли по методу с использованием раствора ферриоксалатного актинометра.

Число поглощенных квантов монохроматического света определяли по измеренной квантовой интенсивности светового потока, падающего на кювету с раствором, и известному поглощению раствора в данной спектральной области.

Квантовые выходы фотодеструкции рассчитывались по формуле 2 [20]:

$$\phi = \frac{\Delta DN_A V}{I(\epsilon - \epsilon_{\text{эф}})(1 - T)ISl}, \quad (2)$$



где ΔD – изменение оптической плотности в максимуме длинноволновой полосы поглощения (λ_{\max}) при толщине слоя l , см, за время облучения t , 1 ч = 60 мин = 3600 с; N_A – число Авогадро; V – объем облучаемого раствора, 0,025 л; ϵ – молярный коэффициент экстинкции исходного субстрата в максимуме его длинноволновой полосы поглощения (λ_{\max}); $\epsilon_{\text{эф}}$ – эффективный молярный коэффициент поглощения фотопродуктов в максимуме длинноволновой полосы поглощения исходного субстрата (λ_{\max}); T – пропускание облучаемого раствора на длине волны возбуждающего света; I – световой поток, квант/(с \times см²); S – площадь облучения, см². Погрешность определения квантовых выходов составляла 15%.

Квантовый выход меньше 1 может быть обусловлен не только обратной реакцией, но и другими причинами. Часто $\phi < 1$ наблюдается в случае реакций, протекающих в растворах. В случае реакции в растворах $\phi < 1$ обусловлен не только рекомбинацией возникших при облучении продуктов реакции, но в значительной степени дезактивацией возбуждающих молекул молекулами-растворителями.

Тем не менее, степень деструкции изученных субстратов значительна, поэтому фотолиз данных систем является весьма эффективным.

Заключение

Изучены деструктивные процессы модельных систем различных поллютантов. Показано, что эриохром черный и эриохром синий, тетрациклин и доксициклин, а также 4-нитрофенол и 2,6-динитрофенол уже в течение первого часа подвергаются фотодеструкции. Рассчитаны кинетические характеристики данных процессов: начальная скорость, степень деструкции, ХПК и квантовые выходы.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что УФ-облучение можно рассматривать как перспективный метод инактивации различных поллютантов.

Список литературы

1. Демин А. П. Сброс сточных вод и загрязнение водных объектов реки Волга (1990–2018 гг.) // Экология. Экономика. Информатика. Серия: Системный анализ и моделирование экономических и экологических систем. 2020. Т. 1, № 5. С. 138–143.
2. Войтович А. А., Джейранова М. О., Солтаева М. А., Котранова М. В., Булудова М. В. Гигиеническая оценка химического загрязнения малых рек Саратовской области // Международный студенческий научный вестник. 2019. № 1. С. 9.
3. Кумани М. В., Соловьева Ю. А., Корнилов А. Г. Особенности фенольного загрязнения рек Курской и Белгородской областей // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Естественные науки. 2011. № 15 (110). С. 193–198.
4. Bayratova A. R. Impact oil pollution on soil fertility // East European Scientific Journal. 2021. № 10-2 (74). С. 40–42.
5. Трублаевич Ж. Н., Лукьянова Н. Н., Бабкина Э. И. Мониторинг загрязнения почв пестицидами: влияние высушивания проб почвы на обнаружение пестицидов // Агрохимия. 2007. № 2. С. 58–65.
6. Татаринцов В. В. Химическое загрязнение атмосферы и оценка условий, влияющих на уровень загрязнения окружающей среды на аэродроме «Воронеж-Б» // Современные технологии обеспечения гражданской обороны и ликвидации последствий чрезвычайных ситуаций: сборник статей по материалам Всероссийской научно-практической конференции с международным участием (19 апреля 2013 г., Воронеж). Воронеж : Воронежский институт ГПС, 2013. С. 123–125.
7. Shorin S. S., Mashzhan A. S. Influence of various pollutants to the environment on metabolic status laboratory animals organism // Bulletin of the Karaganda University. Biology. Medicine. Geography Series. 2018. Vol. 91, № 3. P. 107–113.
8. Логоминова И. В., Малахова Л. В., Малахова Т. В., Артов А. М., Коростелева А. В., Постникова А. Н. Новые данные о хлорорганических поллютантах в подкожном жире черноморских китообразных // Труды Карадагской научной станции им. Т. И. Вяземского – Природного заповедника РАН. 2018. № 4 (8). С. 16–25.
9. Почтаева И. А., Иозус А. П. Влияние текстильной промышленности на загрязнение атмосферы // Инновационные технологии в обучении и производстве: материалы XV Всероссийской заочной научно-практической конференции / Волгоградский государственный технический университет (Камышинский филиал). Волгоград, 2021. С. 67–70.
10. Ustinova M. N., Lebedeva O. E. Oxidative Inactivation of Drugs // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2014. № 5 (5). P. 1687–1690.
11. Баренбойм Г. М. Загрязнение природных вод лекарствами. М. : Наука, 2015. 283 с.
12. Устинова М. Н. Окислительная деструкция как способ инактивации экополлютантов фармацевтического происхождения: автореф. дис. ... канд. хим. наук. Белгород, 2012. 20 с.
13. Бугрова А. Н., Власова А. А., Ротанова В. А., Сочнева А. С., Торопова А. И. Химические пе-



- стициды и их влияние // Современные научные исследования и инновации. 2020. № 12 (116). С. 10.
14. *Нагиев Р. Н.* Влияние пестицидов на окружающую среду // Проблемы естествознания: история и современность: сборник научных трудов по материалам всероссийской научно-практической конференции. Ставрополь : ООО «Секвойя», 2018. С. 112–114.
15. *Vasilescu M. V., Epikhin A. I.* Ballast water treatment system method to protect the environment // Эксплуатация морского транспорта. 2022. № 3 (104). С. 99–106.
16. *Козлова М. А.* Лекарственное загрязнение природных и сточных вод: методы очистки и результаты исследования // Экологический вестник Северного Кавказа. 2020. Т.16, № 1. С. 77–80.
17. *Устинова М. Н., Жунусов Н. С.* Деструкция действующего вещества тетрациклина под действием УФ-облучения // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2021. Т. 21, вып. 3. С. 246–253. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2021-21-3-246-253>
18. *Устинова М. Н., Филиппова К. А.* Окислительная деструкция тетрациклина различными пероксидными системами // Вестник Тверского государственного университета. Серия: Химия. 2021. № 4 (46). С. 68–79
19. *Емашова Н. А.* Кинетические закономерности конверсии азокрасителей и продуктов их распада анаэробным и аэробным консорциумами микроорганизмов: автореф. дис. ... канд. хим. наук. М., 2006. 28 с.
20. *Ковальская Н. Е., Кузнецова Н. А., Соколова И. В.* Спектральное определение квантовых выходов фотодеструкции псораленов в водных и спиртовых средах // Оптика атмосферы и океана. 2004. Т. 17, № 2-3. С. 221–224.
5. *Trublaevich Zh. N., Lukyanova N. N., Babkina E. I.* Monitoring of soil contamination with pesticides: The effect of drying soil samples on the detection of pesticides. *Agrochemistry*, 2007, vol. 2, pp. 58–65 (in Russian).
6. *Tatarinov V. V.* Chemical pollution of the atmosphere and assessment of conditions affecting the level of environmental pollution at the Voronezh-B airfield. In: *Sovremennye tekhnologii obespecheniya grazhdanskoj oborony i likvidatsii posledstviy chrezvychainykh situatsiy. Sbornik statei po materialam Vserossiiskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii (19 apr. 2013 g., Voronezh)* [Modern technologies for civil defense and emergency response. collection of articles based on the materials of the All-Russian scientific and practical conference with international participation (April 19, 2013, Voronezh)]. Voronezh, Voronezh Institute of State Fire Service, 2013, pp. 123–125 (in Russian).
7. *Shorin S. S., Mashzhan A. S.* Influence of various pollutants to the environment on metabolic status laboratory animals organism. *Bulletin of the Karaganda University. Biology. Medicine. Geography Series*, 2018, vol. 91, no. 3, pp. 107–113.
8. *Logominova I. V., Malakhova L. V., Malakhova T. V., Artov A. M., Korosteleva A. V., Postnikova A. N.* New data on organochlorine pollutants in subcutaneous fat of Black Sea cetaceans. *Proceedings of the Karadag Scientific Station named after T. I. Vyazemsky – Nature Reserve of the Russian Academy of Sciences*, 2018, vol.4 (8), pp. 16–25 (in Russian).
9. *Pochitaeva I. A., Iozus A. P.* The influence of the textile industry on atmospheric pollution. In: *Innovatsionnye tekhnologii v obuchenii i proizvodstve. Materialy XV Vserossiyskoy zaочноy nauchno-prakticheskoy konferentsii* [Innovative technologies in education and production. Materials of the XV All-Russian Correspondence Scientific and Practical Conference]. Volgograd, Volgograd State Technical University. 2021, pp. 67–70 (in Russian).
10. *Ustinova M. N., Lebedeva O. E.* Oxidative Inactivation of Drugs. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 2014, vol. 5 (5), pp. 1687–1690.
11. *Barenbojm G. M.* *Zagryaznenie prirodnih vod lekarstvami* [Pollution of Natural Waters by Medicines]. Moscow, Nauka, 2015. 283 p. (in Russian).
12. *Ustinova M. N.* *Oxidative Degradation as a Method of Inactivation of Pollutants of Pharmaceutical Origin*. Thesis Diss. Cand. Sci. (Chem.). Belgorod, 2012. 20 p. (in Russian).
13. *Bugrova A. N., Vlasova A. A., Rotanova V. A., Sochneva A. S., Toropova A. I.* Chemical pesticides and their influence. *Modern Scientific Research and Innovations*, 2020, no. 12 (116), pp. 10.
14. *Nagiyev R. N.* The impact of pesticides on the environment. In: *Sbornik nauchnykh trudov po materialam vserossiiskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii* [Problems



- of natural science: History and modernity. Collection of scientific papers based on the materials of the All-Russian scientific and practical conference]. Stavropol, ООО "Sekvoya", 2018, pp. 112–114 (in Russian).
15. Vasilescu M. V., Epikhin A. I. Ballast water treatment system method to protect the environment. *Ekspluatatsiya morskogo transporta*, 2022, no. 3 (104), pp. 99–106.
 16. Kozlova M. A. Medicinal pollution of natural and wastewater: Purification methods and research results. *The North Caucasus Ecological Herald*, 2020, vol. 16, no. 1, pp. 77–80 (in Russian).
 17. Ustinova M. N., Zhunusov N. S. UV degradation of the active substance of tetracycline. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2021, vol. 21, iss. 3, pp. 246–253 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2021-21-3-246-253>
 18. Ustinova M. N., Filippova K. A. Oxidative degradation of tetracycline by various peroxide systems. *Bulletin of Tver State University. Series: Chemistry*, 2021, vol. 4 (46), pp. 68–79 (in Russian).
 19. Emashova N. A. *Kinetic patterns of conversion of azo dyes and their decay products by anaerobic and aerobic consortia of microorganisms*. Thesis Diss. Cand. Sci. (Chem.). Moscow, 2006. 28 p.
 20. Kovalskaya N. E., Kuznetsova N. A., Sokolova I. V. Spectral determination of quantum yields of photodestruction of psoralenes in aqueous and alcoholic media. *Optics of the Atmosphere and Ocean*, 2004, vol. 17, no. 2–3, pp. 221–224 (in Russian).

Поступила в редакцию 17.05.2023; одобрена после рецензирования 19.06.2023; принята к публикации 24.06.2023
The article was submitted 17.05.2023; approved after reviewing 19.06.2023; accepted for publication 24.06.2023



Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 4. С. 392–403

Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology, 2023, vol. 23, iss. 4, pp. 392–403

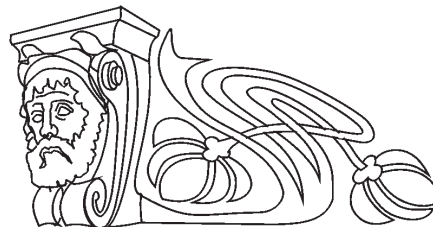
<https://ichbe.sgu.ru>

<https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-4-392-403>, EDN: EBHKZW

Научная статья

УДК 543.422.3

Спектрофотометрическое определение некоторых β -лактамных антибиотиков в их бинарных смесях с использованием метода проекций на латентные структуры



Е. Ф. Кетруш, Р. К. Мурсалов, Д. В. Силаев, Т. Ю. Русанова ✉

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

Кетруш Елизавета Фёдоровна, студент Института химии, ketruse@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0001-7456-033X>

Мурсалов Руслан Кямранович, инженер кафедры аналитической химии и химической экологии Института химии, ruslan.mursalov2011@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7754-5469>

Силаев Дмитрий Владимирович, инженер кафедры аналитической химии и химической экологии Института химии, sil_diman@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8392-138X>

Русанова Татьяна Юрьевна, доктор химических наук, доцент, заведующий кафедрой аналитической химии и химической экологии Института химии, tatyanyars@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5902-3707>

Аннотация. Предложен способ спектрофотометрического определения антибиотиков цефалоспориновой (цефуроксим, цефтриаксон, цефотаксим, цефазолин) и пенициллиновой (амоксциллин) групп с использованием хемометрической обработки данных (метод проекции на латентные структуры (ПЛС)). Зарегистрированы спектры поглощения 24 бинарных смесей «цефалоспорин – цефалоспорин» и 16 бинарных смесей «цефалоспорин – амоксициллин» с различными концентрациями в диапазоне 3–27 и 5–140 мкг/мл. Выбрано оптимальное число латентных переменных для каждого хемометрического метода (ПЛС-1 и ПЛС-2), которое составило от 2 до 7 в зависимости от типа модели и природы антибиотиков. Наименьшие среднеквадратичные ошибки калибровки (RMSEC) найдены для системы «цефтриаксон – цефазолин», которые составили 0.09 и 0.08 для ПЛС-1 и ПЛС-2 соответственно. Наименьшие среднеквадратичные ошибки прогноза (RMSEP) для смеси «цефуроксим – амоксициллин» составили 0.07 для обоих методов (ПЛС-1 и ПЛС-2). Установлено, что уравнения линейных зависимостей «измерено – предсказано» характеризуются коэффициентом регрессии и квадратом коэффициента аппроксимации близкими к 1, что говорит о высоком качестве моделей. Величины относительной погрешности определения в проверочных смесях составили методом ПЛС-1 для смесей «цефалоспорин – цефалоспорин» 0.4–6.2%, методом ПЛС-2 – 0.07–6.0%. При этом значительной разницы в погрешности определения компонентов смеси не наблюдается, в отличие от системы «цефуроксим – амоксициллин», для которой погрешность составляет 0.1–1.1% для первого компонента и 2.6–14.7% для второго компонента методом ПЛС-1 и 0.2–1.2% для первого компонента и 4.3–13.3% для второго компонента методом ПЛС-2. Таким образом, показано, что применение хемометрических методов обеспечивает высокую точность спектрофотометрического определения исследуемых антибиотиков с перекрывающимися полосами поглощения в их смесях.

Ключевые слова: антибиотики, цефуроксим, цефтриаксон, цефотаксим, цефазолин, амоксициллин, спектрофотометрия, метод проекций на латентные структуры

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-23-00420).

Для цитирования: Кетруш Е. Ф., Мурсалов Р. К., Силаев Д. В., Русанова Т. Ю. Спектрофотометрическое определение некоторых β -лактамных антибиотиков в их бинарных смесях с использованием метода проекций на латентные структуры // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 4. С. 392–403. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-4-392-403>, EDN: EBHKZW

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

Article

Spectrophotometric determination of some β -lactam antibiotics in their binary mixtures using the method of partial least squares

E. F. Ketrush, R. K. Mursalov, D. V. Silaev, T. Yu. Rusanova ✉

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

Elizaveta F. Ketrush, ketruse@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0001-7456-033X>

Ruslan K. Mursalov, ruslan.mursalov2011@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7754-5469>

Dmitry V. Silaev, sil_diman@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8392-138X>

Tatiana Yu. Rusanova, tatyanyars@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5902-3707>



Abstract. The method has been proposed for the spectrophotometric determination of antibiotics of the cephalosporin (cefuroxime, ceftriaxone, cefotaxime, cefazolin) and penicillin (amoxicillin) groups using chemometric data processing (method of partial least squares, PLS). The absorption spectra of 24 binary mixtures of “cephalosporin – cephalosporin” and 16 binary mixtures of “cephalosporin – amoxicillin” with various concentrations in the range of 3–27 and 5–140 µg/ml have been recorded. The optimal number of latent variables for each chemometric method (PLS-1 and PLS-2) has been selected, which ranged from 2 to 7 depending on the type of model and the nature of the antibiotics. The smallest root mean square calibration errors (RMSEC) have been found for the ceftriaxone–cefazolin system, which have been 0.09 and 0.08 for PLS-1 and PLS-2, respectively. The smallest root mean square errors of prediction (RMSEP) for the mixture “cefuroxime – amoxicillin” have been 0.07 for both methods (PLS-1 and PLS-2). It has been established that equations of linear relationships “measured-predicted” are characterized by a regression coefficient and the square of the approximation coefficient close to 1; which indicates the high quality of the models. The relative error of determination in test mixtures has been 0.4–6.2% by the PLS-1 method for “cephalosporin – cephalosporin” mixtures, and 0.07–6.0% by the PLS-2 method. At the same time, there is no significant difference in the error in determining the components of the mixture, in contrast to the “cefuroxime – amoxicillin” system, for which the error is 0.1–1.1% for the first component and 2.6–14.7% for the second component using the PLS-1 method and 0.2–1.2% for the first component and 4.3–13.3% for the second component using the PLS-2 method. Thus, it has been shown that the use of chemometric methods ensures high accuracy of the spectrophotometric determination of the studied antibiotics with overlapping absorption bands in their mixtures.

Keywords: antibiotics, cefuroxime, ceftriaxone, cefotaxime, cefazolin, amoxicillin, spectrophotometry, method of partial least squares

Acknowledgements: The research was supported by Russian Science Foundation (project No. 22-23-00420).

For citation: Ketrush E. F., Mursalov R. K., Silaev D. V., Rusanova T. Yu. Spectrophotometric determination of some β-lactam antibiotics in their binary mixtures using the method of partial least squares. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2023, vol. 23, iss. 4, pp. 392–403 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-4-392-403>, EDN: EBHKZW

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

Введение

В лекарственных препаратах (ЛП) нередко используют сочетание двух и более активных фармацевтических ингредиентов (АФИ) для усиления фармакологического эффекта и удобства применения комбинированных препаратов. Трудоемкое и сложное предварительное разделение АФИ, входящих в состав комбинированных препаратов и обладающих сходными физико-химическими свойствами, затрудняет проведение экспресс-анализа при контроле качества в лаборатории. Хемометрические алгоритмы, на сегодняшний момент перспективные, экспрессные и не требующие больших трудозатрат, являются альтернативой трудоемким процедурам, связанным с предварительным разделением компонентов смеси и использованием дорогостоящего оборудования при анализе.

Бета-лактамные антибиотики (табл. 1) находят широкое применение в медицинской практике, так как обладают такими ценными качествами, как надежность, относительно широкий спектр антимикробного действия, высокая активность, стабильность и эффективность. Названные качества дают основания считать эти антибиотики идеальными препаратами для лечения многих бактериальных инфекций.

Основными хемометрическими алгоритмами, применяемым для определения концентрации действующих веществ в ЛП с двумя и более АФИ, являются метод проекции на латентные структуры (ПЛС) и метод регрессии на главные компоненты (РГК), которые подробно описаны в работах [1, 2]. Представленные методы позволя-

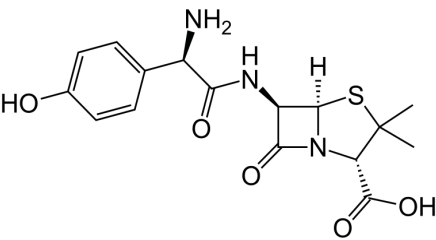
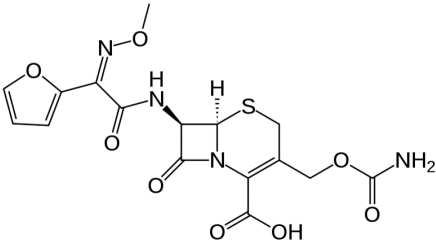
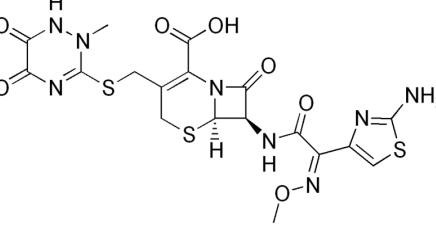
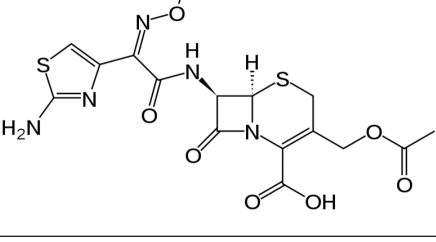
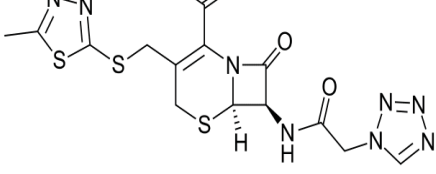
ют работать с данными, в которых не исключено наличие погрешностей как в обучающем, так и в проверочном наборах. Метод ПЛС проводит одновременно разложение матриц данных X (спектры поглощения) и отклика Y (концентрации), строя проекции с максимальной корреляцией соответствующих векторов, что уменьшает количество латентных переменных в описании сложных связей в модели по сравнению с методом РГК [1–3].

В литературе описаны примеры определения антибиотиков в их смесях с одновременным использованием спектрофотометрии и хемометрики. Так, для количественного анализа амоксициллина и флуклоксациллина в их бинарных смесях применялись различные хемометрические модели, а именно: ПЛС, МНКРСО – генетический алгоритм, совмещенный с методом наименьших квадратов и расширенными спектральными остатками (SRACLS – Spectral Residual Augmented Classical Least Squares), МНКОК – метод наименьших квадратов, дополненный остатками концентраций (CRACLS – Concentration Residuals Augmented Classical Least Squares) и ИНС – искусственные нейронные сети (ANN – Artificial Neural Networks), а также проводилось сравнение вышеперечисленных методов совместно с использованием генетического алгоритма (ГА). Методы использованы для количественного анализа лекарственных средств в смесях, приготовленных в лабораторных условиях, и в лекарственном препарате Flumox (EIPICO Pharmaceuticals Company) путем обработки данных



Таблица 1 / Table 1

Краткая характеристика исследуемых антибиотиков
Brief characteristics of the studied antibiotics

Вещество / (Сокращение) Substance / (Abbreviation)	Группа Group	М масса, г/моль M mass, g/mol	Формула Formula
Амоксицилина тригидрат (Амох)	Пенициллины	419.5	
Цефуроксима натрия (Cefur)	Цефалоспориновый антибиотик II поколения	446.4	
Цефтриаксона натрия (Ceft)	Цефалоспориновый антибиотик III поколения	576.6	
Цефотаксима натрия (Ctox)	Цефалоспориновый антибиотик III поколения	477.5	
Цефазолина натрия (Cef)	Цефалоспориновый антибиотик I поколения	476.5	

УФ-спектров. Наиболее надежные и простые модели получены с помощью ГА (табл. 2). Предложенные методы оказались достоверными, простыми и не требующими предварительной стадии разделения [4].

В работе [5] описано спектрофотометрическое определение двух антибактериальных веществ – норфлоксацина и тинидазола – в их бинарной смеси с использованием хемометрических алгоритмов. Спектры поглощения данных

Применение хемометрических алгоритмов в анализе двухкомпонентных смесей антибиотиков
Application of chemometric algorithms in the analysis of two-component mixtures of antibiotics

Компонент (Объект) Component (Object)	Метод Method	1-й компонент 1st component		2-й компонент 2nd component		Ссылка Reference
		RMSEC / RMSEP*	Открываемость Accuracy, %	RMSEC/ RMSEP*	Открываемость Accuracy, %	
1. Амоксициллин 2. Флуклосациллин (Капсулы Flumox (EIPICO Pharmaceuticals Company))	ПЛС-1	0.28/0.28	101.5 ± 1.3	0.24/0.39	100.2 ± 1.1	[4]
	ГА-ПЛС-1	0.24/0.25	101.2 ± 1.4	0.09/0.37	98.9 ± 1.4	
	МНКРСО	0.29/0.29	101.5 ± 1.3	0.16/0.31	99.3 ± 1.2	
	ГА-МНКРСО	0.24/0.25	101.2 ± 1.4	0.09/0.37	99.7 ± 0.8	
	МНКРСО	0.28/0.29	101.5 ± 1.3	0.26/0.37	99.9 ± 1.1	
	ГА-МНКРСО	0.24/0.25	101.2 ± 1.4	0.10/0.37	99.8 ± 0.8	
	ИНС	0.13/0.23	100.9 ± 1.1	0.23/0.28	99.9 ± 1.8	
ГА-ИНС	0.27/0.21	99.4 ± 1.3	0.30/0.31	99.7 ± 1.2		
1. Норфлоксацин 2. Тинидазол (Таблетки Conaz TM (Pharaonia Pharmaceuticals))	1D	–	99.2 ± 1.8	–	98.1 ± 1.6	[5]
	МНК	–	99.03 ± 1.5	–	98.3 ± 1.3	
	РГК	–	98.9 ± 1.8	–	98.2 ± 1.9	
1. Офлоксацин 2. Тинидазол (Таблетки OfloxTZ (Cipla Ltd))	РГК	-/0.04	99.02 ± 1.05	-/0.03	100.7 ± 1.2	[6]
	ПЛС	-/0.04	99.5 ± 1.2	-/0.03	100.7 ± 1.2	
1. Ципрофлоксацин 2. Доксициклин (Таблетки -)	РГК	-/0.14	97.5 ± 0.5	-/0.22	98.4 ± 0.8	[7]
	ПЛС	-/0.14	100.4 ± 1.3	-/0.21	101.9 ± 1.3	
1. Ципрофлоксацин 2. Орнидазол (таблетки ZOХAN-OZ)	РГК	0.3470/0.3469	102.0	0.26024/ 0.26023	102.0	[8]
	ПЛС	0.3395/0.3465	101.6	0.26032/ 0.26032	101.6	

Примечание. RMSEC – среднеквадратичная ошибка обучающего набора данных. RMSEP – среднеквадратичная ошибка проверочного набора [1].

Note. RMSEC – root mean square calibration errors of the training data set; RMSEP – test set mean square error [1].

антибиотиков имеют широкое перекрытие в диапазоне 200–400 нм, что затрудняет их определение без предварительного разделения. Для количественного определения использованы: метод первой производной с «нулевым пересечением» (1D); метод наименьших квадратов (МНК) (CLS – Classical Least Squares); РГК. Погрешности определения находились в пределах 0.2–3.0% для 1D, 0.2–1.6% для МНК и 0.1–2.0% для РГК соответственно для норфлоксацина и тинидазола. Полученные результаты методами МНК и РГК сравнивали с методом 1D. Открываемость составила для 1D –98.1–99.2%, методом МНК– 98.3–99.03% и для РГК 98.2–

98.9%. Вышеописанные методы показали высокие значения открываемости и могут быть применены для анализа смесей норфлоксацина и тинидазола и ЛП, содержащих комбинацию данных АФИ.

В работе [6] проводили количественное спектрофотометрическое определение офлоксацина и тинидазола с использованием методов РГК и ПЛС. Спектры поглощения регистрировали в диапазоне 280–320 нм. Построение хемометрической модели проводили с использованием 24 бинарных смесей в калибровочном наборе и 12 смесей в проверочном наборе. Показано, что хемометрическая обработка



данных позволяет проводить анализ смесей без предварительного этапа разделения. Правильность предложенных методик с использованием РГК и ПЛС подтверждали методом обращеннофазовой ВЭЖХ.

Определение ципрофлоксацина и доксициклина в ЛП спектрофотометрическим методом с применением методов РГК и ПЛС без предварительного разделения смеси представлено в работе [7]. УФ-спектры препаратов регистрировали в диапазоне концентраций 1–10 мкг/мл для ципрофлоксацина и 5–25 мкг/мл для доксициклина. Использовали два набора смесей: 25 калибровочных и 9 проверочных. Оптимизированные модели успешно применены для хемометрического анализа антибиотиков как в синтетических смесях, так и лекарственном препарате с открываемостью от 97.50% до 101.87% и относительной погрешностью < 2%.

Ципрофлоксацин и орнидазол при совместном присутствии определяли методами РГК и ПЛС в искусственных смесях и лекарственном препарате ZOХАN-OZ [8]. Спектры регистрировали в диапазоне длин волн от 267 до 330 нм. Для калибровки использовали 27 смесей и для валидации 9 смесей в диапазоне концентраций 2.0–12.0 мкг/мл. Открываемость составила 102% и 101.6% для определяемых веществ хемометрическими методами РГК и ПЛС.

Несмотря на успешные примеры реализации методик спектрофотометрического определения антибиотиков с использованием хемометрической обработки данных, требуется расширение круга исследуемых антибиотиков и систематическое изучение влияния природы антибиотиков и степени перекрытия их УФ-спектров на метрологические характеристики методик. Целью данной работы явилась оценка возможности спектрофотометрического определения пяти β-лактамных антибиотиков в их бинарных смесях с использованием метода проекций на латентные структуры.

Материалы и методы

Стандартные растворы антибиотиков цефуроксима, цефазолина, цефтриаксона и цефотаксима ($C = 0.01$ М) готовили из стандарта (Красфарма, Россия) путем растворения точной навески дистиллированной водой в мерных колбах вместимостью 25 мл. Раствор амоксициллина ($C = 500$ мкг/мл) – 1 таблетку (ЛП-амоксициллин, Биохимик, Россия) истерали в фарфоровой ступ-

ке, навеску 0.0050 г растворяли в воде в мерной колбе вместимостью 10 мл. Рабочие растворы ($C = 3, 7, 10, 20, 30$ мкг/мл) готовили путем дальнейшего разведения стандартных растворов. Для отделения вспомогательных веществ из растворов амоксициллина при спектрофотометрическом исследовании использовали ультразвуковую ванну «Digital Ultrasonic cleaner» (Китай).

Электронные спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 (Киото, Япония), программное обеспечение UV-Probe 2.1, в кварцевых кюветках ($l = 10$ мм). Рабочий диапазон длин волн для анализа растворов антибиотиков в системах «цефалоспорин – цефалоспорин» (Cefur-Cef, Ceftr-Ctox, Cefur-Ctox, Ceftr-Cef) составил 220–350 нм, а для системы «цефалоспорин – пенициллин» – (Cefur-Amox) – 250–320 нм, шаг регистрации – 1 нм.

Расчет методами ПЛС-1 и ПЛС-2 проводили в надстройке Chemometrics2 для Microsoft Excel, предоставленной профессором А. Л. Померанцевым [1].

Результаты и их обсуждение

Электронные спектры поглощения исследуемых антибиотиков представлены на рис. 1. Спектр раствора Cef имеет широкую полосу поглощения с максимумом при 272 нм. Электронный спектр раствора Ceftr имеет характерные максимумы при 240 и 271 нм. Cefur представлен широкой полосой поглощения с максимумом при 274 нм и плечом в районе 230 нм. Ctox имеет широкую полосу поглощения с максимумом при 235 нм и плечом в районе 260 нм. Спектр Amox имеет характерные максимумы поглощения при 227 и 272 нм и плечо при 280 нм. Таким образом, Cef, Ceftr и Cefur имеют очень близкие максимумы в диапазоне от 271 до 274 нм, а Ceftr и Ctox имеют близкие максимумы в диапазоне 235–240 нм. Спектры поглощения всех пяти антибиотиков пересекаются практически во всем исследуемом диапазоне и раздельное определение антибиотиков по оптической плотности в максимуме поглощения невозможно.

Для проверки выполнения закона аддитивности [9] построены градуировочные зависимости оптической плотности в максимуме поглощения от концентрации антибиотиков (пример показан на рис. 2) и рассчитаны их молярные коэффициенты поглощения (табл. 3).

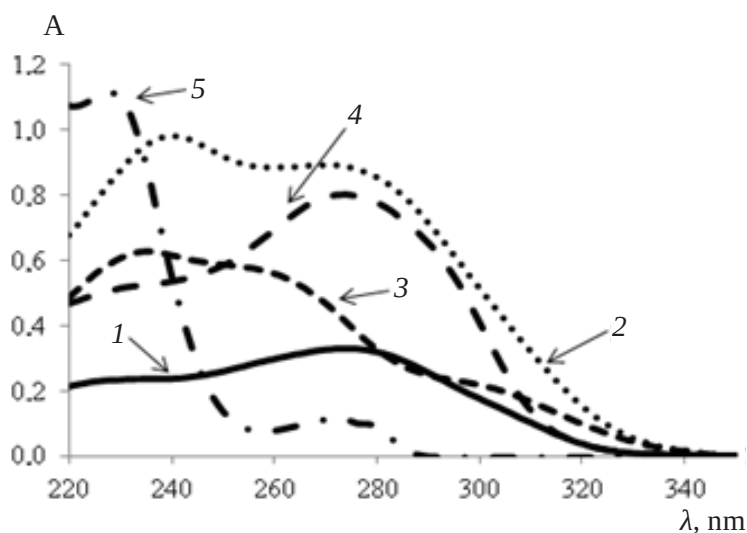


Рис. 1. Электронные спектры поглощения растворов индивидуальных антибиотиков: Cef (1); Ceft (2); Ctox (3); Cefur (4) ($C = 20 \text{ мкг/мл}$) и Amox (5) ($C = 73 \text{ мкг/мл}$)

Fig. 1. Electronic absorption spectra of solutions of individual antibiotics: Cef (1); Ceft (2); Ctox (3); Cefur (4) ($C = 20 \text{ }\mu\text{g/ml}$) and Amox (5) ($C = 73 \text{ }\mu\text{g/ml}$)

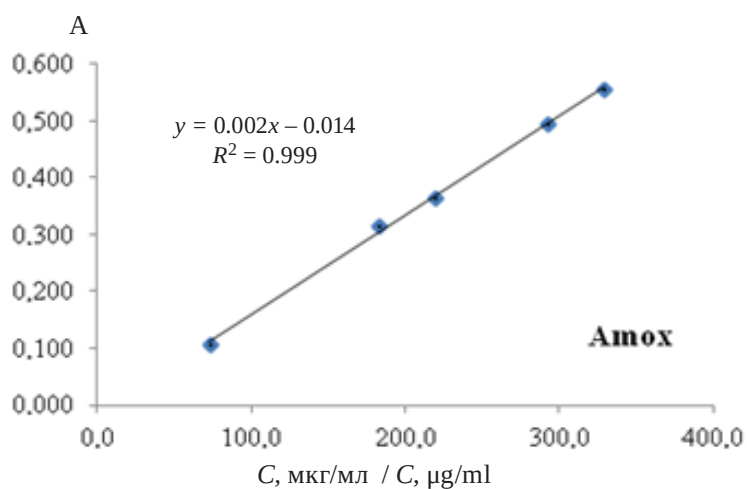


Рис. 2. Градуировочная зависимость для определения Amox

Fig. 2. Calibration curve for Amox detection

Таблица 3 / Table 3

Параметры спектров поглощения и градуировочных зависимостей исследуемых антибиотиков

Parameters of absorption spectra and calibration curves of the studied antibiotics

Антибиотик Antibiotic	$\lambda_{\text{макс}}, \text{ нм}$ $\lambda_{\text{max}}, \text{ nm}$	$\epsilon, \text{ л} \times \text{ моль}^{-1} \times \text{ см}^{-1}$	C, мкг/мл C, $\mu\text{g/ml}$	R^2
Amox	227; 272	$(6.0 \pm 0.2) \cdot 10^2$	73–330	0.999
Cefur	274	$(1.7 \pm 0.2) \cdot 10^4$	3–0	0.995
Ctox	235	$(1.7 \pm 0.2) \cdot 10^4$	3–30	0.979
Ceft	240; 271	$(3.1 \pm 1.2) \cdot 10^4$	3–30	0.966
Cef	272	$(9.1 \pm 0.2) \cdot 10^4$	3–30	0.981



В качестве обучающего набора для построения модели методом ПЛС использовали 24 бинарных смеси «цефалоспорин – цефалоспорин»: Cefur-Cef, Ceft-Ctox, Cefur-Ctox, Ceft-Cef в различных соотношениях (табл. 4). В системе «цефалоспорин – амоксициллин» Cefur-Амох спектры поглощения регистрировали для 16 бинарных смесей, содержащих различные концентрации определяемых антибиотиков (см. табл. 4). Смеси в проверочных наборах также характеризовались различными концентрациями обоих компонентов [3].

Первым этапом моделирования данных с использованием хемометрического алгоритма ПЛС является выбор оптимального числа латентных переменных (LV), которое позволяет устранить недооценку или переоценку модели. Точность многомерной градуировки принято характеризовать величиной RMSEC (среднеквадратичной ошибкой градуировки), а точность предсказания – величиной RMSEP (среднеква-

дратичной ошибкой прогноза). Эти параметры оценки точности модели связаны между собой и должны рассматриваться совместно, так как улучшение одного приводит к ухудшению другого параметра [1, 2].

Выбор оптимального числа латентных переменных проводили на основании минимального значения RMSEP, при котором, однако, не наблюдается резкого возрастания RMSEC, что определяет оптимальную сложность модели.

На рис. 3 представлены величины RMSEC и RMSEP при различном числе LV, а также зависимости «измерено – предсказано» на примере реализации метода ПЛС-2 для системы Cefur – Cef.

При построении проекционного пространства метод ПЛС-1 учитывает значения матрицы X и один отклик Y (т.е. концентрацию одного антибиотика), в результате получается несколько проекционных подпространств в отдельности для каждого компонента, а в методе ПЛС-2

Таблица 4 / Table 4

Концентрации антибиотиков в бинарных смесях для обучающего и проверочного* набора
Concentrations of antibiotics in binary mixtures for the training and validation* sets

Смеси: Cefur-Cef; Ceft-Ctox; Cefur-Ctox; Ceft-Cef Mixtures: Cefur-Cef; Ceft-Ctox; Cefur-Ctox; Ceft-Cef												
№ смеси Mix No	1	2*	3	4	5	6*	7	8	9	10*	11	12 ^c
C, мкг/мл µg/ml	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23	25
	27	25	23	21	19	17	15	13	11	9	7	5
№ смеси Mix No	13	14	15	16	17	18*	19	20	21	22	23	24
C, мкг/мл µg/ml	27	3	5	7	9	10	11	13	15	17	10	15
	3	17	15	13	11	10	19	7	5	3	15	10
Смесь Cefur-Амох Cefur-Amox Mixture												
№ смеси Mix No	1	2 ^{a,b,c}	3	4	5	6 ^{a,b}	7	8				
C, мкг/мл µg/ml	5	10	20	30	5	10	20	30				
	95	90	80	70	85	85	85	85				
№ смеси Mix No	9	10^b	11^c	12^a	13^b	14^a	15^c	16^c				
C, мкг/мл µg/ml	5	5	5	5	20	20	20	20				
	140	130	120	110	140	130	120	110				

Примечание. а – проверочный набор для Cefur (ПЛС-1); б – проверочный набор для Амох (ПЛС-1); с – проверочный набор для метода Cefur–Амох (ПЛС-2).

Note. a – validation set for Cefur (PLS-1); b – validation set for Amox (PLS-1); c – validation set for mixtures the Cefur–Amox method (PLS-2).

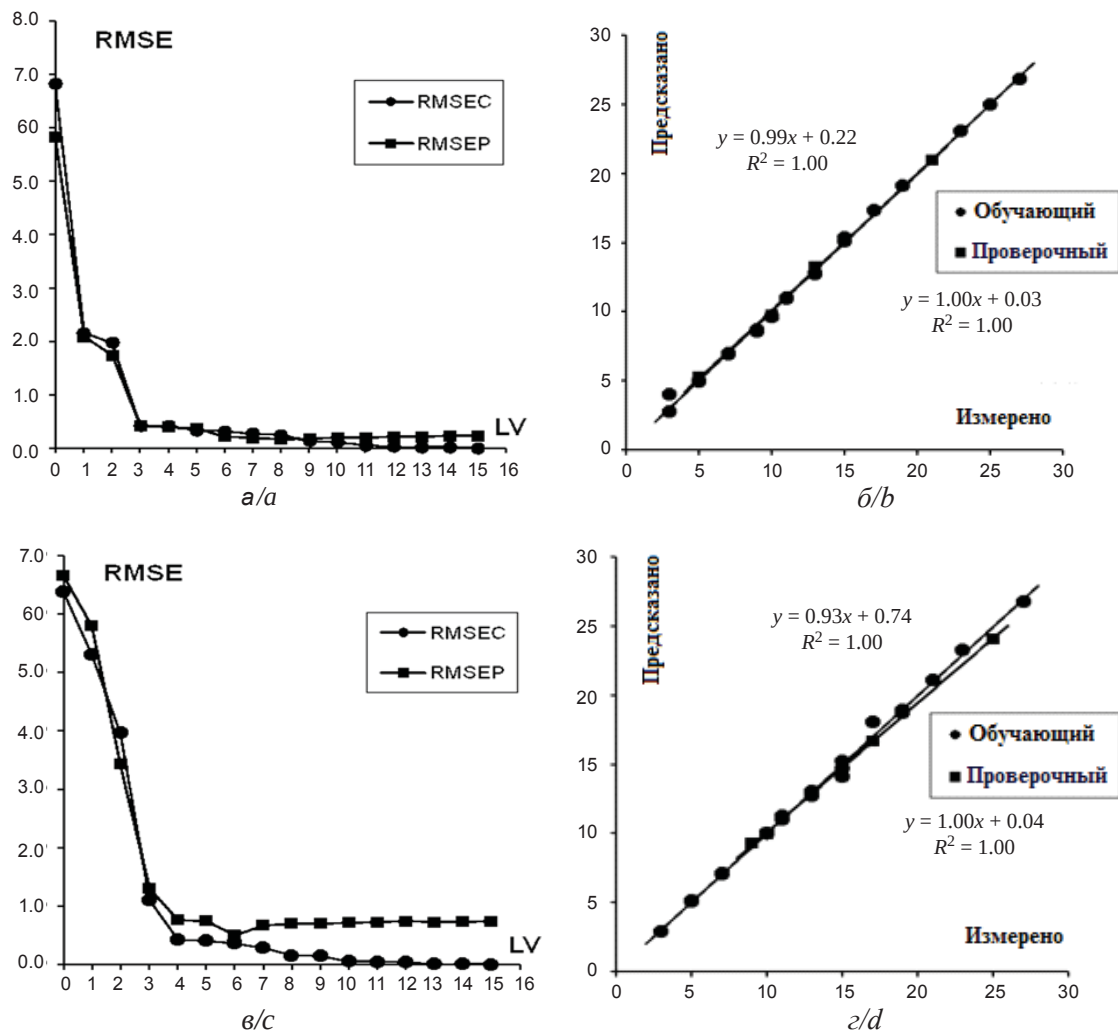


Рис. 3. Зависимости RMSE от числа LV (а, в) и зависимости «измерено – предсказано» (б, д) при определении Cefur (а, б) и Cef (в, д) в их смеси методом ПЛС-2

Fig. 3. RMSE vs LV numbers (a, c) and “predicted – measured” dependences for the Cefur (a, b) and Cef (c, d) determination in their mixture using the PLS-2 method

отклики Y (концентрации обоих антибиотиков) рассматриваются как общее подпространство [1, 2]. Основные параметры моделей для определения антибиотиков в смесях «цефалоспорин – цефалоспорин» и «цефалоспорин – амоксициллин» суммированы в табл. 5.

Как видно из данных табл. 5, зависимости «измерено – предсказано» имеют линейный вид с тангенсом наклона близким к 1 и свободным членом близким к нулю (кроме Атох); квадрат коэффициента аппроксимации близок к 1; что говорит о высоком качестве моделей. Можно отметить, что при использовании метода ПЛС-2 для второго компонента в смеси наблюдаются большие значения RMSEC и RMSEP, особенно в случае системы «цефалоспорин – амоксициллин».

Определение содержания антибиотиков в проверочных смесях проводили при оптимальном числе LV. Для систем «цефалоспорин – цефалоспорин» и «цефалоспорин – амоксициллин» полученные данные приведены в табл. 6 и на рис. 4. Видно, что наибольшая ошибка наблюдается при определении Атох, что, вероятно, связано с его низким коэффициентом молярного поглощения света.

Сравнивая результаты определения антибиотиков методами ПЛС-1 и ПЛС-2, можно вести речь о зависимости погрешности определения не только от метода, но и концентрации веществ в смеси. Наибольшая погрешность при определении методом ПЛС-1 в системах «цефалоспорин – цефалоспорин» наблюдается в смеси Cefur–Cef (C = 5 : 25 мкг/мл), которая



Таблица 5 / Table 5

Параметры ПЛС моделей для систем «цефалоспори́н – цефалоспори́н»
и «цефалоспори́н – амоксицилли́н»

Parameters of PLS models for the “cephalosporin – cephalosporin” and “cephalosporin – amoxicillin” systems

Смесь Mix	Метод Method	Аналит Analyte	Число LV	Обучающий набор / Training set			Проверочный набор / Test set		
				Уравнение Equation	R ²	RMSEC	Уравнение Equation	R ²	RMSEP
Cefur- Ctox	ПЛС1	Cefur	3	$y = 1.00x + 0.03$	1.00	0.33	$y = 0.99x - 0.01$	1.00	0.38
		Ctox	5	$y = 1.00x + 0.01$	1.00	0.11	$y = 0.93x + 0.72$	1.00	0.71
	ПЛС2	Cefur	5	$y = 1.00x + 0.03$	1.00	0.33	$y = 0.97x + 0.24$	1.00	0.44
		Ctox	5	$y = 1.00x + 0.02$	1.00	0.23	$y = 0.94x + 0.47$	1.00	0.61
Cefur- Cef	ПЛС1	Cefur	5	$y = 1.00x + 0.04$	1.00	0.36	$y = 1.03x - 0.48$	1.00	0.31
		Cef	7	$y = 1.00x + 0.01$	1.00	0.11	$y = 1.01x - 0.31$	1.00	0.37
	ПЛС2	Cefur	6	$y = 1.00x + 0.03$	1.00	0.27	$y = 0.99x + 0.22$	1.00	0.19
		Cef	6	$y = 1.00x + 0.04$	1.00	0.37	$y = 0.93x + 0.74$	1.00	0.51
Ceft- Ctox	ПЛС1	Ceft	2	$y = 1.00x + 0.06$	1.00	0.43	$y = 1.01x + 0.07$	1.00	0.16
		Ctox	4	$y = 1.00x + 0.01$	1.00	0.10	$y = 1.00x + 0.02$	1.00	0.11
	ПЛС2	Ceft	3	$y = 1.00x + 0.05$	1.00	0.43	$y = 1.00x + 0.14$	1.00	0.15
		Ctox	5	$y = 1.00x + 0.01$	1.00	0.12	$y = 1.00x + 0.01$	1.00	0.97
Ceft- Cef	ПЛС1	Ceft	3	$y = 1.00x + 0.01$	1.00	0.09	$y = 1.02x - 0.11$	1.00	0.22
		Cef	4	$y = 1.00x + 0.01$	1.00	0.11	$y = 0.97x + 0.21$	1.00	0.28
	ПЛС2	Ceft	5	$y = 1.00x + 0.01$	1.00	0.08	$y = 1.01x - 0.01$	1.00	0.21
		Cef	3	$y = 1.00x + 0.01$	1.00	0.18	$y = 0.98x + 0.01$	1.00	0.31
Cefur- Amox	ПЛС1	Cefur	3	$y = 1.00x + 0.01$	1.00	0.15	$y = 1.00x + 0.07$	1.00	0.07
		Amox	2	$y = 0.95x + 4.66$	0.95	4.73	$y = 0.81x + 22.11$	0.87	7.83
	ПЛС2	Cefur	3	$y = 1.00x + 0.01$	1.00	0.09	$y = 0.99x + 0.05$	1.00	0.07
		Amox	3	$y = 0.97x + 3.74$	0.97	4.19	$y = 0.96x + 13.32$	0.92	9.57

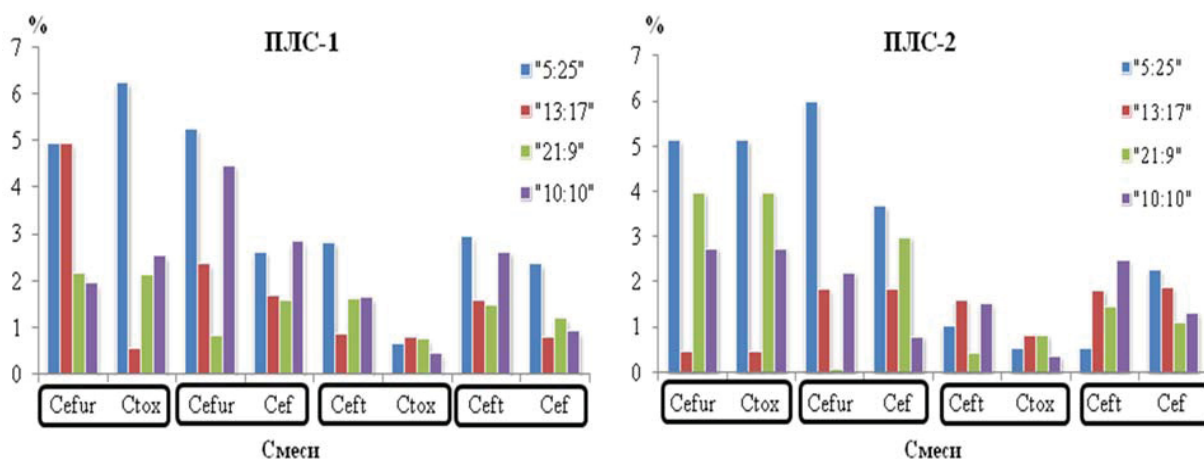


Рис. 4. Погрешности определения антибиотиков в проверочном наборе для систем «цефалоспори́н – цефалоспори́н» методами ПЛС-1 и ПЛС-2 (цвет онлайн)

Fig. 4. Relative errors of the antibiotics determination in the validation set for the “cephalosporin – cephalosporin” systems using the PLS-1 and PLS-2 methods (color online)

Погрешности определения антибиотиков в проверочном наборе
Errors in determining antibiotics in the validation set

Системы «цефалоспорин – цефалоспорин» «Cephalosporin – cephalosporin» systems							
Смесь Mix	Компонент Analyte	№ смеси Mix No	Соотношение антибиотиков Antibiotics ratio	Относительная погрешность, % Relative error, %			
				1-й компонент 1st component		2-й компонент 2nd component	
				ПЛС-1 PLS-1	ПЛС-2 PLS-2	ПЛС-1 PLS-1	ПЛС-2 PLS-2
Cefur- Ctox	1. Cefur 2. Ctox	2	5:25	4.94	5.13	6.22	5.13
		6	13:17	4.93	0.45	0.53	0.45
		10	21:9	2.14	3.98	2.13	3.98
		18	10:10	1.93	2.74	2.51	2.74
Cefur- Cef	1. Cefur 2. Cef	2	5:25	5.23	5.98	2.61	3.67
		6	13:17	2.35	1.83	1.68	1.84
		10	21:9	0.81	0.07	1.57	2.99
		18	10:10	4.46	2.20	2.82	0.79
Ceft- Ctox	1. Ceft 2. Ctox	2	5:25	2.81	1.01	0.63	0.53
		6	13:17	0.85	1.61	0.79	0.83
		10	21:9	1.60	0.44	0.75	0.82
		18	10:10	1.62	1.51	0.45	0.34
Ceft- Cef	1. Ceft 2. Cef	2	5:25	2.93	0.53	2.35	2.25
		6	13:17	1.55	1.81	0.78	1.87
		10	21:9	1.46	1.45	1.19	1.11
		18	10:10	2.61	2.47	0.90	1.31
Система «цефалоспорин – амоксициллин» «Cephalosporin – amoxicillin» system							
Метод Method	ПЛС-1 PLS-1			ПЛС-2 PLS-2			
Компонент Analyte	№	Соотношение антибиотиков Antibiotics ratio	Относительная погрешность, % Relative error, %	№	Соотношение Ratio	Относительная погрешность, % Relative error, %	
1. Cefur	2	10:90	1.04	2	10:90	0.70	
	6	10:85	0.96	11	5:120	1.17	
	12	5:110	0.24	15	20:120	0.47	
	14	20:130	0.13	16	20:110	0.22	
2. Амох	2	10:90	14.69	2	10:90	8.67	
	6	10:85	5.61	11	5:120	4.34	
	10	5:130	2.59	15	20:120	6.65	
	13	20:140	5.50	16	20:110	13.32	



составила для цефуроксима – 5.23% и цефотоксима – 6.22%. Погрешность определения в остальных случаях не превышает 5%. Метод ПЛС-2 показывает результаты незначительно хуже в сравнении с ПЛС-1. Так, цефуроксим определяется с погрешностями 5.13; и 5.98% в смесях Cefur:Stox и Cefur:Cef ($C = 5 : 25$ мкг/мл).

В системе «цефалоспорины – амоксициллин» погрешность определения Cefur методом ПЛС-1 не превышает 1.5%, Атох – 14.69%. Метод ПЛС-2 показывает погрешность определения не более 1.17 для Cefur, тогда как для Атох – 13.3%.

Заключение

Показана возможность раздельного спектрофотометрического определения антибиотиков цефалоспоринового и пенициллинового рядов в их смесях проекционными методами ПЛС-1 и ПЛС-2. Оценены среднеквадратичные ошибки калибровки и прогноза, на основании которых подобрано оптимальное число латентных переменных для каждой системы и метода. Установлено, что все исследованные модели дают высокие значения квадрата коэффициента аппроксимации и тангенсы угла наклона зависимостей «измерено – предсказано» близкие к единице, что позволяет рекомендовать эти методы для практического использования.

Список литературы

1. Померанцев А. Л. Хемометрика в Excel: учебное пособие. Томск : Издательство Томского политехнического университета, 2014. 435 с.
2. Кучерявский С., Панчук В., Монахова Ю., Кирсанов Д. Введение в хемометрику. URL: <https://www.chemometrics.ru/media/documents/site/Введение-в-хемометрику.pdf> (дата обращения: 15.09.2023).
3. Силаев Д. В., Шестопалова Н. Б., Фомина Ю. А., Русанова Т. Ю. Применение хемометрических алгоритмов для спектрофотометрического определения синтетических пищевых красителей E110 и E124 // Известия высших учебных заведений. Химия и химическая технология. 2022. Т. 65, № 2. С. 50–59. <https://doi.org/10.6060/ivkkt.20226502.6497>
4. Attia K. A., Nassar M. W., El-Zeiny M. B., Serag A. Effect of genetic algorithm as a variable selection method on different chemometric models applied for the analysis of binary mixture of amoxicillin and flucloxacillin: A comparative study // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2016. Vol. 156. P. 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.11.024>
5. Mohamed A. E. M. I., Abdelmageed O. H., Refaat I. H. Determination of two antibacterial binary mixtures by

chemometrics-assisted spectrophotometry // Journal of AOAC International. 2007. Vol. 90, № 1. P. 128–141. <https://doi.org/10.1093/jaoac/90.1.128>

6. Gandhi S. V., Patil D., Baravkar A. A. Comparison of Chemometric assisted UV Spectrophotometric and RP-HPLC Method for the simultaneous determination of Ofloxacin and Tinidazole in their Combined dosage form // Research Journal of Pharmacy and Technology. 2021. Vol. 14, № 11. P. 5713–5718. <https://doi.org/10.52711/0974-360X.2021.00993>
7. Eticha T. Khsay G., Asefa F., Hailu T., Gebretsadik H., Gebretsadikan T., Thangabalan B. Chemometric-Assisted spectrophotometric method for the simultaneous determination of ciprofloxacin and doxycycline hyclate in pharmaceutical formulations // Journal of Analytical Methods in Chemistry. 2018. Vol. 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/9538435>
8. Gandhi S. V., Waghmare A. D., Nadwani Y. S., Mutha A. S. Chemometrics-assisted UV spectrophotometric method for determination of ciprofloxacin and ornidazole in pharmaceutical formulation // ARC Journal of Pharmaceutical Sciences. 2017. Vol. 3, № 1. P. 19–25. <http://dx.doi.org/10.20431/2455-1538.0301005>
9. Силаев Д. В., Шестопалова Н. Б., Фомина Ю. А., Русанова Т. Ю. Определение синтетических пищевых красителей E110 и E124 при совместном присутствии методами Фирордта и производной спектрофотометрии // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2019. Т. 19, вып. 3. С. 257–267. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2019-19-3-257-267>

References

1. Pomerantsev A. L. *Khemometrika v Excel: uchebnoe posobie* [Chemometrics in Excel: Textbook]. Tomsk, Tomsk Polytechnic University Publ., 2014. 435 p. (in Russian).
2. Kucheryavsky S., Panchuk V., Monakhova Yu., Kirsanov D. *Vvedenie v khemetriku* [Introduction to Chemometrics]. Available at: <https://www.chemometrics.ru/media/documents/site/Introduction-to-chemometrics.pdf> (accessed September 15, 2023) (in Russian).
3. Silaev D. V., Shestopalova N. B., Fomina Yu. A., Rusanova T. Yu. Application of chemometric algorithms for spectrophotometric determination of synthetic food dyes E110 and E124. *News of Higher Educational Institutions. Chemistry and Chemical Technology*, 2022, vol. 65, no. 2, pp. 50–59 (in Russian). <https://doi.org/10.6060/ivkkt.20226502.6497>
4. Attia K. A., Nassar M. W., El-Zeiny M. B., Serag A. Effect of genetic algorithm as a variable selection method on different chemometric models applied for the analysis of binary mixture of amoxicillin and flucloxacillin: A comparative study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2016, vol. 156, pp. 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.11.024>



5. Mohamed A. E. M. I., Abdelmageed O. H., Refaat I. H. Determination of two antibacterial binary mixtures by chemometrics-assisted spectrophotometry. *Journal of AOAC International*, 2007, vol. 90, no. 1, pp. 128–141. <https://doi.org/10.1093/jaoac/90.1.128>
6. Gandhi S. V., Patil D., Baravkar A. A. Comparison of chemometric assisted UV spectrophotometric and RP-HPLC method for the simultaneous determination of Ofloxacin and Tinidazole in their combined dosage form. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 2021, vol. 14, no. 11, pp. 5713–5718. <https://doi.org/10.52711/0974-360X.2021.00993>
7. Eticha T. Khsay G., Asefa F., Hailu T., Gebretsadik H., Gebretsadikan T., Thangabalan B. Chemometric-Assisted spectrophotometric method for the simultaneous determination of ciprofloxacin and doxycycline hyclate in pharmaceutical formulations. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2018, vol. 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/9538435>
8. Gandhi S. V., Waghmare A. D., Nadwani Y. S., Mutha A. S. Chemometrics-assisted UV spectrophotometric method for determination of ciprofloxacin and ornidazole in pharmaceutical formulation. *ARC Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2017, vol. 3, no. 1, pp. 19–25. <http://dx.doi.org/10.20431/2455-1538.0301005>
9. Silaev D. V., Shestopalova N. B., Fomina Yu. A., Rusanova T. Yu. Determination of synthetic food dyes E110 and E124 in their joint presence using Firordt methods and derivative spectrophotometry. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2019, vol. 19, iss. 3, pp. 257–267 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2019-19-3-257-267>

Поступила в редакцию 11.09.2023; одобрена после рецензирования 18.09.2023; принята к публикации 21.09.2023
The article was submitted 11.09.2023; approved after reviewing 18.09.2023; accepted for publication 21.09.2023



Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 4. С. 404–410

Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology, 2023, vol. 23, iss. 4, pp. 404–410

<https://ichbe.sgu.ru>

<https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-4-404-410>, EDN: CPGXYP

Научная статья

УДК 547.841



5-(1-Арил-3-оксо-3-фенилпропил)-2,2-диметил-1,3-диоксан-4,6-дионы: синтез и реакции с N-нуклеофилами

Д. М. Мухомодьярова , Д. Н. Ибрагимова

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

Мухомодьярова Динара Маратовна, студент Института химии, dina2002@list.ru, <https://orcid.org/0009-0005-3331-5476>

Ибрагимова Диана Нуржановна, кандидат химических наук, доцент кафедры органической и биоорганической химии Института химии, kumargalieva.diana@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8196-7587>

Аннотация. 2,2-Диметил-1,3-диоксан-4,6-дион (кислота Мельдрума, изопропилиденмалонат) благодаря структурным особенностям широко используется химиками-синтетиками. Двойственный характер реакционной способности кислоты Мельдрума (как электрофильного, так и/или нуклеофильного реагента) обуславливает синтетическую ценность при построении новых гетероциклических систем с практически значимыми свойствами. В ряду соединений, содержащих в своей структуре 2,2-диметил-1,3-диоксан-4,6-дионовый фрагмент, выявлен широкий спектр биологической активности. Анализ периодической печати свидетельствует о крайне малом объеме литературы по получению и химическим свойствам 5-(1-арил-3-оксо-3-фенилпропил)-2,2-диметил-1,3-диоксан-4,6-дионов, что является значительным упущением. Представлялось интересным получение 1,5-дикарбонильных соединений на основе кислоты Мельдрума как удобных субстратов дальнейших нуклеофильных превращений в системы, обладающие биологической активностью. Нами впервые проведена реакция 2,2-диметил-1,3-диоксан-4,6-диона с 3-арил-1-фенилпроп-2-ен-1-онами при перемешивании в среде этилового спирта в присутствии каталитического количества L-пролина, в результате которой получены соответствующие 5-(1-арил-3-оксо-3-фенилпропил)-2,2-диметил-1,3-диоксан-4,6-дионы. Введение 5-(1-(4-метоксифенил)-3-оксо-3-фенилпропил)-2,2-диметил-1,3-диоксан-4,6-диона в реакцию с N-нуклеофилами (солянокислым гидросиламином, мочевиной, тиомочевиной и солянокислым семикарбазидом) привело к образованию продуктов нуклеофильной атаки карбонильной группы ациклического фрагмента субстрата. Состав и строение полученных соединений установлены на основании данных элементного анализа и ЯМР ^1H , ^{13}C спектроскопии, гетероядерной корреляции HSQC.

Ключевые слова: кислота Мельдрума, диметилдиоксандион, изопропилиденмалонат, 1,5-дикарбонильные соединения, N-нуклеофил, спектроскопия

Для цитирования: Мухомодьярова Д. М., Ибрагимова Д. Н. 5-(1-Арил-3-оксо-3-фенилпропил)-2,2-диметил-1,3-диоксан-4,6-дионы: синтез и реакции с N-нуклеофилами // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 4. С. 404–410. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-4-404-410>, EDN: CPGXYP

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

Article

5-(1-Aryl-3-oxo-3-phenylpropyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4,6-diones: synthesis and reactions with N-nucleophiles

D. M. Mukhomodyarova , D. N. Ibragimova

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

Dinara M. Mukhomodyarova, dina2002@list.ru, <https://orcid.org/0009-0005-3331-5476>

Diana N. Ibragimova, kumargalieva.diana@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8196-7587>

Abstract. 2,2-Dimethyl-1,3-dioxane-4,6-dione (Meldrum acid, isopropylidene malonate) is widely used by synthetic chemists due to its structural features. The dual nature of the reactivity of Meldrum acid (both electrophilic and/or nucleophilic reagent) determines the synthetic value in the construction of new heterocyclic systems with practically significant properties. A wide range of biological activity has been revealed in a number of compounds containing a 2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4,6-dione fragment in their structure. Analysis of periodicals indicates an extremely small volume of literature on the preparation and chemical properties of 5-(1-aryl-3-oxo-3-phenylpropyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4,6-diones, which is a significant omission. It has seemed interesting to obtain 1,5-dicarbonyl compounds based on Meldrum acid as convenient substrates for further nucleophilic transformations into systems with biological activity. For the first time, we have carried out the reaction of 2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4,6-dione with 3-aryl-1-phenylprop-2-en-1-ones by stirring in an ethyl alcohol medium in the presence of a catalytic



amount of L-proline, which resulted in the corresponding 5-(1-aryl-3-oxo-3-phenylpropyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4,6-diones. The introduction of 5-(1-(4-methoxyphenyl)-3-oxo-3-phenylpropyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4,6-dione in reaction with N-nucleophiles (hydroxylamine hydrochloride, urea, thiourea and semicarbazide hydrochloride) has led to the formation of nucleophilic attack products of the carbonyl group of the acyclic fragment the substrate. The composition and structure of the obtained compounds have been established on the basis of elemental analysis and NMR ^1H , ^{13}C spectroscopy, heteronuclear correlation of HSQC.

Keywords: Meldrum's acid, dimethyldioxanedione, isopropylidene malonate, 1,5-dicarbonyl compounds, N-nucleophile, spectroscopy

For citation: Mukhomodyarova D. M., Ibragimova D. N. 5-(1-Aryl-3-oxo-3-phenylpropyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4,6-diones: Synthesis and reactions with N-nucleophiles. *Izvestiya Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2023, vol. 23, iss. 4, pp. 404–410 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-4-404-410>, EDN: CPGXYP

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

Введение

Согласно литературным данным соединения, включающие в свою структуру 2,2-диметил-1,3-диоксан-4,6-дионовый фрагмент, обладают антиоксидантной [1, 2], противомаларийной [3], антибактериальной [4–7] активностями, а также могут служить ингибиторами агрегации тромбоцитов [8].

1,5-Дикарбонильные соединения на основе кислоты Мельдрума и α,β -непредельных ароматических кетонов представляют большой интерес с точки зрения их функционализации и возможной дальнейшей гетероциклизации за счет взаимодействия 1,5-диоксофрагмента с различными азануклеофильными реагентами, приводящего к системам с потенциально высокой биологической активностью.

В связи с вышесказанным целью настоящей работы явился синтез 5-(1-арил-3-оксо-3-фенилпропил)-2,2-диметил-1,3-диоксан-4,6-дионов, а также исследование поведения 5-(1-(4-метоксифенил)-3-оксо-3-фенилпропил)-2,2-диметил-1,3-диоксан-4,6-диона в реакциях с моно- и биазануклеофильными реагентами.

Материалы и методы

Элементный анализ осуществлен на CHNS анализаторе Elementar Vario Micro cube (Elementar Analysensysteme GmbH, Германия). Спектры ЯМР ^1H (400 МГц), ^{13}C (100 МГц), HSQC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ регистрировались на спектрометре Varian 400 (Varian (Agilent), США) в CDCl_3 и $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$, внутренний стандарт – ТМС. Ход реакции контролировали методом ТСХ на пластинках Alugram® Sil G UV254 (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Германия), элюент – гексан:этилацетат : хлороформ (3:2:1), проявляли в УФ.

Методика синтеза 5-(1-арил-3-оксо-3-фенилпропил)-2,2-диметил-1,3-диоксан-4,6-дионов (5–7)

В конической колбе растворяют 0,69 ммоль 2,2-диметил-1,3-диоксан-4,6-диона (**1**) в 15 мл этилового спирта, при перемешивании добавляют 0,43 ммоль L-пролина и через 10 мин 0,69 ммоль 3-арил-1-фенилпроп-2-ен-1-она (**2–4**). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре. По окончании реакции продукт отфильтровывают и сушат на воздухе и в эксикаторе.

5-(1-(4-Бромфенил)-3-оксо-3-фенилпропил)-2,2-диметил-1,3-диоксан-4,6-дион (5)

Выход 75%, $T_{\text{пл.}} = 114\text{--}115^\circ\text{C}$. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (CDCl_3): 1.51 (с., 3H, CH_3), 1.71 (с., 3H, CH_3), 3.55–3.62 (д.д., 1H, CH_2), 4.19–4.26 (д.д., 1H, CH_2), 4.35 (д., 1H, $\text{CH}_{\text{метин}}$), 4.44–4.47 (м., 1H, $\text{CH}_{\text{метин}}$), 7.34 (д., 2H, $\text{CH}_{\text{аром}}$), 7.42–7.51 м.д. (м., 4H, $\text{CH}_{\text{аром}}$), 7.58 (т., 1H, $\text{CH}_{\text{аром}}$), 7.98 (д., 2H, $\text{CH}_{\text{аром}}$). Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м. д. (CDCl_3): 27.58 (CH_3), 28.14 (CH_3), 38.95 ($\text{CH}_{\text{метин}}$), 40.58 (CH_2), 49.20 (C^5), 105.22 (C^2), 121.76–138.89 (Ar), 164.85 (C=O), 165.19 (C=O), 198.80 (C=O). $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{BrO}_5$. Найдено, %: C 58.62; H 4.61. Вычислено, %: C 58.48; H 4.44.

5-(1-(4-Хлорфенил)-3-оксо-3-фенилпропил)-2,2-диметил-1,3-диоксан-4,6-дион (6)

Выход 74%, $T_{\text{пл.}} = 121\text{--}122^\circ\text{C}$. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (CDCl_3): 1.50 (с., 3H, CH_3), 1.71 (с., 3H, CH_3), 3.55–3.62 (д.д., 1H, CH_2), 4.20–4.27 (д.д., 1H, CH_2), 4.35 (д., 1H, $\text{CH}_{\text{метин}}$), 4.46–4.50 (м., 1H, $\text{CH}_{\text{метин}}$), 7.38–7.61 (м., 7H, $\text{CH}_{\text{аром}}$), 7.97 (д., 2H, $\text{CH}_{\text{аром}}$). Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м. д. (CDCl_3): 27.59 (CH_3), 28.12 (CH_3), 38.95 ($\text{CH}_{\text{метин}}$), 40.59 (CH_2), 49.20 (C^5), 105.22 (C^2), 128.69–136.98 (Ar), 164.84 (C=O), 165.19 (C=O), 198.81 (C=O). $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{ClO}_5$. Найдено, %: C 65.54; H 5.13. Вычислено, %: C 65.20; H 4.95.

5-(1-(4-Метоксифенил)-3-оксо-3-фенилпропил)-2,2-диметил-1,3-диоксан-4,6-дион (7)

Выход 72%, $T_{\text{пл.}} = 116\text{--}117^\circ\text{C}$. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$): 1.41 (с., 3H, CH_3), 1.75 (с., 3H, CH_3), 3.75 (с., 3H, OCH_3), 3.81–3.87 (д.д., 1H,



CH_2), 4.01–4.07 (д.д., 1H, CH_2), 4.48–4.52 (м., 2H, $\text{CH}_{\text{метин}}$), 6.84 (д., 2H, $\text{CH}_{\text{аром}}$, 8 Гц), 7.34 (д., 2H, $\text{CH}_{\text{аром}}$), 7.52 (т., 2H, $\text{CH}_{\text{аром}}$), 7.63 (т., 1H, $\text{CH}_{\text{аром}}$), 8.04 (д., 2H, $\text{CH}_{\text{аром}}$). Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м. д. ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$): 26.60 (CH_3), 27.51 (CH_3), 38.61 ($\text{CH}_{\text{метин}}$), 41.00 (CH_2), 50.21 (C^5), 54.55 (OCH_3), 104.90 (C^2), 130.11–137.10 (Ar), 165.19 (C=O), 165.27 (C=O), 198.08 (C=O). $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_6$. Найдено, %: C 70.01; H 5.84. Вычислено, %: C 69.10; H 5.80.

Взаимодействие 5-(1-(4-метоксифенил)-3-оксо-3-фенилпропил)-2,2-диметил-1,3-диоксан-4,6-диона с N-нуклеофильными реагентами

В конической колбе растворяют 0,26 ммоль 5-(1-(4-метоксифенил)-3-оксо-3-фенилпропил)-2,2-диметил-1,3-диоксан-4,6-диона (7) в 15 мл растворителя, при перемешивании добавляют 0,26 ммоль соответствующего N-нуклеофильного реагента. Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре. По окончании реакции смесь упаривают на воздухе, промывают водой, фильтруют и сушат на воздухе и в эксикаторе.

5-(3-(Гидроксиимино)-1-(4-метоксифенил)-3-фенилпропил)-2,2-диметил-1,3-диоксан-4,6-дион (12)

Реагент – солянокислый гидроксиламин, растворитель – этиловый спирт. Выход 58%, $T_{\text{пл.}} = 86\text{--}88^\circ\text{C}$. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$): 1.41 (с., 3H, CH_3), 1.76 (с., 3H, CH_3), 3.46–3.54 (д.д., 1H, CH_2), 3.62–3.68 (д.д., 1H, CH_2), 3.71 (с., 3H, OCH_3), 3.90 (д., 1H, $\text{CH}_{\text{метин}}$), 4.08–4.14 (т., 1H, $\text{CH}_{\text{метин}}$), 7.33 (с., 1H, OH), 6.77–7.94 (9H, $\text{CH}_{\text{аром}}$). Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м. д. ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$): 26.85 (CH_3), 27.12 (CH_3), 40.16 ($\text{CH}_{\text{метин}}$), 42.67 (CH_2), 54.43 (OCH_3), 57.12 (C^5), 105.83 (C^2), 113.33–158.50 (Ar), 155.66 (C=N), 168.51 (C=O), 169.32 (C=O). $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{NO}_6$. Найдено, %: C 65.98; H 5.80; N 3.13. Вычислено, %: C 66.49; H 5.83; N 3.52.

1-(3-(2,2-Диметил-4,6-диоксо-1,3-диоксан-5-ил)-3-(4-метоксифенил)-1-фенилпропилиден) мочевины (13)

Реагент – мочевины, растворитель – уксусная кислота. Выход 54%, $T_{\text{пл.}} = 130\text{--}131^\circ\text{C}$. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$): 1.40 (с., 3H, CH_3), 1.75 (с., 3H, CH_3), 3.43–3.50 (д.д., 1H, CH_2), 3.62–3.69 (д.д., 1H, CH_2), 3.71 (с., 3H, OCH_3), 3.88 (д., 1H, $\text{CH}_{\text{метин}}$), 4.09–4.13 (м., 1H, $\text{CH}_{\text{метин}}$), 5.37 (с., 2H, NH_2), 6.76–7.95 (9H, $\text{CH}_{\text{аром}}$). Спектр

ЯМР ^{13}C , δ , м. д. ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$): 26.90 (CH_3), 27.14 (CH_3), 40.15 ($\text{CH}_{\text{метин}}$), 42.66 (CH_2), 54.42 (OCH_3), 57.12 (C^5), 104.70 (C^2), 113.32–158.50 (Ar), 168.90 (C=N), 146.76 (C=O), 168.48 (C=O), 169.31 (C=O). $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_6$. Найдено, %: C 64.81; H 5.62; N 6.28. Вычислено, %: C 65.08; H 5.70; N 6.60.

1-(3-(2,2-Диметил-4,6-диоксо-1,3-диоксан-5-ил)-3-(4-метоксифенил)-1-фенилпропилиден) тиомочевина (14)

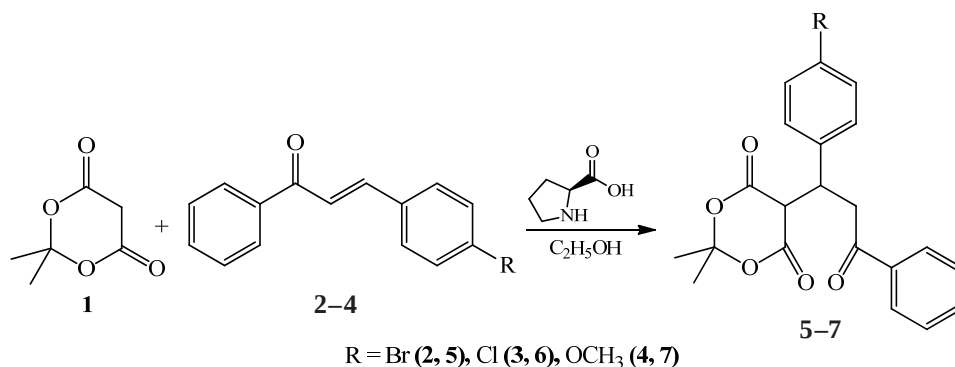
Реагент – тиомочевина, растворитель – уксусная кислота. Выход 58%, $T_{\text{пл.}} = 141\text{--}142^\circ\text{C}$. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$): 1.42 (с., 3H, CH_3), 1.76 (с., 3H, CH_3), 3.48–3.53 (д.д., 1H, CH_2), 3.62–3.69 (д.д., 1H, CH_2), 3.71 (с., 3H, OCH_3), 3.89 (д., 1H, $\text{CH}_{\text{метин}}$), 4.08–4.13 (м., 1H, $\text{CH}_{\text{метин}}$), 5.82 (с., 2H, NH_2), 6.76–7.95 (9H, $\text{CH}_{\text{аром}}$). Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м. д. ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$): 26.91 (CH_3), 27.41 (CH_3), 40.17 ($\text{CH}_{\text{метин}}$), 42.66 (CH_2), 54.41 (OCH_3), 57.08 (C^5), 104.71 (C^2), 113.32–158.49 (Ar), 168.08 (C=N), 168.57 (C=O), 169.39 (C=O), 194.41 (C=S). $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$. Найдено, %: C 63.26; H 5.96; N 6.52. Вычислено, %: C 62.71; H 5.49; N 6.36.

2-(3-(2,2-Диметил-4,6-диоксо-1,3-диоксан-5-ил)-3-(4-метоксифенил)-1-фенилпропилиден) гидразинкарбоксамид (15)

Реагент – солянокислый семикарбазид, растворитель – этиловый спирт. Выход 70%, $T_{\text{пл.}} = 128\text{--}129^\circ\text{C}$. Спектр ЯМР ^1H , δ , м. д. (CDCl_3): 1.38 (с., 3H, CH_3), 1.68 (с., 3H, CH_3), 3.53–3.59 (д.д., 1H, CH_2), 4.17–4.28 (д.д., 1H, CH_2), 3.78 (с., 3H, OCH_3), 4.31 (д., 1H, $\text{C}^5\text{H}_{\text{метин}}$), 4.39–4.46 (м., 1H, $\text{CH}_{\text{метин}}$), 6.83–8.01 (9H, $\text{CH}_{\text{аром}}$), 7.20 (с., 2H, NH_2), 9.17 (с., 1H, NH). Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м. д. (CDCl_3): 27.87 (CH_3), 28.17 (CH_3), 39.19 ($\text{CH}_{\text{метин}}$), 40.99 (CH_2), 49.46 (C^5), 55.23 (OCH_3), 105.14 (C^2), 114.04–159.00 (Ar), 176.24 (C=N), 165.16 (C=O), 165.52 (C=O), 173.52 (C=O). $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_6$. Найдено, %: C 62.41; H 5.38; N 9.12. Вычислено, %: C 62.86; H 5.73; N 9.56.

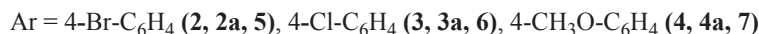
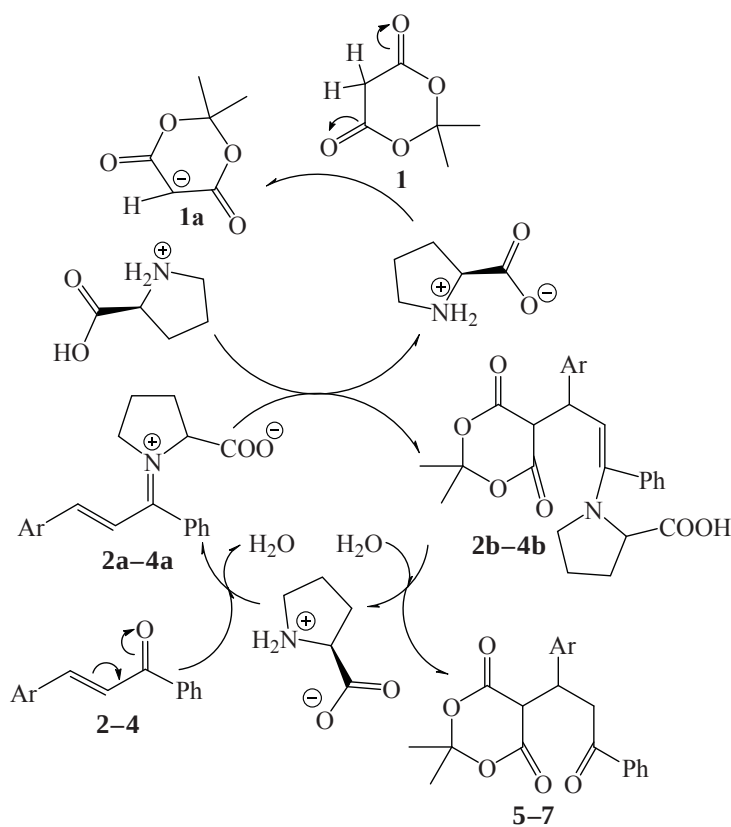
Результаты и их обсуждение

Нами впервые осуществлено взаимодействие 2,2-диметил-1,3-диоксан-4,6-диона (1) с 3-арил-1-фенилпроп-2-ен-1-онами (2–4) при перемешивании в этаноле в присутствии катализатора L-пролина, в результате которого получены соответствующие 5-(1-арил-3-оксо-3-фенилпропил)-2,2-диметил-1,3-диоксан-4,6-дионы (5–7):



В процессе реакции, вероятно, происходит депротонирование изопропилиденмалоната (**1**) и взаимодействие L-пролина с халконом (**2–4**) с образованием реакционноспособного иминового интермедиата **2a–4a**. Реакция последнего

в качестве акцептора с карбанионом **1a** приводит к енамину **2b–4b**, при гидролизе которого высвобождается молекула катализатора, включающаяся в следующий каталитический цикл, и формируются продукты **5–7**:



В сильнополюной области ЯМР ¹H спектра соединения **5** наблюдаются два синглета при 1.51 и 1.71 м.д. метильных групп кольца кислоты Мельдрума. Протоны СН₂-группы найдены в виде двух дублетов дублетов. Метинным звеньям диоксандионного и ациклического фрагмента молекулы данного продукта отвечают соответственно дублет при 4.36 м.д. и мультиплет в области 4.44–4.47 м.д.

Предложенное строение 5-(1-(4-бромфенил)-3-оксо-3-фенилпропил)-2,2-диметил-1,3-диоксан-4,6-диона (**5**) также согласуется со спектральными данными ЯМР ¹³C.

Спектральная картина продукта **6** аналогична вышепредставленной для соединения **5**.

В ЯМР ¹H спектре 5-(1-(4-метоксифенил)-3-оксо-3-фенилпропил)-2,2-диметил-1,3-диоксан-4,6-диона (**7**) помимо вышеописанных сигналов

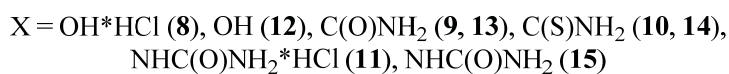
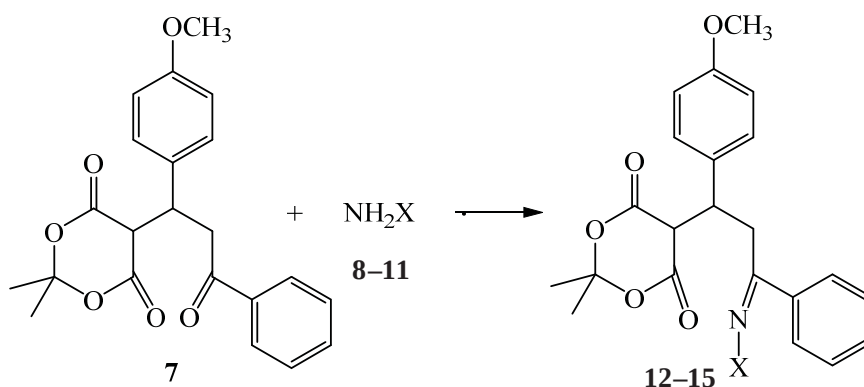


наблюдается также синглет протонов метоксигруппы при 3.75 м.д. Сигналы метиновых звеньев сливаются в мультиплет в области 4.48–4.52 м.д. с интегральной интенсивностью в два протона и идентифицированы в HSQC спектре отдельными кросс-пиками при 4.50/38.60 м.д. и 4.50/50.20 м.д.

Анализ литературных данных по исследованию взаимодействия несимметричных 1,5-дикарбонильных соединений на основе кислоты Мельдрума с азануклеофильными реагентами показал, что нуклеофильное присоединение

осуществляется по карбонильной функции ациклического фрагмента субстрата с сохранением диоксандионового цикла в структуре продуктов реакции.

Так, при перемешивании 5-(1-(4-метоксифенил)-3-оксо-3-фенилпропил)-2,2-диметил-1,3-диоксан-4,6-диона (**7**) с солянокислым гидроксиламином в этаноле при комнатной температуре происходит образование 6-(гидроксиимино)-5-(1-(4-метоксифенил)-3-оксо-3-фенилпропил)-2,2-диметил-1,3-диоксан-4-она (**12**) с выходом 58%:



В ЯМР ^1H спектре соединения **12** наблюдаются сигналы двух метильных групп при 1.41 м.д. и 1.76 м.д., свидетельствующие о сохранении в структуре продукта кольца кислоты Мельдрума. Присутствие в спектре двух дублетов дублетов в области 3.46–3.68 м.д. метиленовой группы, дублета при 3.90 м.д. и мультиплета в интервале 4.08–4.14 м.д. метиновых групп исключают возможность протекания внутримолекулярной N-гетероциклизации. В слабополюсной области спектра помимо сигналов ароматических протонов в области 6.76–7.95 м.д. обнаружен синглет протона ОН-группы оксимного фрагмента при 7.33 м.д.

В ЯМР ^{13}C спектре наблюдается исчезновение сигнала карбонильной группы ациклического фрагмента, а также зарегистрированы сигналы при 168.51 м.д. и 169.32 м.д. не участвовавших в реакции $\text{C}=\text{O}$ групп диоксандионового цикла продукта **12**. Сигнал углерода $\text{C}=\text{N}$ группы обнаружен при 155.66 м.д.

При проведении реакции с биазануклеофильными реагентами – мочевиной (**9**) и тиомочевиной (**10**) в ледяной уксусной кислоте полу-

чены 1-(3-(2,2-диметил-4,6-диоксо-1,3-диоксан-5-ил)-3-(4-метокси-фенил)-1-фенилпропилиден) мочевины (**13**) и ее тиоаналог **14**.

ЯМР ^1H спектры продуктов **13** и **14** аналогичны спектру соединения **12**, за исключением отсутствия сигнала протона оксимного гидроксила и появлением сигналов первичных аминогрупп при 5.37 м.д. и 5.82 м.д. соответственно. Также в ЯМР ^{13}C спектре зарегистрированы сигналы $\text{C}=\text{O}$ группы при 146.76 м.д. и $\text{C}=\text{S}$ группы при 194.41 м.д., характерные для (тио)карбамидного фрагмента продуктов.

Взаимодействие 5-(1-(4-метоксифенил)-3-оксо-3-фенилпропил)-2,2-диметил-1,3-диоксан-4,6-диона (**7**) с солянокислым семикарбазидом в этаноле также привело к получению продукта нуклеофильной атаки карбонильной группы нециклического фрагмента молекулы субстрата - 2-(5-(1-(4-метоксифенил)-3-оксо-3-фенилпропил)-2,2-диметил-6-оксо-1,3-диоксан-4-илиден)гидразинкарбоксиамида (**15**) с 70% выходом.

Отличительной особенностью спектральных данных полученного соединения **15** в



сравнении с вышеупомянутыми сигналами продуктов **12–14** является наличие в слабopольной области ЯМР ^1H спектра синглетов протона NH -группы при 9.17 м.д. и протонов NH_2 -группы при 7.20 м.д. В ЯМР ^{13}C спектре сигнал карбонильной функции гидразинкарбоксамидного фрагмента обнаружен при 173.52 м.д.

Состав и строение всех полученных соединений установлены на основании данных элементного анализа, ЯМР ^1H и ^{13}C спектроскопии, гетероядерной корреляции HSQC.

Заключение

Таким образом, нами осуществлен синтез ранее неизвестных несимметричных 1,5-дикарбонильных соединений на основе кислоты Мельдрума с использованием органокатализатора L-пролина. Также изучено поведение 5-(1-(4-метоксифенил)-3-оксо-3-фенилпропил)-2,2-диметил-1,3-диоксан-4,6-диона в реакциях с моно- и биазануклеофильными реагентами. Показано, что независимо от природы нуклеофила атака осуществляется по карбонильной функции ациклического фрагмента субстрата. Все полученные соединения потенциально обладают биологической активностью и представляют интерес для дальнейших исследований.

Список литературы

1. Kumar S. S., Biju S., Sadasivan V. Synthesis, structure characterization and biological studies on a new aromatic hydrazone, 5-(2-(1,5-dimethyl-3-oxo-2-phenyl-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)hydrazono)-2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4,6-dione, and its transition metal complexes // *Journal of Molecular Structure*. 2018. Vol. 1156. P. 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.11.057>
2. Janković N., Muskinja J., Ratković Z., Bugarci Z., Ranković B., Kosanicband M., Stefanović S. Solvent-free synthesis of novel vanillidene derivatives of Meldrum's acid: Biological evaluation, DNA and BSA binding study // *RSC Advances*. 2016. Vol. 6, № 45. P. 39452–39459. <https://doi.org/10.1039/c6ra07711k>
3. Sandhu H. S., Sapra S., Gupta M., Nepali K., Gautam R., Yadav S., Kumar R., Jachak S. M., Chugh M., Gupta M. K., Suri O. P., Dhar K. L. Synthesis and biological evaluation of arylidene analogues of Meldrum's acid as a new class of antimalarial and antioxidant agents // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2010. Vol. 18, № 15. P. 5626–5633. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.06.033>
4. Da Silva M. C., de Araújo-Neto J. B., de Araújo A. C. J., Freitas P. R., Oliveira-Tintino C. D. de M., Begnini I. M.,

- Rebello R. A., da Silva L. E., Mireski S. L., Nasato M. C., Krautler M. I. L., Ribeiro-Filho J., Coutinho H. D. M., Tintino S. R. Potentiation of antibiotic activity by a Meldrum's acid arylamino methylene derivative against multidrug-resistant bacterial strains // *Indian Journal of Microbiology*. 2021. Vol. 61, № 1. P. 100–103. <https://doi.org/10.1007/s12088-020-00910-6>
5. Pakravan N., Shayani-Jam H., Beiginejad H., Tavafi H. A green and efficient synthesis of novel caffeic acid derivatives with Meldrum's acid moieties as potential antibacterial agents // *Journal of the Iranian Chemical Society*. 2021. Vol. 18, № 10. P. 2679–2688. <https://doi.org/10.1007/s13738-021-02224-w>
6. Sampaio G. M. M., Teixeira A. M. R., Coutinho H. D. M., Sena J. D. M., Freire P. T. C., Bento R. R. F., Silva L. E. Synthesis and antibacterial activity of a new derivative of the Meldrum's acid: 2,2-dimethyl-5-(4H-1,2,4-triazol-4-ylaminomethylene)-1,3-dioxane-4,6-dione ($\text{C}_9\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_4$) // *EXCLI Journal*. 2014. Vol. 13. P. 1022. <http://dx.doi.org/10.17877/DE290R-7034>
7. Moosazadeh E., Sheikhsosseini E., Ghazanfari D., Soltaninejad S. Uncatalyzed synthesis of new antibacterial Bisarylidene Meldrum's acid derivatives functionalized with ether groups // *Letters in Organic Chemistry*. 2019. Vol. 16, № 10. P. 818–824. <http://dx.doi.org/10.2174/1570178616666181203145211>
8. Maatougui A. E., Azuaje J., Coelho A., Cano E., Yañez M., López C., Yaziji V., Carbajales C., Sotelo E. Discovery and preliminary SAR of 5-arylidene-2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4,6-diones as platelet aggregation inhibitors // *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. 2012. Vol. 15, № 7. P. 551–554. <https://doi.org/10.2174/138620712801619122>

References

1. Kumar S. S., Biju S., Sadasivan V. Synthesis, structure characterization and biological studies on a new aromatic hydrazone, 5-(2-(1,5-dimethyl-3-oxo-2-phenyl-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)hydrazono)-2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4,6-dione, and its transition metal complexes. *Journal of Molecular Structure*, 2018, vol. 1156, pp. 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.11.057>
2. Janković N., Muskinja J., Ratković Z., Bugarci Z., Ranković B., Kosanicband M., Stefanović S. Solvent-free synthesis of novel vanillidene derivatives of Meldrum's acid: Biological evaluation, DNA and BSA binding study. *RSC Advances*, 2016, vol. 6, no. 45, pp. 39452–39459. <https://doi.org/10.1039/c6ra07711k>
3. Sandhu H. S., Sapra S., Gupta M., Nepali K., Gautam R., Yadav S., Kumar R., Jachak S. M., Chugh M., Gupta M. K., Suri O. P., Dhar K. L. Synthesis and biological evaluation of arylidene analogues of Meldrum's acid as a new class of antimalarial and antioxidant agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2010, vol. 18, no. 15, pp. 5626–5633. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.06.033>



4. Da Silva M. C., de Araújo-Neto J. B., de Araújo A. C. J., Freitas P. R., Oliveira-Tintino C. D. de M., Begnini I. M., Rebelo R. A., da Silva L. E., Mireski S. L., Nasato M. C., Krautler M. I. L., Ribeiro-Filho J., Coutinho H. D. M., Tintino S. R. Potentiation of antibiotic activity by a Meldrum's acid arylamino methylene derivative against multidrug-resistant bacterial strains. *Indian Journal of Microbiology*, 2021, vol. 61, no. 1, pp. 100–103. <https://doi.org/10.1007/s12088-020-00910-6>
5. Pakravan N., Shayani-Jam H., Beiginejad H., Tavafi H. A green and efficient synthesis of novel caffeic acid derivatives with Meldrum's acid moieties as potential antibacterial agents. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 2021, vol. 18, no. 10, pp. 2679–2688. <https://doi.org/10.1007/s13738-021-02224-w>
6. Sampaio G. M. M., Teixeira A. M. R., Coutinho H. D. M., Sena J. D. M., Freire P. T. C., Bento R. R. F., Silva L. E. Synthesis and antibacterial activity of a new derivative of the Meldrum's acid: 2,2-dimethyl-5-(4H-1,2,4-triazol-4-ylaminomethylene)-1,3-dioxane-4,6-dione (C₉H₁₀N₄O₄). *EXCLI Journal*, 2014, vol. 13, pp. 1022. <http://dx.doi.org/10.17877/DE290R-7034>
7. Moosazadeh E., Sheikhhosseini E., Ghazanfari D., Soltaninejad S. Uncatalyzed synthesis of new antibacterial Bisarylidene Meldrum's acid derivatives functionalized with ether groups. *Letters in Organic Chemistry*, 2019, vol. 16, no. 10, pp. 818–824. <http://dx.doi.org/10.2174/1570178616666181203145211>
8. Maatougui A. E., Azuaje J., Coelho A., Cano E., Yañez M., López C., Yaziji V., Carbajales C., Sotelo E. Discovery and preliminary SAR of 5-arylidene-2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4,6-diones as platelet aggregation inhibitors. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 2012, vol. 15, no. 7, pp. 551–554. <https://doi.org/10.2174/138620712801619122>

Поступила в редакцию 07.09.2023; одобрена после рецензирования 21.09.2023; принята к публикации 25.09.2023
The article was submitted 07.09.2023; approved after reviewing 21.09.2023; accepted for publication 25.09.2023

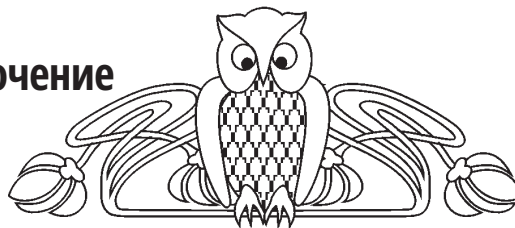


Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 4. С. 411–425
Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology, 2023, vol. 23, iss. 4, pp. 411–425
<https://ichbe.sgu.ru>

<https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-4-411-425>, EDN: IVZQCS

Научная статья
УДК 547.458.1:[543.42+544.022]

Структура и надмолекулярное упорядочение L- и D-аспарагината хитозана



К. М. Шипенко, А. Б. Шиповская ✉

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

Шипенко Ксения Михайловна, студент Института химии, kshipenok@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9733-751X>

Шиповская Анна Борисовна, доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой полимеров на базе ООО «АКРИПОЛ» Института химии, начальник отдела высокомолекулярных соединений Образовательно-научного института наноструктур и биосистем, shipovskayaab@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1916-4067>

Аннотация. В работе использовали хитозан (CS) со средневязкостной молекулярной массой 200 кДа и степенью деацетилирования 82 мольн.% производства ЗАО «Биопрогресс» (РФ). Получены водные растворы энантиомерных солевых комплексов CS с L- и D-аспарагиновой кислотой (AspA) при эквимольном соотношении CS:AspA, считая на аминогруппы. Порошки солей CS-L-(D-)AspA выделяли из соответствующих растворов упариванием воды и хранили в эксикаторе при нулевой влажности. Установлено, что в таких условиях образуется водорастворимая солевая форма полимера с пластинчатыми светло-бежевыми частицами размером 0.05–1.0 мкм. Методами элементного анализа, ИК- и ЯМР-спектроскопии, рентгеновской дифрактометрии проведена оценка химического взаимодействия CS с L-(D-)AspA в водном растворе и конденсированном состоянии, исследованы химическая структура и надмолекулярное упорядочение энантиомерных солей. Установлено, что по классификации Ogawa К. с соавторами формульная единица CS-L-(D-)AspA соответствует негидратированным солям I типа, в которых молекулы воды заменены на анионы кислоты. ИК-спектроскопия подтвердила донорно-акцепторное взаимодействие полимер–кислота и выявила развитую систему меж- и внутримолекулярных контактов. Одно- и двумерная ЯМР-спектроскопия показала взаимодействие пар атомных ядер между H₃–H₆ полимера и 2H₈ или H_α кислоты, H₁ или H₂ и H_α, H₁ и H₃–H₆, обусловленное пространственной близостью протонов в повторяющихся мономерных единицах, удалённых по цепи «изгибных» сегментах цепей и соседних макромолекулах. Для CS-L-AspA выявлены дополнительные резонансы между H₂ и H₃–H₆ полимера, для CS-D-AspA – H₁ или H₂. Рентгеновская дифрактометрия обнаружила высокоупорядоченную ориентацию макроцепей и не типичную для солей CS высокую степень кристалличности. Солевой комплекс CS-D-AspA, в отличие от CS-L-AspA, характеризуется меньшим количеством кристаллизационной воды, более упорядоченной надмолекулярной структурой и более развитой системой меж- и внутримолекулярных контактов.

Ключевые слова: хитозан, L- и D-аспарагиновая кислота, солевые комплексы, взаимодействие, элементный анализ, ИК- и ЯМР-спектроскопия, рентгеновская дифрактометрия

Благодарности: Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект №22-23-00320, <https://rscf.ru/project/22-23-00320/>.

Для цитирования: Шипенко К. М., Шиповская А. Б. Структура и надмолекулярное упорядочение L- и D-аспарагината хитозана // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 4. С. 411–425. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-4-411-425>, EDN: IVZQCS

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

Article

Structure and supramolecular ordering of chitosan L- and D-aspartates

К. М. Шипенко, А. В. Шиповская ✉

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

Xenia M. Shipenok, kshipenok@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9733-751X>

Anna V. Shipovskaya, shipovskayaab@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1916-4067>

Abstract. Chitosan (CS) with a viscosity-average molecular weight of 200 kDa and a deacetylation degree of 82 mol%, produced by Bioprogress Ltd. (RF) has been used in this work. Aqueous solutions of enantiomeric salt complexes of CS with L- and D-aspartic acid (AspA) have been obtained at an equimolar CS:AspA ratio, in terms of amino groups. Powders of CS-L-(D-) AspA salts have been isolated from the corresponding solutions



by evaporation of water and stored in a desiccator at zero humidity. It has been established that under such conditions a water-soluble salt form of the polymer with lamellar light beige particles 0.05–1.0 mm in size is formed. Using the methods of elemental analysis, IR and NMR spectroscopy, and X-ray diffractometry, the chemical interaction of CS with *L*-(*D*-)AspA in aqueous solution and condensed state has been evaluated, and the chemical structure and supramolecular ordering of these enantiomeric salts have been studied. It has been established that, according to the classification of K. Ogawa et al., the formula unit CS-*L*-(*D*-)AspA corresponds to non-hydrated salts of type I, in which water molecules are replaced by acid anions. IR spectroscopy confirmed the donor–acceptor polymer–acid interaction and revealed a developed system of intermolecular and intramolecular contacts. One- and two-dimensional NMR spectroscopy showed the interaction of pairs of atomic nuclei between H₃–H₆ of the polymer and 2H_β or H_α of the acid, H₁ or H₂ and H_α, H₁ and H₃–H₆, due to the spatial proximity of protons in repeating monomer units, in the “bend” chain segments removed along the chain, and in neighboring macromolecules. For CS-*L*-AspA, additional resonances have been identified between H₂ and H₃–H₆ of the polymer, for CS-*D*-AspA these have been between H₁ or H₂. X-ray diffractometry has revealed a highly ordered orientation of macrochains and a high crystallinity degree, untypical for CS salts. The salt complex CS-*D*-AspA, in contrast to CS-*L*-AspA, is characterized by a smaller amount of crystallization water, a more ordered supramolecular structure, and a more developed system of intermolecular and intramolecular contacts.

Keywords: chitosan, *L*- and *D*-aspartic acid, salt complexes, interaction, elemental analysis, IR and NMR spectroscopy, X-ray diffractometry

Acknowledgements: This research was funded by a grant from the Russian Science Foundation No. 22-23-00320, <https://rscf.ru/project/22-23-00320/>.

For citation: Shipenok X. M., Shipovskaya A. B. Structure and supramolecular ordering of chitosan *L*- and *D*-aspartates. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2023, vol. 23, iss. 4, pp. 411–425 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-4-411-425>, EDN: IVZQCS

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

Введение

Солевые формы (CS) с органическими и неорганическими кислотами вследствие проявления антиоксидантной, биоцидной, противовирусной, иммуномодулирующей, ранозаживляющей и др. активности, весьма перспективны в разработке новых фармацевтических препаратов и вакцин, средств доставки лекарств, биотрансплантатов и медицинских шовных материалов, а также в ветеринарии, косметологии, лечебном питании, производстве БАДов [1, 2]. Многочисленные исследования показали, что биологическая активность солей CS определяется, в первую очередь, их катионной природой. Например, электростатическое взаимодействие протонированных аминокрупп макроцепи с анионными компонентами поверхностных структур клеточных мембран обуславливает дестабилизацию клеточной стенки и в конечном итоге приводит к гибели патогена [3, 4]. Катионная плотность заряда макромолекул CS и, соответственно, электростатический эффект во многом определяются природой кислоты, используемой для формирования солей [2].

Кроме того, природа кислоты оказывает значимое влияние на конформационные характеристики и структуру солевой формы CS. Так, японская научная группа классифицировала соли хитозана на несколько типов кристаллических структур, отличающихся конформацией макроцепей, количеством кристаллизационной воды, структурно-полиморфной модификацией и кинетической стабильностью [5]. Соли I типа представляют собой безводные кристаллы, в которых молекулы CS принимают форму уд-

линенной двойной спирали 2/1 (аналогичной конформации хитина или целлюлозы), стабилизированной внутримолекулярной водородной связью O₃ – O₅'. Соли II типа образуют гидратированный кристалл, вследствие чего основной вклад в кристаллическую структуру вносят скелетные цепи CS с присутствующими между ними молекулами воды. Молекула CS принимает при этом релаксированную двойную спираль 2/1, состоящую из асимметричных звеньев тетрасахарида. В более поздней работе была установлена конформация вытянутой восьмикратной спирали 8/5 или 8/3 [6]. При формировании солей II типа при низкой температуре молекула CS формирует форму спирали 4/1 с асимметричными звеньями дисахарида. В обоих случаях конформация цепей неустойчивая, поскольку не образуется сильной внутримолекулярной Н-связи, такой как в типе I, но возможна стабилизация спирали анионами. Особенностью солевой формы II типа является спонтанная дегидратация, включающая и удаление кислоты, с необратимым превращением в высококристаллическую полиморфную модификацию CS с системой Н-связей как в типе I [6]. В солях III типа конформация макроцепей CS представлена пятикратной спиралью (5/3) с асимметричным звеном глюкозамина [7].

В последние годы для получения солевой формы CS все чаще стали использовать биологически активные карбоновые кислоты и аминокислоты [8–10]. В данном случае природа кислоты-растворителя оказывает значимое влияние не только на физико-химические свойства материалов, но и расширяет спектр их медико-



биологических свойств [10–12]. Предполагается, что в таких солевых комплексах реализуются не только меж- и внутримолекулярные водородные связи и классические кулоновские взаимодействия, но и специфические кулоновские координации в виде ионных ассоциаций, а также гидрофобные и ион-дипольные контакты [13, 14]. При этом конкуренция кулоновского отталкивания одноименно заряженных мономерных звеньев и притяжения между «нейтрализованными» сегментами полимерных цепей влияет на пространственную упаковку макромолекул и их надмолекулярную ориентацию [14].

Аминокислоты и большинство биологически активных карбоновых кислот хиральны и имеют стереоантиподы, различающиеся пространственным строением и биологической функциональностью, что отражается и на свойствах их солей с CS. Так, *L*-молочная кислота обладает меньшим термодинамическим сродством к CS, чем её *D*-изомер, а *L*- и *D*-лактаты CS различаются температурой формирования солевых форм I (безводный кристалл) и II типа (гидратированный кристалл) [15]. *L*- и *D*-аскорбаты CS отличаются размером макроклабков и их надмолекулярным упорядочением, хирооптическими свойствами, антибактериальной, пролиферирующей, противовоспалительной и ранозаживляю-

щей активностью [16–19]. При этом наибольшую эффективность проявляют соли CS не с фармакологически активной *L*-аспарагиновой кислотой, а с её *D*-диастереомером.

Особый интерес представляют солевые формы CS с энантиомерами AspA. *L*-AspA является заменимой протеиногенной аминокислотой. Выполняет функцию нейромедиатора, участвует в переаминировании, биосинтезе мочевины, пиримидиновых оснований, в цикле лимонной кислоты (Кребса) и др., проявляет антимикробную активность [20, 21]. *D*-AspA обнаружена в составе белков хрусталика глаза при катаракте, в головном мозге при болезни Альцгеймера, в стенке аорты при атеросклерозе, в дентине зубов человека при физиологическом взрослении [22]. Предполагается, что *D*-AspA образуется при спонтанной рацемизации *L*-AspA в структуре полипептидов в процессе старения и выполняет в организме специфические функции эндокринной регуляции.

Молекулы AspA содержат две кислотные COOH-группы и основную NH₂-группу, имеющую противоположную пространственную конфигурацию в случае энантиомерных форм этого вещества (рис. 1, а, б). Вследствие стереоконфигурационных различий энантиомеры AspA характеризуются одинаковым по модулю, но

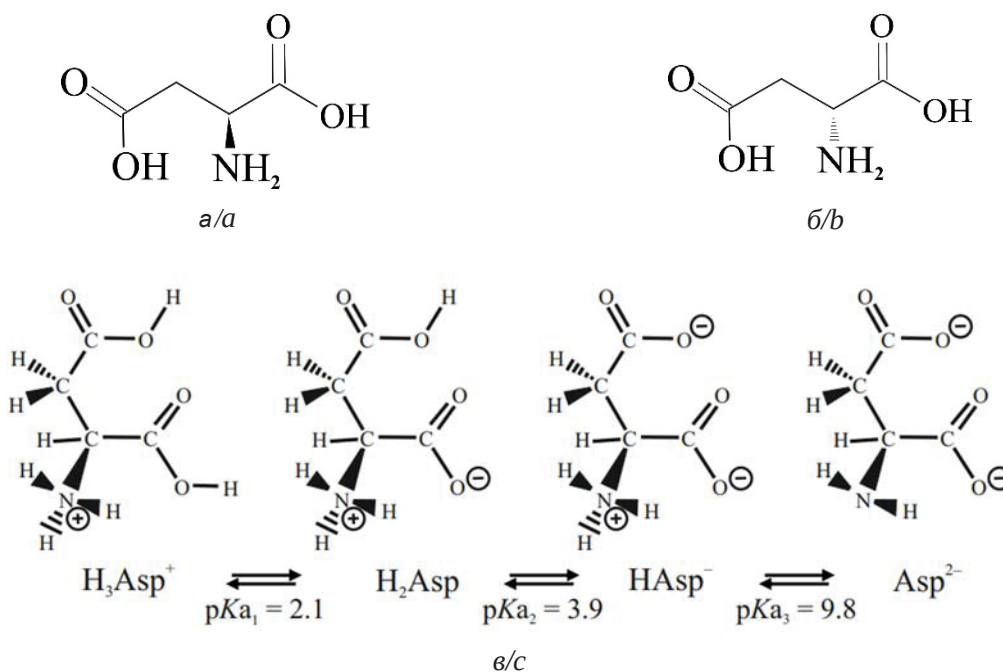


Рис. 1. Структурные формулы энантиомеров *L*-AspA (а), *D*-AspA (б) и структуры ионов AspA при разном значении pH (в)

Fig. 1. Structural formulae of enantiomers *L*-AspA (a), *D*-AspA (b) and the structure of AspA ions at several pH values (c)



противоположным по знаку удельным оптическим вращением: +25.5 град для *L*-AspA и –25.5 град для *D*-AspA (25°C, 589 нм, 5% в 5 М HCl). Обе кислоты имеют невысокую растворимость в воде [23]. В водной среде в зависимости от pH молекулы AspA существуют в различных пропорциях катионов, диполярных ионов, анионов и дианионов (см. рис. 1, в) [24, 25]. В твердой фазе AspA находится, преимущественно, в цвиттер-ионной форме [26]. ИК-спектры индивидуальных *L*- и *D*-энантиомеров AspA не различимы [21]. Различия в частотах полос поглощения структурных фрагментов наблюдаются лишь для рацемических смесей *L*-AspA + *D*-AspA.

Ранее нами было показано, что водные растворы AspA могут выступать в качестве биосовместимой среды для растворения CS [27]. Формирование аспарагиновокислого CS протекает при pH 3.5–3.8 и минимальном стехиометрическом отношении [AspA]/[–NH₂] ~ 0.43 [28]. В растворе макромолекулы полисоли проявляют свойства полиэлектролита с частично компенсированным зарядом [28, 29] и образуют левозакрученную спиральную вторичную структуру [30]. Порошок CS·AspA, выделенный из соответствующего раствора, имеет форму пластинчатых микрочастиц с фрактальным упорядочением [31]. Установлено, что соли CS·*L*-AspA и CS·*D*-AspA нетоксичны, гемо- и биосовместимы, проявляют высокую ростостимулирующую активность в отношении тест-растений с наилучшим эффектом для солевого комплекса с *D*-антиподом AspA [32]. Вероятно, что подобное проявление биологической активности обусловлено различиями в пространственном упорядочении CS·*L*-AspA и CS·*D*-AspA. Однако детализация структурных особенностей энантиомерных форм CS·*L*-(*D*-)AspA не была проведена.

Целью настоящего исследования является оценка химической структуры и надмолекулярного упорядочения *L*- и *D*-аспарагината CS методами ИК- и ЯМР-спектроскопии, элементного анализа и рентгеновской дифрактометрии.

Материалы и методы

Для исследования выбран CS со средневязкостной молекулярной массой 200 кДа, степенью деацетилирования 82 мольн.%, влажностью $W = 9 \pm 1$ мас.% (ЗАО «Биопрогресс», РФ). Использовали порошки х.ч. *L*-AspA, полученной биокаталитическим синтезом (ЗАО «Биоамид», РФ), и х.ч. *D*-AspA (ЗАО «Вектон», РФ), бидистиллированную воду, D₂O (Cambridge Isotope

Laboratories, Inc., США). Солевые комплексы CS·*L*-(*D*-)AspA получали при мольном соотношении [AspA]/[–NH₂] = 1.0 моль/осново-моль.

Растворы солей CS·*L*-(*D*-)AspA в дистиллированной воде концентрации $C_{CS} = 0.8$ г/дл (для получения порошков) и в D₂O с $C_{CS} = 0.3$ г/дл (для получения ЯМР-спектров) получали на колбонагревателе Labdevices HMS-100D (Китай) при 50.0±0.1°C и перемешивании на магнитной мешалке со скоростью 400 об/мин. В колбу на 100 мл наливали 50 мл дистиллированной воды, подогревали до указанной температуры, засыпали навеску CS и перемешивали 20 мин для набухания частиц полимера. Далее в колбу вносили навеску AspA, добавляли 50 мл воды, перемешивали в течение 2–3 ч до растворения CS, охлаждали до комнатной температуры и пропускали через фильтрующую воронку Шотта-160. Порошки солей CS·*L*-(*D*-)AspA получали упариванием соответствующих растворов в чашках Петри при комнатной температуре (22±2 °C) в воздушной атмосфере, сушили до постоянной массы и измельчали в фарфоровой ступке. Образцы хранили в эксикаторе при нулевой влажности.

Гравиметрические измерения проводили на аналитических весах «Ohaus Discovery» (США).

Элементный анализ выполнен на CHNS-анализаторе Elementar Vario Micro Cube (ElementarAnalysensystem GmbH, Германия): C, H – в токе O₂, N – в токе CO₂. Погрешность составила ±0.5 мас.%. Брутто-формулу (формульную единицу) вещества вычисляли из атомного соотношения C/N, разного для CS и AspA, по методике [33].

ИК-спектры регистрировали на вакуумном ИК-фурье-спектрометре Vertex 70 v (Bruker, США) с термовариацией PIKE GladiATR и разрешением 4 см⁻¹, используя в среднем 36 сканирований в диапазоне 4000–400 см⁻¹ методом нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО). Спектры обрабатывали в программе OPUS. Полосы колебательного поглощения расшифровывали по корреляционным таблицам [34] и экспериментальным работам для AspA, CS и его солевых форм [21, 28, 35].

Спектры ЯМР ¹H (400 МГц), ¹³C (100 МГц), ¹H–¹H COSY, ROESY и NOESY регистрировали на спектрофотометре Bruker Avance II 600 (США) в D₂O при 40°C, внутренний стандарт – тетраметоксисилан. Проводили 32 скана с временем релаксации 1 с в диапазоне частот 5.5–1.5 м.д. Для расшифровки ЯМР-спектров использовали литературные источники [7, 28, 35, 36].



Рентгеновские дифрактограммы получали на дифрактометре ДРОН-8Т (АО «ИЦ «Буревестник», РФ) с излучением $\text{Cu}_{K\alpha}$, параболическим зеркалом Гёбеля (AXO Dresden GmbH, Германия) и позиционно-чувствительным детектором Mythen 2R1D с 640 каналами (Dectris, Швейцария) с дискретностью $2\theta = 0.0144$ град, в кварцевой кювете 2 мм. Геометрия фокусного луча: щели аксиальная 12 мм, экваториальная 0.25 мм. Регистрацию осуществляли в диапазоне углов $2\theta = 5\text{--}40$ град по точкам с шагом 0.02 град для центрального канала детектора и временем экспозиции 10 с в точке. Степень кристалличности (χ , %) рассчитывали, как отношение интегральной интенсивности суммарного рассеяния кристаллитов к полному рассеянию от аморфных и кристаллических областей гра-

фическим интегрированием (программа QCAD 3.15) [37, 38]. Полученные результаты сравнивали с данным работ [28, 39, 40].

Результаты и их обсуждение

При высушивании свежеприготовленного водного раствора CS в L- и D-AspA образуется водорастворимый порошок CS·L-(D-)AspA светло-бежевого цвета, состоящий из пластинчатых частиц размером 0.05–1.0 мм. Формульная единица образцов, полученных при мольном соотношении $[\text{AspA}]/[\sim\text{-NH}_2] = 1.0 \text{ mol/mono-mol}$ и определенная по данным элементного анализа, приведена в табл. 1. Стехиометрический пересчет содержания элементов на усредненное элементарное звено показывает формирование солевых комплексов I типа (безводный кристалл

Таблица 1 / Table 1

Формульная единица и соотношение полос поглощения ИК-спектров порошков CS, CS·L-AspA и CS·D-AspA
Formula unit and correlation of absorption bands in the IR spectra of CS, CS·L-AspA and CS·D-AspA powders

Тип колебания структурного фрагмента / Vibration type of the structural fragment	CS	CS·L-AspA	CS·D-AspA
	Формульная единица / Formula unit		
	$\text{C}_{6.4}\text{H}_{11.4}\text{NO}_{4.2} + 1.5 \text{H}_2\text{O}$	$\text{C}_{6.4}\text{H}_{11.4}\text{NO}_{4.2} + \text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_4 + 2.64 \text{H}_2\text{O}$	$\text{C}_{6.4}\text{H}_{11.4}\text{NO}_{4.2} + \text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_4 + 1.99 \text{H}_2\text{O}$
Частота полосы поглощения, cm^{-1} / Absorption band frequency, cm^{-1}			
$\nu_{\text{O-H}}$	3435		
$\nu_{\text{N-H}}$	3255		
$\nu_{\text{N-H}}(\text{NH}_3^+)$	–	3125	3115
$\nu_{\text{as}}(\text{CH})$	2925		
$\nu_{\text{s}}(\text{CH})$	2855		
$\nu_{\text{связ}}(\text{OH})$	–	2500	
$\nu_{\text{as}}(\text{C-N})$	2360, 2340	2360	
$\nu_{\text{C-O}}(\text{COO}^-)$	–	2100, 1460	2105, 1465
$\nu_{\text{C=O}}(\text{COOH})$	–	1715	1720
$\delta_{\text{C=O}}$ (Амид I)	1635	1630	
$\delta_{\text{N-H}}$ (Амид II)	1580	1560	1550
$\delta_{\text{as}}(\text{CH})$	1420, 1370	1400, 1350	
$\nu_{\text{C-N}} + \delta_{\text{N-H}}$ (Амид III)	1305 – 1300		
$\nu(\text{C-C}), \nu(\text{C-O}), \nu(\text{C-N}), \delta(\text{C-H})$ Глюкопиранинское кольцо Glucopyranose ring	1150		
	1100 – 1080		
	1040 – 1020		
	895 – 890		
	850		
$\delta_{\text{O-H}}(\text{COOH})$	–	615	620



[5]), поскольку количество кристаллизационной воды в $CS \cdot L\text{-AspA}$ и $CS \cdot D\text{-AspA}$ сравнимо с исходным порошком полимера. При этом меньшее количество связанной H_2O содержится в D -аспарагинате CS , что косвенно указывает на сильное взаимодействие компонентов соли, вследствие чего на взаимодействие с водой остаётся меньше центров и групп, чем в L -солевом комплексе.

В ИК-спектрах солевых форм CS с L - и D - $AspA$ присутствуют все характеристические для данного полимера частоты колебаний, в частности, вовлеченных в систему внутри- и межмолекулярных водородных контактов NH - и OH -связей, $-NHCO$ - групп (Амид I и Амид II), симметричных и ассиметричных колебаний CH - и CN -связей, валентных и деформацион-

ных колебаний фрагментов глюкопиранозного кольца (рис. 2, см. табл. 1) [21, 28, 35]. Наблюдаются также плохо разрешенные полосы с центрами при 3125 cm^{-1} для порошка $CS \cdot L\text{-AspA}$ и 3115 cm^{-1} для порошка $CS \cdot D\text{-AspA}$, относящиеся к протонированным аминогруппам полимера. В спектрах L - и D -аспарагинатов CS имеются характерные для валентных колебаний ионизованных и неионизованных карбонильных групп кислотного остатка полосы поглощения: $2100, 1715, 1460, 615\text{ cm}^{-1}$ для $CS \cdot L\text{-AspA}$ и $2105, 1720, 1465, 620\text{ cm}^{-1}$ для $CS \cdot D\text{-AspA}$. ИК-спектроскопия подтверждает, что взаимодействие CS с $AspA$ идет с переносом протона кислоты на аминогруппу полимера с образованием NH_3^+ -групп и, соответственно, солевой формы полимера.

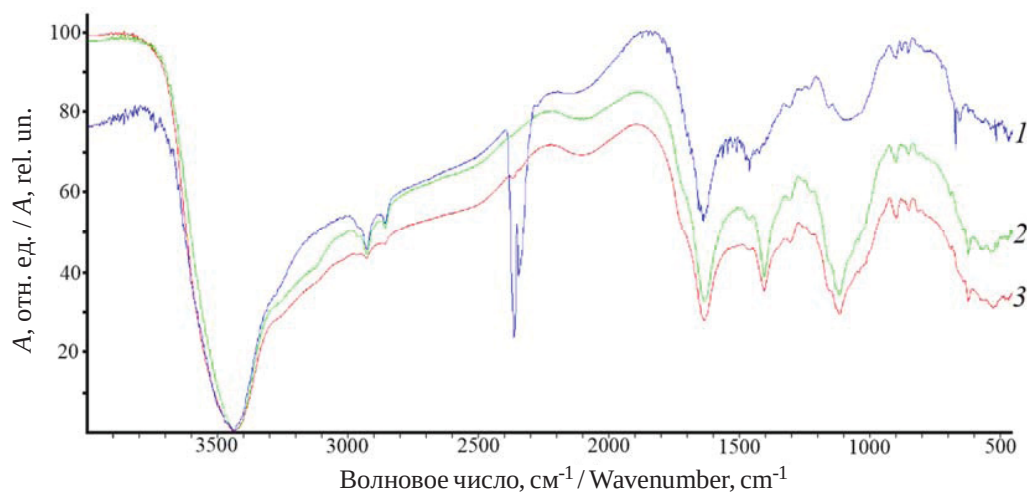


Рис. 2. ИК-спектры порошков: 1 – CS , 2 – $CS \cdot L\text{-AspA}$, 3 – $CS \cdot D\text{-AspA}$ (цвет онлайн)

Fig. 2. IR spectra of powders: 1 – CS , 2 – $CS \cdot L\text{-AspA}$, 3 – $CS \cdot D\text{-AspA}$ (color online)

При этом спектральные характеристики L - и D -аспарагината CS несколько отличаются от ИК-спектров водорастворимых солевых форм этого полимера с анионами карбоновых кислот и от солевого комплекса $CS\text{-}AspA$, синтезированного в среде H_2O + изопропиловый спирт при $4\text{--}10^\circ\text{C}$ в работе [30]. Например, в спектрах четко не выявляются полосы поглощения, характерные для симметричного изгибного растяжения соли амина. Вероятно, валентные колебания NH_3^+ перекрываются с полосой валентных колебаний NH и с полосой ассиметричных валентных колебаний в CH_2 фрагменте (2925 cm^{-1} для обоих образцов), что проявляется в виде сравнительно небольшого изгиба спектральной линии с центром при 3125 и 3115 cm^{-1} для образцов

$CS \cdot L\text{-AspA}$ и $CS \cdot D\text{-AspA}$ соответственно. Кроме того, полоса поглощения NH_3^+ -группы накладывается на полосу поглощения Амид II, вследствие чего на спектральной линии фиксируется перегиб при 1560 cm^{-1} для $CS \cdot L\text{-AspA}$ и 1550 cm^{-1} для $CS \cdot D\text{-AspA}$.

При сравнении ИК-спектров L - и D -стереомерных солей CS выявляется, что полосы поглощения валентных колебаний $N\text{-H}$ в протонированной аминогруппе и деформационных колебаний $N\text{-H}$ (полоса Амид II) для образца $CS \cdot D\text{-AspA}$ наблюдаются при меньших значениях волнового числа по сравнению с $CS \cdot L\text{-AspA}$. Валентные колебания $C\text{-O}$ ионизованных и $C\text{-O}$ неионизованных карбоксильных групп, а также деформационные колебания $O\text{-H}$ в -COOH для



порошка CS·D-AspA фиксируются при более высоких значениях ν , чем для порошка CS·L-AspA.

Полученные спектральные характеристики указывают на достаточно развитую систему меж- и внутримолекулярных контактов в надмолекулярной структуре образцов L- и D-аспарагината CS, что не типично для солевой формы этого полимера, протонированные группы которой вследствие внутримолекулярного электростатического отталкивания частично ослабляют исходную жёсткую кристаллическую структуру полимера. Это могут быть Н-связи между соседними цепями полимера или удаленными по цепи «изгибными» сегментами одной и той же

макромолекулы. Не исключены специфические кулоновские и ион-дипольные взаимодействия, о чем указывали авторы [13, 14]. Кроме того, возможны Н-связи между макромолекулами полимера и свободными функциональными группами молекул кислоты. Учитывая, что в твердой фазе AspA находится в цвиттер-ионной форме, разумно предположить возможность участия в формировании Н-связей и биполярного иона молекулы кислоты. При этом наиболее развитой системой Н-связей характеризуется CS·D-AspA.

Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C растворов CS·L-(D-) AspA показывают все характерные для CS и AspA сигналы протонов и углеродов (рис. 3, табл. 2)

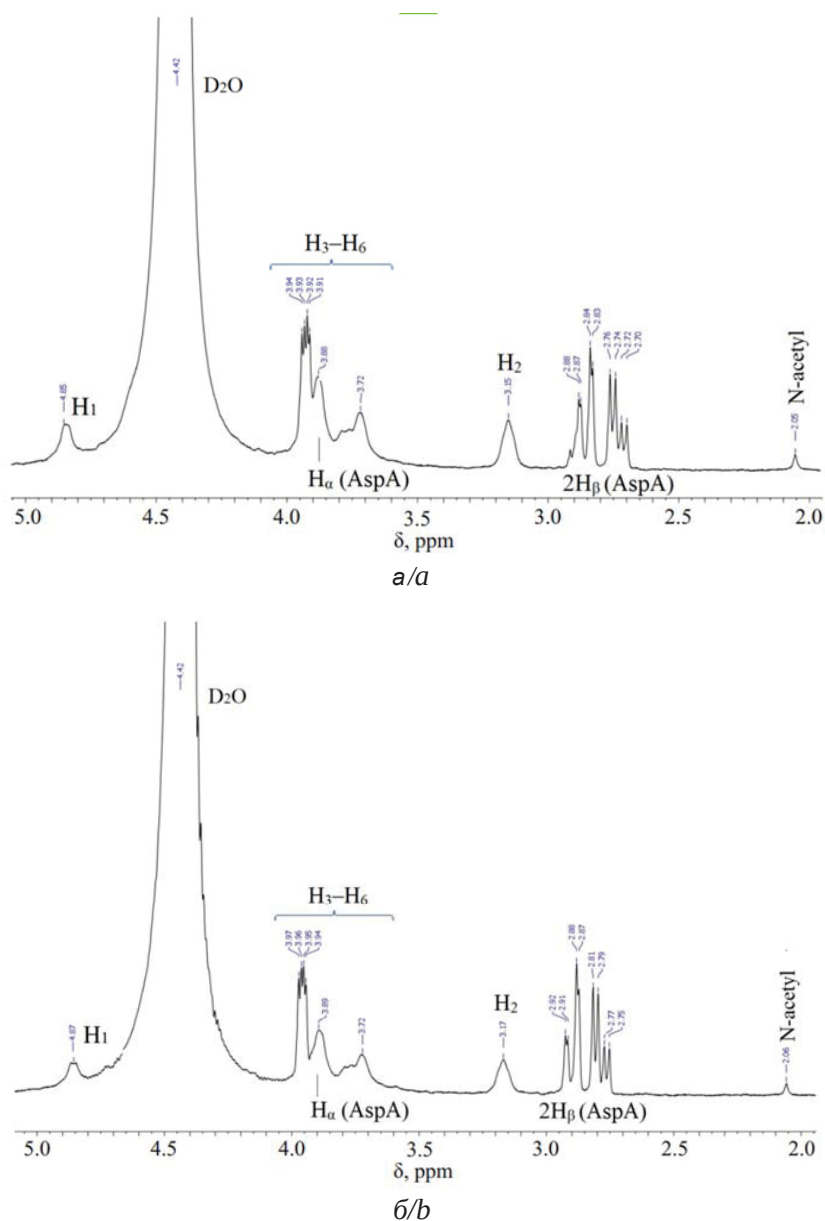


Рис. 3. ЯМР ^1H спектры растворов CS·L-AspA (а) и CS·D-AspA (б) в D_2O
 Fig. 3. ^1H NMR spectra of solutions of CS·L-AspA (a) and CS·D-AspA (b) in D_2O



Таблица 2 / Table 2

Соотнесение полос поглощения спектров ЯМР ^1H и ^{13}C растворов CS, CS·L-AspA и CS·D-AspA в D_2O
 Correlation of absorption bands in the ^1H and ^{13}C NMR spectra of solutions of CS, CS·L-AspA and CS·D-AspA in D_2O

δ , ppm	CS·L-AspA		δ , ppm	CS·D-AspA	
	L-AspA	CS		D-AspA	CS
ЯМР ^1H / NMR ^1H					
4.85	–	H ₁	4.87	–	H ₁
4.42	–	D ₂ O	4.42	–	D ₂ O
3.91–3.94	–	H ₃ –H ₆	3.94–3.97	–	H ₃ –H ₆
3.72	–		3.72	–	
3.88	H _{α}	–	3.89	H _{α}	–
3.15	–	H ₂ (деацетилированные звенья / deacetylated links)	3.17	–	H ₂ (деацетилированные звенья / deacetylated links)
2.70–2.88	2H _{β}	–	2.77–2.92	2H _{β}	–
2.05	–	N-acetyl	2.06	–	N-acetyl
ЯМР ^{13}C / NMR ^{13}C					
179.24	-COOH	–	178.68	-COOH	–
176.27	-COOH	-C=O	176.04	-COOH	-C=O
100.69	–	C ₁	100.60	–	C ₁
79.63	–	C ₄	79.63	–	C ₄
77.43	–	C ₅	77.44	–	C ₅
73.10	–	C ₃	73.02	–	C ₃
62.87	–	C ₆	62.85	–	C ₆
58.59	–	C ₂	58.58	–	C ₂
54.64	-CH-	–	54.38	-CH-	–
38.72	-CH ₂ -	–	38.39	-CH ₂ -	–

[7, 35, 36]. Например, в спектрах ЯМР ^1H , кроме сигналов протонов глюкопиранозного кольца и ацетамидной группы CS присутствует уширенный сигнал протонов α -углеродного атома и квадруплет дублетов протонов β -метиленовой группы AspA. При этом сигнал H₂ в солевых комплексах смещен с сторону меньших δ по сравнению с исходным CS [36], что свидетельствует о формировании протонированных аминогрупп. Уширение сигнальных картин протонов H _{α} и 2H _{β} в L-(D-)аспарагинате CS в сравнении с AspA [28] также указывает на солеобразование полимера с кислотой. В сравнении с CS·L-AspA, для CS·D-AspA наблюдается уменьшение площади сигналов H₁, H₂, H₃–H₆, H _{α} (при $\delta \sim 3.9$ ppm) и небольшое смещение данных резонансов в сторону более сильных полей. Для мультиплета 2H _{β} обнаруживается увеличение

площади сигнальных картин и более существенный сдвиг в область бóльших значений δ .

Оценка ^1H – ^1H -связей и, соответственно, корреляции протонов с вицинальными протонами (COSY), пространственной близости удаленных протонов (ROESY) и их пространственной корреляции (NOESY) показала, что для CS·L-AspA и CS·D-AspA отмечаются взаимодействия между H₃–H₆ полимера и 2H _{β} или H _{α} кислоты, H₁ или H₂ и H _{α} , H₁ и H₃–H₆. Для CS·L-AspA выявляются дополнительные резонансы между H₂ и H₃–H₆ полимера, а для CS·D-AspA – H₁ и H₂. Следует отметить, что выявленные кросс-пики могут быть обусловлены не только пространственной близостью протонов CS и AspA внутри одних и тех же повторяющихся мономерных единиц, но и пространственной близостью протонов соседних цепей полимера или удаленных



по цепи «изгибных» сегментов одной и той же макромолекулы. Выявленные частотно-избирательные отклики протонов указывают на формирование пространственно-сближенного солевого комплекса полимер–кислота, а также,

как и данные ИКС, подтверждают формирование развитой системы меж- и внутримолекулярных контактов. Наибольшее число взаимодействий между парами атомных ядер наблюдается для образца CS-D-AspA (рис. 4, табл. 3).

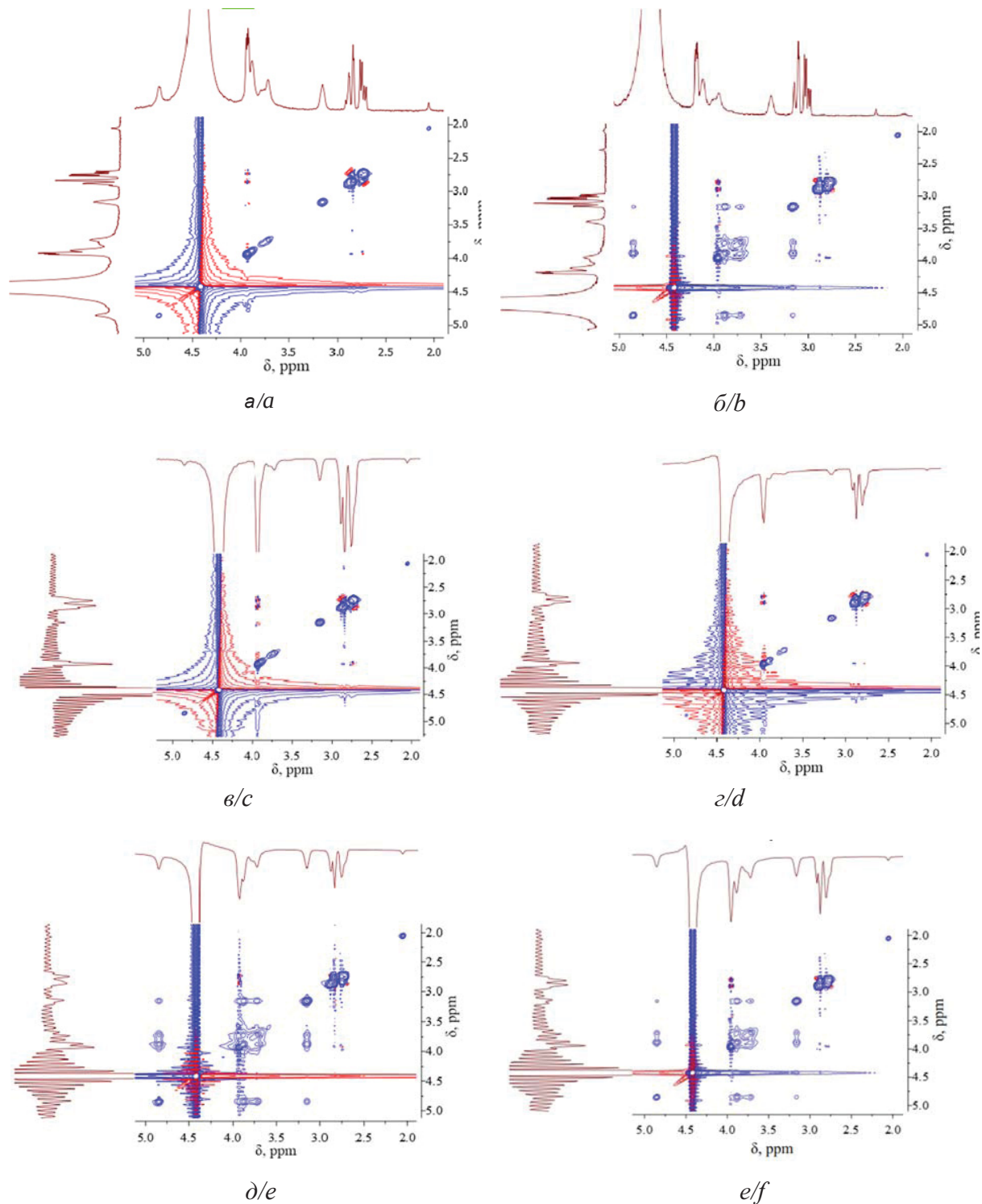


Рис. 4. Спектры COSY (а, б), ROESY (в, г) и NOESY (д, е) растворов CS-L-AspA (а, в, д) и CS-D-AspA (б, г, е) в D₂O
 Fig. 4. COSY (a, b), ROESY (c, d) and NOESY (e, f) spectra of solutions of CS-L-AspA (a, c, e) and CS-D-AspA (b, d, f) in D₂O



Таблица 3 / Table 3

Соотнесение кросс-пиков спектров COSY, ROESY и NOESY растворов CS, CS·L-AspA и CS·D-AspA в D₂O
Correlation of cross-peaks in the COSY, ROESY and NOESY spectra of solutions of CS, CS·L-AspA and CS·D-AspA in D₂O

δ, ppm		CS·L-AspA	δ, ppm		CS·D-AspA		
¹ H	¹ H		¹ H	¹ H			
COSY							
3.91	2.73	H ₃ -H ₆	2H _β	2.80	3.95	2H _β	H ₃ -H ₆
3.91	2.86			2.87	3.96		
3.93	2.86			2.92	3.95		
3.93	2.73			3.14	4.85	H ₂	H ₁
3.95	2.73			3.16	4.85		
3.95	2.86			3.19	4.85		
				3.71	3.87	H ₃ -H ₆	H _α
				3.88	3.16	H _α	H ₂
ROESY							
3.90	2.74	H ₃ -H ₆	2H _β	3.93	2.90	H ₃ -H ₆	2H _β
3.90	2.86			3.95	2.78		
3.92	2.73			3.95	2.90		
3.92	2.86			3.96	2.78		
3.95	2.73			3.98	2.78		
3.95	2.86			3.98	2.90		
NOESY							
3.72	3.15	H ₃ -H ₆	H ₂	3.72	3.89	H ₃ -H ₆	H _α
3.72	3.88		H _α	3.72	4.85		H ₁
3.72	4.84		H ₁	3.88	3.16		H _α
3.88	3.15	H _α	H ₂	3.89	4.85	H ₁	
3.88	4.84		H ₁	3.92	2.78	H ₃ -H ₆	2H _β
3.92	2.72	H ₃ -H ₆	2H _β	3.93	2.89		
3.94	2.85			3.96	2.78		
				3.98	2.79		

Рентгеновская дифрактометрия показала существенные различия в надмолекулярном упорядочении *L*- и *D*-аспарагината CS как в сравнении с исходным образцом, так и в отношении энантиомерных солевых форм (рис. 5, табл. 4). На рентгеновской дифрактограмме исходного порошка CS на фоне аморфного гало проявляются основные кристаллические рефлексы при $2\theta \sim 11.1$ и 19.4 град, а также три малоинтенсивных рефлекса в диапазоне 25.5 – 29.0 град. Дифрактограмма является типичной для аморфно-кристаллических полимеров с невысокой степенью кристалличности.

Рентгеновские дифрактограммы энантиомерных солей CS характеризуются уширением основных рефлексов, что свидетельствует о наличии в них меньших по размеру структурных элементов. Интенсивность первого основного рефлекса в области $2\theta \sim 11.2$ – 11.6 град повышается для обоих образцов, а второго – понижается и смещается до 18.5 град для CS·*L*-AspA и 18.7 град для CS·*D*-AspA. Обнаруживаются дополнительные рефлексы в диапазоне $2\theta \sim 21$ – 23 град, проявляющиеся для CS·*L*-AspA уширенным пиком с центром при $2\theta \sim 22.2$ град, а для CS·*D*-AspA – двумя пиками при 21.5 и 22.2 град.

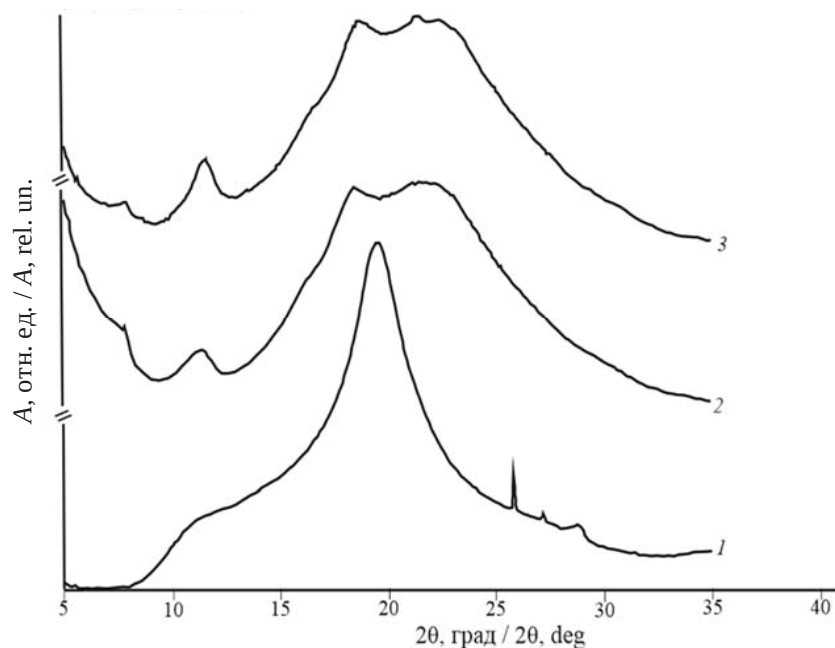


Рис. 5. Рентгеновские дифрактограммы порошков: 1 – CS, 2 – CS·L-AspA, 3 – CS·D-AspA

Fig. 5. X-ray diffraction patterns of powders: 1 – CS, 2 – CS·L-AspA, 3 – CS·D-AspA

Таблица 4 / Table 4

Характеристика кристаллитов и степень кристалличности порошков CS, CS·L-AspA и CS·D-AspA
Characteristics of crystallites and the degree of crystallinity of CS, CS·L-AspA and CS·D-AspA powders

Образец / Sample	Дифракционный угол 2θ, град / Diffraction angle 2θ, deg	Межплоскостное расстояние d, Å / Interplanar distance d, Å	Степень кристалличности χ, % / Degree of crystallinity χ, %
CS	11.12	7.96	34.3
	19.38	4.58	
	25.85	3.45	
	27.31	3.27	
	28.77	3.10	
CS·L-AspA	7.88	11.23	28.0
	11.23	7.88	
	18.46	4.81	
	22.15	4.01	
CS·D-AspA	7.77	11.38	30.2
	11.62	7.62	
	18.69	4.75	
	21.46	4.14	
	22.23	4.00	

Слабоинтенсивные рефлексы в диапазоне $2\theta \sim 25.5\text{--}29.0$ град, наблюдающиеся у исходного порошка CS, на дифрактограммах его диастереомерных солей не обнаруживаются.

Степень кристалличности порошков CS·L-AspA и CS·D-AspA достаточно высокая (см. табл. 4). Несколько меньше исходного образца, но не столь значимо как для солевых комплексов



CS с традиционными карбоновыми кислотами (CH_3COOH , HCOOH) [39, 40]. Значения межплоскостных расстояний в кристаллической решётке, определенные при основном рефлексе $2\theta \sim 11$ град уменьшаются, а при $2\theta \sim 19$ град – увеличиваются. Обнаруженные структурные изменения наиболее выражены для *D*-изомерных солевых комплексов CS. Наиболее высокие значения степени кристалличности также наблюдаются для *D*-аспарагината CS.

Заключение

Таким образом, солевые комплексы CS·*L*-(*D*-)AspA отличаются от известных в литературе солевых комплексов CS с органическими кислотами высокоупорядоченной ориентацией макроцепей. Совокупность результатов элементного анализа, ИК- и ЯМР-спектроскопии, рентгеновской дифрактометрии позволяет предположить, что и развитая система меж- и внутримолекулярных контактов в надмолекулярной структуре энантиомерных солей CS и *L*-(*D*-)AspA стабилизирована посредством сложных ион-ионно-водородных контактов, включающих классические ионные и водородные связи, а также специфические ион-дипольные и ассоциировано-кулоновские взаимодействия, в которых немаловажную роль выполняет стереоизомерная форма оптических антиподов AspA. Солевой комплекс CS·*D*-AspA, в отличие от CS·*L*-AspA, характеризуется меньшим количеством кристаллизационной воды, более развитой системой меж- и внутримолекулярных контактов и более высокой степенью кристалличности.

Список литературы

1. Kou S. G., Peters L., Mucalo M. Chitosan: A review of molecular structure, bioactivities and interactions with the human body and micro-organisms // *Carbohydrate Polymers*. 2022. Vol. 282. ID 119132. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119132>
2. Варламов В. П., Ильина А. В., Шагдарова Б. Ц., Луньков А. П., Мысякина И. С. Хитин/хитозан и его производные: Фундаментальные и прикладные аспекты // *Успехи биологической химии*. 2020. Т. 60. С. 317–368.
3. Sajomsang W., Tantayanon S., Tangpasuthadol V., Daly W. H. Quaternization of N-aryl chitosan derivatives: synthesis, characterization, and antibacterial activity // *Carbohydrate Research*. 2009. Vol. 344, № 18. P. 2502–2511. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.09.004>
4. Xie Y., Liu X., Chen Q. Synthesis and characterization of water-soluble chitosan derivate and its antibacterial activity // *Carbohydrate Polymers*. 2007. Vol. 69. P. 142–147.
5. Ogawa K., Yui T., Okuyama K. Three D structures of chitosan // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2004. Vol. 34, № 1-2. P. 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2003.11.002>
6. Ogawa Y., Naito P.-K., Nishiyama Y. Hydrogen-bonding network in anhydrous chitosan from neutron crystallography and periodic density functional theory calculations // *Carbohydrate Polymers*. 2019. Vol. 207. P. 211–217. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.04>
7. Kawahara M., Yui T., Oka K., Zugenmaier P., Suzuki S., Kitamura S., Okuyama K., Ogawa K. Fourth 3D Structure of the Chitosan Molecule: Conformation of Chitosan in Its Salts with Medical Organic Acids Having a Phenyl Group // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2003. Vol. 67, № 7. P. 1545–1550. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.1545>
8. Хакимова А. А., Поминов В. В., Бабичева Т. С., Шмаков С. Л., Захаревич А. М., Шиповская А. Б. Применение ПЭМ для изучения микро- и наносфер хитозана, полученных их его солей с разными кислотами // *Научно-технические ведомости СПбГПУ. Физико-математические науки*. 2022. Т. 15, № 3.3. С. 381–385. <https://doi.org/10.18721/JPM.153.375>
9. Селиванова Н. М., Зимица М. В., Галяметдинов Ю. Г. Фазовое поведение хитозана в органических кислотах // *Жидкие кристаллы и их практическое использование*. 2019. Т. 19, № 3. С. 76–82.
10. Li Q., Song B., Yang Z., Fan H. Electrolytic conductivity behaviors and solution conformations of chitosan in different acid solutions // *Carbohydrate Polymers*. 2006. Vol. 63, № 2. P. 272–282. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.09.024>
11. Singh J., Dutta P. K. Preparation, circular dichroism induced helical conformation and optical property of chitosan acid salt complexes for biomedical applications // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2009. Vol. 45, № 4. P. 384–392. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.07.004>
12. Sekar V., Rajendran K., Vallinayagam S., Deepak V., Mahadevan S. Synthesis and characterization of chitosan ascorbate nanoparticles for therapeutic inhibition for cervical cancer and their in silico modeling // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018. Vol. 62. P. 239. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.07.004>
13. Endres M. B., Weichold O. Sorption-active transparent films based on chitosan // *Carbohydrate Polymers*. 2019. Vol. 208. P. 108–114. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.12.031>
14. Pigaleva M. A., Portnov I. V., Rudov A. A., Blagodatikh I. V., Grigoriev T. E., Gallyamov M. O., Potemkin I. I. Stabilization of chitosan aggregates at the nanoscale in solutions in carbonic acid // *Macromolecules*. 2014. Vol. 47, № 16. P. 5749–5758. <https://doi.org/10.1021/ma501169c>
15. Kawada J., Yui T., Abe Y., Ogawa K. Crystalline features of chitosan-L- and D-lactic acid salts // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 1998. Vol. 62, № 4. P. 700–704. <https://doi.org/10.1271/bbb.62.700>



16. Малинкина О. Н., Журавлёва Ю. Ю., Шиповская А. Б. Ранозаживляющая активность *in vivo* глицериогидрогелевых пластин на основе аскорбата хитозана, аллоэ вера и полиолата кремния // Прикладная биохимия и микробиология. 2022. Т. 58, № 2. С. 179–184. <https://doi.org/10.31857/S0555109922020143>
17. Шиповская А. Б., Малинкина О. Н., Гегель Н. О., Зудина И. В., Луговицкая Т. Н. Структура и свойства солевых комплексов хитозана с диастереомерами аскорбиновой кислоты // Известия Академии наук. Серия химическая. 2021. № 9. С. 1765–1774. <https://doi.org/10.1007/s11172-021-3281-5>
18. Гегель Н. О., Зудина И. В., Малинкина О. Н., Шиповская А. Б. Влияние изомерной формы аскорбиновой кислоты на антибактериальную активность её солей с хитозаном // Микробиология. 2018. Т. 87, № 5. С. 618–623. <https://doi.org/10.1134/S0026365618050105>
19. Gegel N. O., Zhuravleva Y. Y., Shipovskaya A. B., Malinkina O. N., Zudina I. V. Influence of chitosan ascorbate chirality on the gelation kinetics and properties of silicon-chitosan-containing glycerohydrogels // Polymers. 2018. Vol. 10, № 3. ID 259. <https://doi.org/10.3390/polym10030259>
20. Ayon N. J. Features, roles and chiral analyses of proteinogenic amino acids // AIMS Molecular Science. 2020. Vol. 7, iss. 3. P. 229–268. <https://doi.org/10.3934/molsci.202001>
21. Lee Tu, Lin Yu K. The origin of life and the crystallization of aspartic acid in water // Crystal Growth & Design. 2010. Vol. 10, № 4. P. 1652–1660. <https://doi.org/10.1021/cg901219f>
22. Червяков А. В., Захарова М. Н., Пестов Н. Б. Роль D-аминокислот в патогенезе нейродегенеративных заболеваний и при нормальном старении // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2014. Т. 8, № 2. С. 51–58.
23. Wang J., Wang J., Liu J., Wang S., Pei J. Solubility of D-aspartic acid and L-aspartic acid in aqueous salt solutions from (293 to 343) K // Journal of Chemical & Engineering Data. 2010. Vol. 55, № 4. P. 1735–1738. <https://doi.org/10.1021/je9007102>
24. Sang-Aroon W., Ruangpornvisuti V. Determination of aqueous acid-dissociation constants of aspartic acid using PCM/DFT method // International Journal of Quantum Chemistry. 2008. Vol. 108, № 6. P. 1181–1188. <https://doi.org/10.1002/qua.21569>
25. Apelblat A., Manzurola E., Orekhova Z. Electrical conductance studies in aqueous solutions with aspartic ions // Journal of Solution Chemistry. 2008. Vol. 37. P. 97–105. <https://doi.org/10.1007/s10953-007-9223-5>
26. Derissen J. L., Endeman H. J., Peerdeman A. F. The crystal and molecular structure of L-aspartic acid // Acta Crystallographica Section B: Structural Crystallography and Crystal Chemistry. 1968. Vol. 24, № 10. P. 1349–1354. <https://doi.org/10.1107/S05567740868004280>
27. Луговицкая Т. Н., Шиповская А. Б. Физико-химические свойства водных растворов L-аспарагиновой кислоты с добавкой хитозана // Журнал общей химии. 2017. Т. 87, № 4. С. 650–656.
28. Lugovitskaya T. N., Shipovskaya A. B., Shmakov S. L., Shipenok X. M. Formation, structure, properties of chitosan aspartate and metastable state of its solutions for obtaining nanoparticles // Carbohydrate Polymers. 2022. Vol. 277. ID 118773. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118773>
29. Lugovitskaya T. N., Shipovskaya A. B., Shipenok X. M. Kinetic instability of a chitosan – aspartic acid – water system as a method for obtaining nano- and microparticle // Chimica Techno Acta. 2021. Vol. 8, iss. 4. ID 20218405. <https://doi.org/10.15826/chimtech.2021.8.4.05>
30. Singh J., Dutta P. K. Preparation, circular dichroism induced helical conformation and optical property of chitosan acid salt complexes for biomedical applications // International Journal of Biological Macromolecules. 2009. Vol. 45, iss. 4. P. 384–392. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.07.004>
31. Луговицкая Т. Н., Зудина И. В., Шиповская А. Б. Получение и свойства аспарагиновокислых растворов хитозана // Журнал прикладной химии. 2020. Т. 93, вып. 1. С. 90–99. <https://doi.org/10.31857/S0044461820010090>
32. Shipovskaya A., Shipenok X., Lugovitskaya T., Babicheva T. Self-assembling nano- and microparticles of chitosan L- and D-aspartate: Preparation, structure, and biological activity // Materials Proceedings. 2023. Vol. 14, iss. 1. ID 31. <https://doi.org/10.3390/IOC2023-14492>
33. Santos Z. M., Caroni A. L. P. F., Pereira M. R., da Silva D. R., Fonseca J. L. C. Determination of deacetylation degree of chitosan: A comparison between conductometric titration and CHN elemental analysis // Carbohydrate Research. 2009. Vol. 344. P. 2591–2595. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.08.030>
34. Тарасевич Б. Н. ИК-спектры основных классов органических соединений. Справочные материалы. М.: Изд-во МГУ, 2012. 55 с.
35. Комаров Б. А., Малков Г. В., Васильев С. Г., Баскаков С. А., Эстрина Г. А., Гурьева Л. Л., Волков В. И., Фролова М. А., Албулов А. И. Окислительная деструкция хитозана и его стабильность // Высокомолекулярные соединения. Серия Б. 2019. Т. 61, № 2. С. 132–143. <https://doi.org/10.1134/S2308113919020037>
36. Kumirska J., Czerwicka M., Kaczyński Z., Bychowska A., Brzozowski K., Thöming J., Stepnowski P. Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan // Marine Drugs. 2010. Vol. 8, iss. 5. P. 1567–1636. <https://doi.org/10.3390/md8051567>
37. Shipovskaya A. B., Shmakov S. L., Gegel N. O. Optical activity anisotropy of chitosan-based films // Carbohydrate Polymers. 2019. Vol. 206. P. 476–486. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.026>
38. Могилевская Е. Л., Акопова Т. А., Зеленецкий А. Н., Озерин А. Н. О кристаллической структуре хитина и хитозана // Высокомолекулярные соединения. Серия А. 2006. Т. 48, № 2. С. 216–226.
39. Дресвянина Е. Н., Гребенников С. Ф., Добровольская И. П., Масленникова Т. П., Иванькова Е. М.,



Юдин В. Е. Влияние наночитина на сорбционные свойства композиционных пленок на основе хитозана // Высокомолекулярные соединения. Серия А. 2020. Т. 62, № 3. С. 181–188. <https://doi.org/10.31857/S2308112020030050>

40. Агеев Е. П., Вихорева Г. А., Зоткин М. А., Матушкина Н. Н., Герасимов В. И., Зезин С. Б., Оболонкова Е. С. Структура и транспортные свойства хитозановых пленок, модифицированных термообработкой // Высокомолекулярные соединения. Серия А. 2004. Т. 46, № 12. С. 2035–2041.

References

1. Kou S. G., Peters L., Mucalo M. Chitosan: A review of molecular structure, bioactivities and interactions with the human body and micro-organisms. *Carbohydrate Polymers*, 2022, vol. 282, ID 119132. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119132>
2. Varlamov V. P., Ilyina A. V., Shagdarova B. Ts., Lunkov A. P., Mysyakina I. S. Chitin/chitosan and its derivatives: Fundamental problems and practical approaches. *Biochemistry (Moscow)*, 2020, vol. 85, no. Suppl. 1, pp. 154–176. <https://doi.org/10.1134/S0006297920140084>
3. Sajomsang W., Tantayanon S., Tangpasuthadol V., Daly W. H. Quaternization of N-aryl chitosan derivatives: Synthesis, characterization, and antibacterial activity. *Carbohydrate Research*, 2009, vol. 344, no. 18, pp. 2502–2511. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.09.004>
4. Xie Y., Liu X., Chen Q. Synthesis and characterization of water-soluble chitosan derivative and its antibacterial activity. *Carbohydrate Polymers*, 2007, vol. 69, pp. 142–147.
5. Ogawa K., Yui T., Okuyama K. Three D structures of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2004, vol. 34, no. 1-2, pp. 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2003.11.002>
6. Ogawa Y., Naito P.-K., Nishiyama Y. Hydrogen-bonding network in anhydrous chitosan from neutron crystallography and periodic density functional theory calculations. *Carbohydrate Polymers*, 2019, vol. 207, pp. 211–217. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.04>
7. Kawahara M., Yui T., Oka K., Zugenmaier P., Suzuki S., Kitamura S., Okuyama K., Ogawa K. Fourth 3D structure of the chitosan molecule: Conformation of chitosan in its salts with medical organic acids having a phenyl group. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2003, vol. 67, no. 7, pp. 1545–1550. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.1545>
8. Khakimova A. A., Pominov V. V., Babicheva T. S., Shmakov S. L., Zakharevich A. M., Shipovskaya A. B. TEM use for the study of chitosan microspheres and nanospheres obtained from its salts with several acids. *St. Petersburg Polytechnic University Journal. Physics and Mathematics*, 2022, vol. 15, no. 3.3, pp. 381–385 (in Russian). <https://doi.org/10.18721/JPM.153.375>
9. Selivanova N. M., Zimina M. V., Galyametdinov Y. G. Phase behavior of chitosan in organic acids. *Liquid Crystals and Their Practical Use*, 2019, vol. 19, no. 3, pp. 76–82 (in Russian).
10. Li Q., Song B., Yang Z., Fan H. Electrolytic conductivity behaviors and solution conformations of chitosan in different acid solutions. *Carbohydrate Polymers*, 2006, vol. 63, no. 2, pp. 272–282. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.09.024>
11. Singh J., Dutta P. K. Preparation, circular dichroism induced helical conformation and optical property of chitosan acid salt complexes for biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2009, vol. 45, no. 4, pp. 384–392. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.07.004>
12. Sekar V., Rajendran K., Vallinayagam S., Deepak V., Mahadevan S. Synthesis and characterization of chitosan ascorbate nanoparticles for therapeutic inhibition for cervical cancer and their *in silico* modeling. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, vol. 62, pp. 239. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.07.004>
13. Endres M. B., Weichold O. Sorption-active transparent films based on chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 2019, vol. 208, pp. 108–114. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.12.031>
14. Pigaleva M. A., Portnov I. V., Rudov A. A., Blagodatskikh I. V., Grigoriev T. E., Gallyamov M. O., Potemkin I. I. Stabilization of chitosan aggregates at the nanoscale in solutions in carbonic acid. *Macromolecules*, 2014, vol. 47, no. 16, pp. 5749–5758. <https://doi.org/10.1021/ma501169c>
15. Kawada J., Yui T., Abe Y., Ogawa K. Crystalline features of chitosan-L- and D-lactic acid salts. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1998, vol. 62, no. 4, pp. 700–704. <https://doi.org/10.1271/bbb.62.700>
16. Malinkina O. N., Zhuravleva Y. Y., Shipovskaya A. B. *In vivo* wound-healing activity of glycerohydrogel plates based on ascorbate chitosan, aloe vera, and silicon polyolate. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2022, vol. 58, no. 2, pp. 161–165 (in Russian). <https://doi.org/10.1134/S0003683822020144>
17. Shipovskaya A. B., Malinkina O. N., Gegel N. O., Zudina I. V., Lugovitskaya T. N. Structure and properties of chitosan salt complexes with ascorbic and diastereomers. *Russian Chemical Bulletin*, 2021, vol. 70, no. 9, pp. 1765–1774 (in Russian). <https://doi.org/10.1007/s11172-021-3281-5>
18. Gegel N. O., Zudina I. V., Malinkina O. N., Shipovskaya A. B. Effect of ascorbic and isomeric forms on antibacterial activity of its chitosan salts. *Microbiology*, 2018, vol. 87, no. 5, pp. 732–737 (in Russian). <https://doi.org/10.1134/S0026261718050107>
19. Gegel N. O., Zhuravleva Y. Y., Shipovskaya A. B., Malinkina O. N., Zudina I. V. Influence of chitosan ascorbate chirality on the gelation kinetics and properties of silicon-chitosan-containing glycerohydrogels. *Polymers*, 2018, vol. 10, no. 3, ID 259. <https://doi.org/10.3390/polym10030259>
20. Ayon N. J. Features, roles and chiral analyses of proteinogenic amino acids. *AIMS Molecular Science*, 2020, vol. 7, iss. 3, pp. 229–268. <https://doi.org/10.3934/molsci.202001>

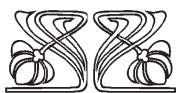
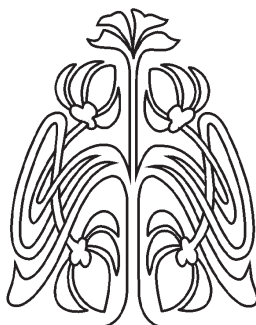


21. Lee Tu, Lin Yu K. The origin of life and the crystallization of aspartic acid in water. *Crystal Growth & Design*, 2010, vol. 10, no. 4, pp. 1652–1660. <https://doi.org/10.1021/cg901219f>
22. Cherviakov A. V., Zakharova M. N., Pestov N. B. Role of D-amino acids in the pathogenesis of neurodegenerative diseases and in normal aging. *Annals of Clinical and Experimental Neurology*, 2014, vol. 8, no. 2, pp. 51–58 (in Russian).
23. Wang J., Wang J., Liu J., Wang S., Pei J. Solubility of D-aspartic acid and L-aspartic acid in aqueous salt solutions from (293 to 343) K. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 2010, vol. 55, no. 4, pp. 1735–1738. <https://doi.org/10.1021/je9007102>
24. Sang-Aroon W., Ruangpornvisuti V. Determination of aqueous acid-dissociation constants of aspartic acid using PCM/DFT method. *International Journal of Quantum Chemistry*, 2008, vol. 108, no. 6, pp. 1181–1188. <https://doi.org/10.1002/qua.21569>
25. Apelblat A., Manzurola E., Orekhova Z. Electrical conductance studies in aqueous solutions with aspartic ions. *Journal of Solution Chemistry*, 2008, vol. 37, pp. 97–105. <https://doi.org/10.1002/s10953-007-9223-5>
26. Derissen J. L., Endeman H. J., Peerdeman A. F. The crystal and molecular structure of L-aspartic acid. *Acta Crystallographica Section B: Structural Crystallography and Crystal Chemistry*, 1968, vol. 24, no. 10, pp. 1349–1354. <https://doi.org/10.1107/S0567740868004280>
27. Lugovitskaya T. N., Shipovskaya A. B. Physicochemical properties of aqueous solutions of L-aspartic acid containing chitosan. *Russian Journal of General Chemistry*, 2017, vol. 87, no. 4, pp. 782–787 (in Russian). <https://doi.org/10.1134/S1070363217040193>
28. Lugovitskaya T. N., Shipovskaya A. B., Shmakov S. L., Shipenok X. M. Formation, structure, properties of chitosan aspartate and metastable state of its solutions for obtaining nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 2022, vol. 277, ID 118773. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118773>
29. Lugovitskaya T. N., Shipovskaya A. B., Shipenok X. M. Kinetic instability of a chitosan – aspartic acid – water system as a method for obtaining nano- and micro-particle. *Chimica Techno Acta*, 2021, vol. 8, iss. 4, ID 20218405. <https://doi.org/10.15826/chimtech.2021.8.4.05>
30. Singh J., Dutta P. K. Preparation, circular dichroism induced helical conformation and optical property of chitosan acid salt complexes for biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2009, vol. 45, iss. 4, pp. 384–392. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.07.004>
31. Lugovitskaya T. N., Zudina I. V., Shipovskaya A. B. Obtaining and properties of L-aspartic acid solutions of chitosan. *Russian Journal of Applied Chemistry*, 2020, vol. 93, iss. 1, pp. 80–88 (in Russian). <https://doi.org/10.1134/S1070427220010097>
32. Shipovskaya A., Shipenok X., Lugovitskaya T., Babicheva T. Self-assembling nano- and microparticles of chitosan L- and D-aspartate: Preparation, structure, and biological activity. *Materials Proceedings*, 2023, vol. 14, iss. 1, ID 31. <https://doi.org/10.3390/IOC2023-14492>
33. Santos Z. M., Caroni A. L. P. F., Pereira M. R., da Silva D. R., Fonseca J. L. C. Determination of deacetylation degree of chitosan: A comparison between conductometric titration and CHN elemental analysis. *Carbohydrate Research*, 2009, vol. 344, pp. 2591–2595. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.08.030>
34. Tarasevich B. N. *ИК-спектры основных классов органических соединений. Справочные материалы* [IR spectra of the main classes of organic compounds. Reference materials]. Moscow, Moscow University Press, 2012. 55 p. (in Russian).
35. Komarov B. A., Malkov G. V., Vasil'ev S. G., Baskakov S. A., Estrina G. A., Gur'eva L. L., Volkov V. I., Frolova M. A., Albulov A. I. Oxidative destruction of chitosan and its stability. *Polymer Science, Series B*, 2019, vol. 61, no. 2, pp. 189–199. <https://doi.org/10.1134/S2308113919020037>
36. Kumirska J., Czerwicka M., Kaczyński Z., Bychowska A., Brzozowski K., Thöming J., Stepnowski P. Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan. *Marine Drugs*, 2010, vol. 8, iss. 5, pp. 1567–1636. <https://doi.org/10.3390/md8051567>
37. Shipovskaya A. B., Shmakov S. L., Gegel N. O. Optical activity anisotropy of chitosan-based films. *Carbohydrate Polymers*, 2019, vol. 206, pp. 476–486. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.026>
38. Mogilevskaya E. L., Akopova T. A., Zelenetsky A. N., Ozerin A. N. The crystal structure of chitin and chitosan. *Polymer Science, Series A*, 2006, vol. 48, no. 2, pp. 116–123 (in Russian). <https://doi.org/10.1134/S0965545X06020039>
39. Dresvyanina E. N., Grebennikov S. F., Dobrovol'skaya I. P., Ivan'kova E. M., Yudin V. E., Maslennikova T. P., Ivanov'kova E. M., Yudin V. E. Effect of chitin nanofibrils on sorption behavior of chitosan-based composite films. *Polymer Science, Series A*, 2020, vol. 62, no. 3, pp. 181–188 (in Russian). <https://doi.org/10.1134/S0965545X20030050>
40. Ageev E. P., Vikhoreva G. A., Zotkin M. A., Matushkina N. N., Gerasimov V. I., Zezin S. B., Obolonkova E. S. Structure and transport behavior of heat-treated chitosan films. *Polymer Science, Series A*, 2004, vol. 46, no. 12, pp. 1245–1250 (in Russian).

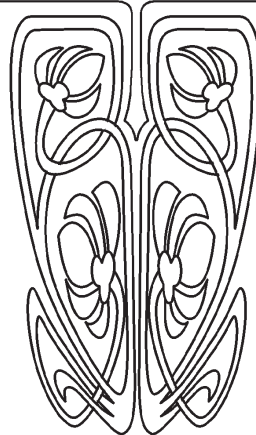
Поступила в редакцию 14.09.2023; одобрена после рецензирования 25.09.2023; принята к публикации 27.09.2023
The article was submitted 14.09.2023; approved after reviewing 25.09.2023; accepted for publication 27.09.2023



БИОЛОГИЯ



НАУЧНЫЙ
ОТДЕЛ



Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 4. С. 426–436
Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology, 2023, vol. 23, iss. 4, pp. 426–436
<https://ichbe.sgu.ru> <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-4-426-436>
EDN: JPBAVO

Научная статья
УДК 579.26:574.23

Геномные перестройки влияют на устойчивость биопленок почвенных бактерий *Azospirillum brasilense* к абиотическим стрессам

Д. И. Мокеев¹, Е. М. Телешева¹✉, И. В. Волохина¹, С. С. Евстигнеева¹,
Т. Е. Пылаев², Л. П. Петрова¹, Ю. А. Филипьева¹, А. В. Шелудько¹

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук» (ИБФРМ РАН), Россия, 410049, г. Саратов, пр. Энтузиастов, д. 13

²Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского, Россия, 410012, г. Саратов, ул. Большая Казачья, д. 112

Мокеев Дмитрий Игоревич, младший научный сотрудник лаборатории генетики микроорганизмов, mokeev.d.93@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0558-0775>

Телешева Елизавета Михайловна, младший научный сотрудник лаборатории генетики микроорганизмов, sentebrinka@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9405-1877>

Волохина Ирина Васильевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории генетики микроорганизмов, volokhina_i@ibppm.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9088-481X>

Евстигнеева Стелла Сергеевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории генетики микроорганизмов, stels20295@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1593-6157>

Пылаев Тимофей Евгеньевич, кандидат биологических наук, директор научно-производственного и образовательного центра молекулярно-генетических и клеточных технологий, pylaevte@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-2701-3333>

Петрова Лилия Петровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории генетики микроорганизмов, petrova_lp@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1593-6157>

Филипьева Юлия Анатольевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории генетики микроорганизмов, ljuche@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3182-1007>

Шелудько Андрей Вячеславович, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории генетики микроорганизмов, shel71@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2535-5225>

Аннотация. Используемые в качестве биоудобрений бактерии *Azospirillum brasilense* оказывают существенное положительное влияние на рост и развитие растений. Геном типового штамма *A. brasilense* Sp7 представлен хромосомой и многочисленными плазмидами с молекулярной массой 90, 115 и более 300 МДа. Геномные перестройки, вызывающие



изменения «плазмидного профиля», могут способствовать формированию в бактериальной популяции субпопуляций или фенотипических вариантов. Имеется мало данных о роли таких перестроек в адаптации *A. brasilense* к динамичным условиям окружающей среды. Способность азоспирилл формировать биопленки также имеет определенное значение для успешного функционирования растительно-микробной ассоциации и противостояния бактерий и растений различным абиотическим стрессам.

Цель данной работы заключалась в анализе геномных перестроек у спонтанных производных *A. brasilense* Sp7 и оценке устойчивости их биопленок к высушиванию, водному и окислительному стрессам. ПЦР-анализ для выявления изменений в структуре геномной ДНК проводили с использованием праймеров, соответствующих известным консервативным мотивам в повторяющихся последовательностях нуклеотидов бактерий. Относительное количество биомассы биопленок оценивали, измеряя A_{540} кристаллического фиолетового, десорбированного после ее окрашивания. Уровень относительной респираторной активности клеток в биопленках определяли флуориметрическим резазурин-тестом. Для создания модели осмотического/водного стресса использовали непроницающий осмотический агент ПЭГ 6000. Показано, что перестройки в геномной ДНК способствуют образованию стабильных фенотипических вариантов штамма Sp7, по-разному формирующих биопленки в условиях водного стресса. Отобран производный штамм *A. brasilense* Sp7.8, биопленочная популяция которого устойчивее к водному стрессу по сравнению с таковой у родительского штамма.

Ключевые слова: азоспириллы, плазмиды, геномные перестройки, биопленки, водный и окислительный стрессы

Благодарности: Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-26-00271).

Для цитирования: Мокеев Д. И., Телешева Е. М., Волохина И. В., Евстигнеева С. С., Пылаев Т. Е., Петрова Л. П., Филипьева Ю. А., Шелудько А. В. Геномные перестройки влияют на устойчивость биопленок почвенных бактерий *Azospirillum brasilense* к абиотическим стрессам // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 4. С. 426–436. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-4-426-436>, EDN: JPBABO

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

Article

Genomic rearrangements affect the resistance of biofilms of soil bacteria *Azospirillum brasilense* to abiotic stress

D. I. Mokeev¹, E. M. Telesheva¹ ✉, I. V. Volokhina¹, S. S. Evstigneeva¹,
T. E. Pylaev², L. P. Petrova¹, Yu. A. Filip'echeva¹, A. V. Shelud'ko¹

¹Institute 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 Pr., Saratov 410049, Russia

²V. I. Razumovsky Saratov State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 112 Bolshaya Kazachya St., Saratov 410012, Russia

Dmitriy I. Mokeev, mokeev.d.93@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0558-0775>

Elizaveta M. Telesheva, sentebrinka@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9405-1877>

Irina V. Volokhina, volokhina_i@ibppm.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9088-481X>

Stella S. Evstigneeva, stels20295@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1593-6157>

Timofey E. Pylaev, pylaevte@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-2701-3333>

Liliya P. Petrova, petrova_lp@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1593-6157>

Yuliya A. Filip'echeva, ljuche@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3182-1007>

Andrey V. Shelud'ko, shel71@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2535-5225>

Abstract. The bacteria *Azospirillum brasilense*, used as biofertilizers, have a significant positive effect on the growth and development of plants. The genome of the strain *A. brasilense* Sp7 is represented by a chromosome and numerous plasmids with molecular weight of 90, 115, and over 300 MDa. Genomic rearrangements that cause changes in the “plasmid profile” can contribute to the formation of subpopulations or phenotypic variants in a bacterial population. There is little data on the role of such rearrangements in the adaptation of *A. brasilense* to dynamic environmental conditions. The ability of azospirilla to form biofilms also has a determined significance for the successful functioning of the plant-microbial association and the resistance of bacteria and plants to various abiotic stresses. The purpose of this work consisted of the analysis of the genomic rearrangements in spontaneous derivatives of *A. brasilense* Sp7 and the assessment of the resistance of their biofilms to drying, water stress and oxidative stress. PCR analysis to detect changes in the structure of genomic DNA was performed using primers corresponding to known conservative motifs in repetitive bacterial nucleotide sequences. The relative amount of the biofilm biomass was assessed by measuring the crystal violet A540 desorbed after staining. The level of relative respiratory activity of cells in biofilms was determined by the fluorometric resazurin test. The non-penetrating osmotic agent PEG 6000 was used to create the osmotic/water stress model. It was shown that rearrangements in genomic DNA contribute to the formation of stable phenotypic variants of the Sp7 strain, which form biofilms in different ways under water stress conditions. A derived strain of *A. brasilense* Sp7.8, the biofilm population of which is more resistant to water stress compared to the parent strain was selected.

Keywords: azospirilla, plasmids, genomic rearrangements, biofilms, water stress, oxidative stress

Acknowledgements: This research was supported by the Russian Science Foundation (project No. 23-26-00271).

For citation: Mokeev D. I., Telesheva E. M., Volokhina I. V., Evstigneeva S. S., Pylaev T. E., Petrova L. P., Filip'echeva Yu. A., Shelud'ko A. V. Genomic rearrangements affect the resistance of biofilms of soil bacteria *Azospirillum brasilense* to abiotic stress. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2023, vol. 23, iss. 4, pp. 426–436 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-4-426-436>, EDN: JPBABO

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



Введение

Используемые в качестве биоудобрений бактерии *Azospirillum brasilense* оказывают существенное положительное влияние на рост растений и их устойчивость к неблагоприятным абиотическим и биотическим факторам [1, 2]. Эксудация растениями легкодоступных источников углерода и специфических сигнальных молекул, абиотические факторы способствуют повышению численности микроорганизмов и их активности в ризосфере, узком слое почвы, прилегающем к растительному корню [3]. Изменение климата, засуха и засоление почв относятся к числу основных абиотических стрессов, с которыми сталкиваются растения и ассоциированные с ними бактерии [4, 5]. В условиях стресса увеличивается потребление растениями ростовых факторов, возникает дефицит ресурсов, приводящий к замедлению роста и развития растений [6]. Подобно растениям ризосферные бактерии также подвергаются стрессу [4]. Ризосферные бактерии для адаптации и повышения конкурентоспособности в занимаемой экологической нише, противостояния абиотическим стрессам используют разнообразные физиолого-биохимические и поведенческие механизмы [1, 3, 7]. Одним из механизмов, посредством которых микроорганизмы адаптируются к изменениям окружающей среды, является фенотипическая изменчивость – явление, которое характеризуется наличием субпопуляции с фенотипом, отличающимся от основной популяции. Такая субпопуляция в соответствующих условиях может стать доминирующей. Фазовые вариации могут затрагивать морфологию колоний, агрегацию клеток и подвижность; синтез капсулы и пигментов; продукцию гликополимеров, различных метаболитов; устойчивость к солевому стрессу и др. [8, 9]. Ранее были описаны спонтанные производные штамма *A. brasilense* Sp7, у которых изменения «плазмидного профиля» коррелируют с их способностью накапливать биомассу в биопленках, сформированных на абиотических поверхностях под жидкой средой, наряду с изменением ряда культурально-морфологических свойств [10–12]. Способность азоспирилл формировать биопленки может иметь определенное значение для успешного формирования и функционирования растительно-микробной ассоциации и противостояния бактерий и растений различным абиотическим стрессам [1, 7, 13]. В биопленках бактерии заключены в матрикс, являющийся резервуаром воды, ферментов и питательных веществ и играющий

структурную и защитную роль [14]. Матрикс биопленок медленно высыхает, чем предохраняет микроорганизмы от изменений водного потенциала. Основные биополимеры матрикса (гликополимеры, белки и нуклеиновые кислоты) биопленок азоспирилл, обеспечивают фиксацию пленок на поверхности и выполняют каркасную функцию, способствуют созданию в биопленках условий для фиксации азота [15–17]. Наличие цистоподобных покоящихся форм в биопленочной популяции повышает устойчивость азоспирилл к таким негативным воздействиям, как высушивание и окислительный стресс [13, 16]. Поскольку «плазмидные перестройки» затрагивают способность формировать биопленки [10–12], можно предположить, что устойчивость биопленок соответствующих производных к стрессу может отличаться от устойчивости пленок исходного штамма *A. brasilense* Sp7. Механизмы, связанные с фенотипической изменчивостью, разнообразны и включают генетические и эпигенетические изменения [18]. Однако наблюдение «плазмидных перестроек» не всегда дает возможность сделать вывод о том, что фенотипические различия между производными Sp7 обусловлены изменениями в составе плазмид [8]. ПЦР-анализ с использованием праймеров, соответствующих известным консервативным мотивам в повторяющихся последовательностях нуклеотидов бактерий, позволяет выявить изменения в структуре геномной ДНК у фенотипических вариантов [8, 19, 20]. Таким образом, основная цель настоящего исследования заключалась в анализе геномных перестроек у спонтанных производных *A. brasilense* Sp7 и оценке устойчивости их биопленок к высушиванию, водному и окислительному стрессам.

Материалы и методы

Штаммы бактерий, питательные среды, определение скорости роста и подвижности бактерий

В работе использовали: штамм *A. brasilense* Sp7, выделенный в Бразилии из ризосферы росички лежачей [21], его производные Sp7.1–Sp7.9 [10–12] и штамм *A. brasilense* Cd, выделенный из корней свинорога пальчатого после инокуляции Sp7 [22]. Бактерии культивировали при 30°C на малатно-солевой среде (МСС) [23] с 1 г/л NH_4Cl . При необходимости в МСС добавляли 2 г/л агара. Для создания условий водного стресса в среды добавляли непроникающий осмотический агент полиэтиленгликоль (ПЭГ) со средней молекулярной массой 6000. ПЭГ 6000 вносили до концентрации 5%, 10% и 15%, что



соответствует -0.05 , -0.15 , -0.30 МПа [4]. Для определения скорости роста жидкие культуры инкубировали при 140 об/мин и температуре 30°C на шейкер-инкубаторе Excella E24 (New Brunswick Scientific). Для изучения подвижности бактерий при микроскопии 24-часовых планктонных культур проводили видеозапись, которую анализировали с помощью компьютерной программы, разработанной в ИБФРМ РАН. Фазово-контрастную и электронную микроскопию выполняли на микроскопах, находящихся в ЦКП «Симбиоз» ИБФРМ РАН (г. Саратов, Россия): Leica DM6000 B (Leica-Microsystems) и Libra 120 (Carl Zeiss).

Анализ формирования биопленок и их характеристика

24-часовые бактериальные культуры из жидкой МСС разводили средой МСС до $A_{590} = 0.05-0.10$ ($l = 0.5$ см). При необходимости в МСС вносили ПЭГ 6000. Среды с инокулятом вносили в ячейки полистирольных планшетов с 96 плоскодонными лунками (по 0.2 мл) или стеклянные пробирки (по 2 мл) и инкубировали при 30°C стационарно. В качестве контроля в ячейки планшетов или пробирки вносили стерильные среды. Для оценки относительного количества биомассы в зрелых биопленках проводили их окрашивание кристаллическим фиолетовым [24]. Связавшийся с биомассой биопленок краситель растворяли 0.2 или 2 мл этанола и измеряли оптическую плотность раствора на фотоколориметре КФК-2 (Загорский оптико-механический завод) или фотометре Multiskan Ascent (ThermoLabsystems). Уровень относительной респираторной активности клеток в биопленках определяли флуориметрическим резазурин-тестом с модификациями. Из лунок планшета с биопленками отбирали планктонную культуру и вносили по 0.2 мл раствора AlamarBlue (Sigma) в 50 мМ фосфатном буфере (ФБ) (рН 7.0) (0.01 г/л). Планшеты инкубировали 24 ч при 30°C . Интенсивность флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Agilent) при длине волны возбуждения 530 нм и длине волны эмиссии – 600 нм (ширина щели – 10 нм). Аналогичные манипуляции проводили с контрольными пробами.

Выделение компонентов матрикса проводили согласно рекомендациям, описанным в работе [16]. Биомассу зрелых биопленок, сформированных в стеклянных пробирках, смывали ФБ (рН 7.0). Из отмытой биомассы экстрагировали матрикс 0.5 М ЭДТА [16]. Содержание в экстрактах углеводсодержащих и белковых компонентов определяли фенол-серным методом и реакцией по Бредфорду соответственно [16]. Для определения численности жизнеспособных

форм в биопленках их промывали ФБ (рН 7.0). Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) определяли в нативных и сухих биопленках. В последнем случае биопленки сушили при 30°C и 7 дней хранили при 37°C [13]. Для определения КОЕ в пробирки с биопленками вносили по 2 мл ФБ (рН 7.0), инкубировали 1 ч, смывали биомассу и 1 мин диспергировали на встряхивателе Vortex [13]. Из полученной суспензии готовили серию десятикратных разведений и высевали из них по 100 мкл на плотную МСС. Результаты с учетом разведения пересчитывали на 2 мл, что соответствует смыву 1 биопленки. Для определения устойчивости к окислительному стрессу в пробирки с сухими биопленками вносили 2.5 мл раствора H_2O_2 в ФБ (рН 7.0). После 18 ч инкубации удаляли H_2O_2 и вносили 2.5 мл полужидкой среды МСС (0.3% агара) без азота. Через 24–48 ч инкубации фиксировали наличие роста под толщей агара. Отсутствие роста свидетельствует о гибели популяции [13].

Выделение и очистка ДНК, манипуляции с ней

Геномную ДНК выделяли из жидких бактериальных культур с использованием набора GeneJET Genomic DNA Purification Kit (ThermoScientific). Для амплификации ДНК использовали высокоточную ДНК полимеразу iProof High-Fidelity DNA Polymerase (Bio-Rad). ПЦР ставили в термоциклере T100 (BioRad). Продукты ПЦР визуализировали с помощью электрофореза в 2%-ном агарозном геле. В работе были использованы праймеры, соответствующие известным консервативным мотивам в повторяющихся последовательностях нуклеотидов бактерий: 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3' (BOX-ПЦР); 5'-GTTTCCGCC-3' (RAPD-ПЦР); 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3' и 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3' (ERIC-ПЦР). Реакции амплификации ставили как описано ранее [8, 19, 20].

Статистическая обработка результатов

Во всех случаях количественных измерений проводили не менее трех независимых экспериментов как минимум в трех повторностях. Оценку биомассы биопленок каждого штамма выполняли не менее шести раз. Результаты обрабатывали с использованием пакета Microsoft Office Excel 2010; доверительные интервалы определяли для 95% уровня значимости.

Результаты и их обсуждение

Анализ скорости роста, морфологии и подвижности бактерий

Сравнение роста штаммов Sp7, Sp7.1–Sp7.9 и Cd в жидких средах показало, что их планктонные культуры не отличались скоростью роста.



Клетки из этих культур несли полярный жгутик, при помощи которого в среднем $86.5 \pm 2.1\%$ бактерий плавали со скоростью $28-30$ мкм/с. В случае производного Sp7.4 длина клеток из 24-часовых планктонных культур (стационарная фаза роста) была больше, чем у Sp7 (соответственно штамму длина клеток составляла 3.6 ± 0.1 и 3.0 ± 0.1 мкм). В случае Sp7.4 увеличение длины клеток может быть следствием перестроек, затронувших участки генома, контролирующие размер клеток.

Размер клеток остальных штаммов и Sp7 не отличался. Полиморфизм размера бактерий типичен для клеток азоспирилл и зависит в том числе от условий культивирования бактерий [21, 22]. Таким образом, культуральные признаки бактерии из жидких планктонных культур штаммов Sp7, Sp7.1–Sp7.3 и Sp7.5–Sp7.9 существенно не различались. На плотной МСС исследованные штаммы формировали колонии с R- или S-фенотипом (табл. 1).

Таблица 1 / Table 1

Характеристика плазмидного состава, морфологии колоний и влияния ПЭГ 6000 на биопленки *A. brasilense*
Characterization of the plasmid composition, colony morphology and the effect of PEG 6000 on *A. brasilense* biofilms

Штам Strain	Плазмиды, МДа Plasmids, MDa	Колонии на плотной МСС Colonies on solid MSM	(а) / (a) A_{540} кристаллического фиолетового, десорбированного после окрашивания биопленок A_{540} of the crystal violet desorbed after biofilm staining				(б) / (b) Респираторная активность, уе. Respiratory activity, с.у.			
			ПЭГ 6000, % / PEG 6000, %							
			0	5	10	15	0	5	10	15
Sp7	90, 115, >300	R	0.5 ± 0.06 вБ	0.2 ± 0.08 абА	0.3 ± 0.07 бБ	0.1 ± 0.05 аА	85 ± 17 вА	100 ± 11 вБ	32 ± 8 бБ	11 ± 2 аБ
Sp7.1	124, >300	R	0.3 ± 0.08 вА	0.2 ± 0.06 бА	0.2 ± 0.07 абА	0.1 ± 0.06 аА	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
Sp7.2	131, >300	R	0.5 ± 0.06 вБ	0.2 ± 0.08 аб	0.3 ± 0.07 бБ	0.1 ± 0.05 аА	80 ± 14 вА	80 ± 19 вБ	36 ± 7 бБ	12 ± 1 аБ
Sp7.3	121, >300	R	0.5 ± 0.04 бБ	0.2 ± 0.07 аА	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
Sp7.4	131, >300	R	0.5 ± 0.06 вБ	0.3 ± 0.09 бА	0.1 ± 0.06 аА	0.1 ± 0.03 аА	70 ± 12 вА	19 ± 9 бА	6 ± 1 аА	6 ± 1 аА
Sp7.5	94, >300	RS	0.3 ± 0.06 бА	0.2 ± 0.04 аА	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
Sp7.6	90, >300	S	0.3 ± 0.07 аА	0.2 ± 0.05 аА	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
Sp7.7	107, >300	S	0.5 ± 0.05 бБ	0.2 ± 0.07 аА	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
Sp7.8	124, >300	S	0.6 ± 0.10 бБ	1.0 ± 0.15 вБ	0.6 ± 0.16 бБ	0.3 ± 0.09 аб	101 ± 18 бА	100 ± 13 бБ	90 ± 12 бБ	48 ± 10 аб
Sp7.9	94, >300	S	0.5 ± 0.04 бБ	0.3 ± 0.07 аА	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
Cd	90, >300	S	0.4 ± 0.06 бАБ	0.3 ± 0.06 абА	0.2 ± 0.05 аА	0.2 ± 0.05 аб	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.

Примечание. Относительное количество биомассы биопленок (а), сформированных за 7 суток, оценивали, измеряя A_{540} кристаллического фиолетового, десорбированного после ее окрашивания. Респираторную активность биомассы 7-дневных биопленок (б), сформированных без стресса, определяли после их культивирования в течение 10 суток с ПЭГ 6000. Результаты однофакторного дисперсионного (ANOVA) анализа представлены заглавными или строчными буквами; разными буквами обозначены статистически значимые различия между средними. В колонках (а) или (б) результаты сравнения в строке представлены строчными буквами, а в случае сравнения в столбце обозначены заглавными буквами. А или а – средние значения с наименьшей величиной. Н.о. – не определяли.



Исследование формирования биопленок и анализ их устойчивости к водному и окислительному стрессу

Анализ процесса формирования биопленок показал, что все исследованные штаммы на 7-е сутки культивирования завершали процесс формирования биопленок (количество биомассы, образующей пленку, стабилизировалось). Штаммы Sp7.1, Sp7.5 и Sp7.6 формировали менее выраженные пленки, чем родительский штамм (см. табл. 1). У производного Sp7.4 длина клеток в биопленках была больше, чем у штамма Sp7 (соответственно штамму длина составляла 5.0 ± 0.5 и 4.1 ± 0.2 мкм), также как и в случае размера бактерий из планктонных культур.

Для создания модели осмотического/водного стресса использовали непроникающий осмотический агент ПЭГ 6000. Присутствие ПЭГ приводит к снижению водного потенциала среды и блокированию поглощения воды бактериями или корнями растений [4, 25]. Такой подход позволяет обеспечить стабильное снижение уровня водного потенциала в течение любых желаемых периодов времени и моделировать влияние условий засухи на бактериальную популяцию и растения [4, 25]. Концентрации 10–15% ПЭГ блокировали подвижность планктонных клеток всех исследованных штаммов. Под МСС, содержащей 15% ПЭГ, штаммы Sp7, Sp7.1, Sp7.4 и Cd формировали биопленки с минимальным количеством биомассы. В случае Sp7.8 под средой с 5% ПЭГ биопленки этого штамма содержали даже больше биомассы, чем в контроле без стресса. Вариант Sp7.8, формируя биопленки в присутствии ПЭГ (5–15%), накапливал больше биомассы, чем штаммы Sp7, Sp7.1, Sp7.3, Sp7.4 и Cd (см. табл. 1, а).

В другой серии экспериментов на примере Sp7, Sp7.4, Sp7.8 было исследовано влияние ПЭГ на уже сформированные (после 7 суток культивирования) биопленки. Биопленки 10 дней инкубировали со средой, содержащей ПЭГ. Затем измеряли респираторную активность биомассы пленок. В биопленках Sp7 снижение респираторной активности более чем на 70% по сравнению с контролем (без стресса) происходило при

концентрации ПЭГ 15% (см. табл. 1). В случае Sp7.4 значительное снижение уровня респираторной активности происходило в присутствии 5% ПЭГ. Уровень метаболической активности в пленках Sp7.8, сформированных без стресса или в присутствии 10–15% ПЭГ, превосходил аналогичные показатели у родительского штамма или варианта Sp7.4 (см. табл. 1, б).

Частью системы механизмов, способствующих выживанию микробной популяции в условиях засухи/водного стресса, являются бактериальные формы, устойчивые к высушиванию [13, 26]. В нашем исследовании для характеристики таких клеточных форм биопленки (содержали 10^{10} КОЕ) были высушены при 30°C и заложены на хранение при 37°C . Через 10 суток хранения максимальная численность 10^4 КОЕ/биопленка сохранялась в пленках Sp7.8. В аналогичных условиях биопленки Sp7, Sp7.4 и Cd содержали 10^1 КОЕ (табл. 2). Покоящиеся формы Sp7, Sp7.8 и Cd в сухих биопленках сохраняли жизнеспособность после инкубации с 0.01% H_2O_2 , а МИК для них составляла 0.1% H_2O_2 (см. табл. 2). Для покоящихся форм Sp7.4 МИК составляла 0.01% H_2O_2 (см. табл. 2). Покоящиеся формы также являются частью механизмов, способствующих выживанию биопленочной популяции азоспирилл в условиях окислительного стресса, обусловленного H_2O_2 [13]. По сравнению с Sp7, Sp7.8 и Cd покоящиеся формы Sp7.4 оказались более чувствительными к негативному воздействию H_2O_2 , что может являться следствием особенностей адаптации к данному фактору стресса этого штамма. Например, покоящиеся формы, как и биопленки эндофитного штамма *A. baldanioru* Sp245, способного проникать внутрь корней и заселять межклетники проводящей системы, оказались более чувствительными к негативному воздействию H_2O_2 [13, 27]. Ткани корневой системы пшеницы обладают активной системой, регулирующей уровень H_2O_2 [28].

Определенный вклад в устойчивость азоспирилл к водному и окислительному стрессу могут вносить углеводсодержащие составляющие матрикса [5, 13, 17]. Оценка соотношения

Note to table 1. The relative amount of biomass of the biofilms formed over 7 days (a) was estimated by measuring the A_{540} of the crystal violet desorbed after its staining. The respiratory activity of the biomass of 7-day biofilms formed without stress (b) was determined after their cultivation during 10 days with PEG 6000. One-way analysis of variance (ANOVA) results are presented in uppercase or lowercase letters; different letters indicate statistically significant differences between means. In columns (a) or (b), the comparison results in a row are shown in lowercase letters, and in the case of a comparison in a column, they are indicated in capital letters. A or a – average values with the smallest value. N.d. – did not determine.



Таблица 2 / Table 2

Устойчивость к окислительному стрессу (e) покоящихся форм из сухих биопленок (e) *A. brasilense*, сформированных под жидкой МСС

Resistance to oxidative stress (d) of resting forms from dry biofilms (c) *A. brasilense* formed under liquid MSM

Штамм Strain	(a) / (a) <i>A</i> ₅₄₀ кристаллического фиолетового, десорбированного после окрашивания биопленок <i>A</i> ₅₄₀ of the crystal violet desorbed after biofilm staining	*КОЕ из биопленок *CFU from biofilms		(e) / (d) **Наличие бактериального роста под толщиной полужидкой среды после инкубации в растворе H ₂ O ₂ сухих биопленок ** The presence of bacterial growth under the thickness of a semi-liquid medium after incubation of dry biofilms in an H ₂ O ₂ solution		
		(б) / (b) нативные/native	(e) / (c) сухие/dry	H ₂ O ₂ , %		
				0.001	0.01	0.1
Sp7	0.79 ± 0.09	(1.3 ± 0.2) × 10 ¹⁰	(2.5 ± 0.6) × 10 ¹	(+)	(+)	(-)
Sp7.4	0.75 ± 0.10	(1.0 ± 0.2) × 10 ¹⁰	(2.3 ± 0.7) × 10 ¹	(+)	(-)	(-)
Sp7.8	1.05 ± 0.09	(2.4 ± 0.4) × 10 ¹⁰	(1.8 ± 0.3) × 10 ⁴	(+)	(+)	(-)
Cd	0.96 ± 0.09	(2.7 ± 0.3) × 10 ¹⁰	(5.3 ± 0.9) × 10 ¹	(+)	(+)	(-)

Примечание. * – биомассу биопленки смывали 50 мМ ФБ (рН 7.0) объемом 2 мл, в полученной суспензии определяли КОЕ; ** – сухие биопленки после 7 суток хранения инкубировали 48 ч в МСС с 0.3% агара без источника связанного азота, результаты воспроизведены в 3 независимых экспериментах.

Note. * – the biomass of the biofilm was washed off with 2 ml of 50 mM PB (pH 7.0), CFU was determined in the resulting suspension; ** – dry biofilms were incubated for 48 h in MSM with 0.3% agar without a source of bound nitrogen after 7 days of storage, the results are reproduced in 3 independent experiments.

углеводсодержащих и белковых компонентов в матриксе, полученном из смывой с поверхности стекла биомассы биопленок Sp7, Sp7.8 и Cd, показала, что углеводные составляющие доминируют над белковыми (рис. 1). Также необходимо отметить, что из биопленок Sp7.4 экстрагировалось меньше углеводных и белковых составляющих по сравнению с Sp7, Sp7.8 и Cd (см. рис. 1) Бактерии из биопленок Sp7.4 оказались наиболее чувствительными к исследованным стрессам.

Анализ геномных перестроек

С целью выявления изменений в структуре ДНК спонтанных фенотипических вариантов *A. brasilense* были использованы праймеры, соответствующие известным консервативным мотивам в повторяющихся последовательностях нуклеотидов бактерий, для BOX-, ERIC- и RAPD-PCR [8, 19, 20]. Так, в результате BOX-PCR обнаружены различия с родительским штаммом у Sp7.1 и Sp7.4 (см. рис. 1, a); в ERIC-PCR выявлены отличия от Sp7 у Sp7.1, Sp7.3, Sp7.4, Sp7.8 и Sp7.9 (см. рис. 1, б); в RAPD-PCR установлены отличия у Sp7.1, Sp7.2, Sp7.3, Sp7.4, Sp7.7, Sp7.8 и Sp7.9 (см. рис. 1, в). Результаты анализа BOX-, ERIC- и RAPD-PCR свидетельствуют о том, что спонтанные производные отличаются не только от родительского штамма, но и между собой,

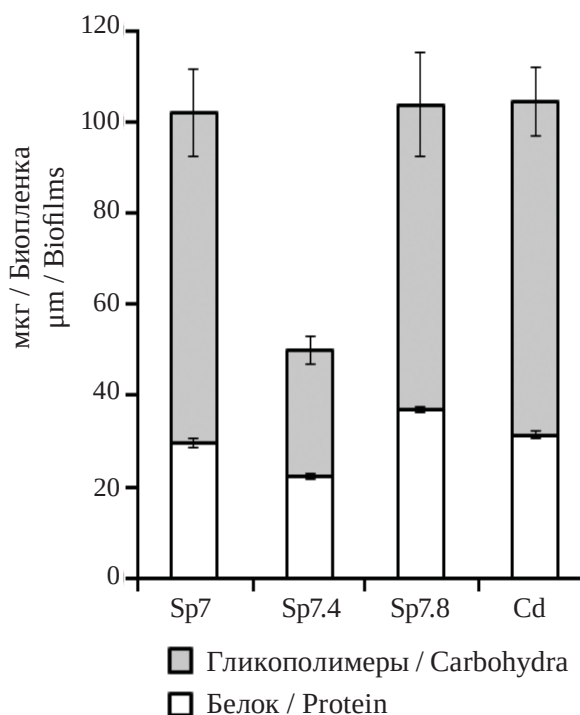


Рис. 1. Содержание гликополимеров и белка в матриксе биопленок *A. brasilense*, сформированных на стекле под жидкой МСС

Fig. 1. Contents of glycopolymers and protein in the matrix of *A. brasilense* biofilms formed on glass under liquid MSM



даже если плазмидные профили у каких-то вариантов похожи (например, Sp7.1 и Sp7.8 или Sp7.2 и Sp7.4 (рис. 2, см. табл. 1). Так, устойчивость к водному стрессу биопленочной популяции производного Sp7.8 выше не только по сравнению с родительским штаммом, но в случае сравнения этого признака с Sp7.1, имеющего сходный «плазмидный профиль» с Sp7.8 (см. рис. 1, табл. 1). Производные Sp7.2 и Sp7.4 имеют похо-

жий плазмидный состав, однако размер клеток Sp7.4 заметно больше бактерий производного Sp7.2, клетки которого не отличаются по длине от Sp7. Таким образом, использование BOX-, ERIC- и RAPD-PCR позволило нам выявить у исследуемых фенотипических вариантов различия в изменениях в структуре геномной ДНК, обуславливающие разницу в фенотипе производных Sp7 со сходным «плазмидным профилем».

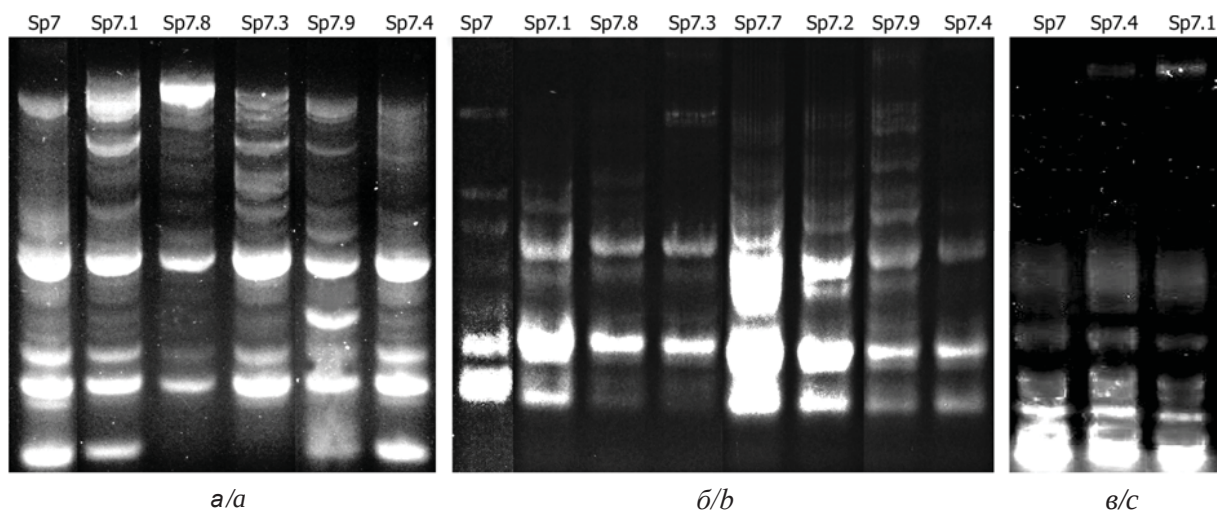


Рис. 2. Результаты электрофореза в 2%-ном агарозном геле продуктов ERIC-ПЦР (а), RAPD-ПЦР (б) и BOX-ПЦР (в) totalной ДНК *A. brasilense*

Fig. 2. The results of electrophoresis in 2% agarose gel of ERIC-PCR (a), RAPD-PCR (b), and BOX-PCR (c) products of *A. brasilense* total DNA

Заключение

Штамм *A. brasilense* Sp7 используют в качестве модели в исследованиях, направленных на подбор ризосферных бактерий, способных повышать устойчивость злаковых культур к негативному влиянию различных видов стресса [8, 13, 29]. В данной работе мы дополнительно изучили генетические, морфологические и физиологические аспекты фенотипической изменчивости у этого штамма. Фенотипические варианты Sp7.1–Sp7.9 оказались стабильными, поскольку после длительного хранения в ходе исследования мы не наблюдали у них реверсию к фенотипу родительского штамма. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что фенотипические варианты штамма Sp7 поразному формируют биопленки в условиях водного стресса. Варианты Sp7.4 и Sp7.8 интересны для дальнейших исследований, направленных на изучение признаков, которые способствуют выживанию бактерий, стимулирующих рост растений, в неблагоприятных условиях при хранении, инокуляции и колонизации ими расте-

ний и семян, что имеет большое экономическое значение при разработке аграрных технологий с использованием микроорганизмов [1].

Список литературы

1. Fibach-Paldi S., Burdman S., Okon Y. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promoting abilities of *Azospirillum brasilense* // FEMS Microbiol. Lett. 2012. Vol. 326. P. 99–108. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02407.x>
2. Fukami J., Cerezini P., Hungria M. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation // AMB Expr. 2018. Vol. 8. P. 73–85. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0608-1>
3. Lipa P., Janczarek M. Phosphorylation systems in symbiotic nitrogen-fixing bacteria and their role in bacterial adaptation to various environmental stresses // PeerJ. 2020. Feb11 : 8 : e8466. <https://doi.org/10.7717/peerj.8466>
4. Ansari F. A., Jabeen M., Ahmad I. *Pseudomonas azotiformans* FAP5, a novel biofilm-forming PGPR strain, alleviates drought stress in wheat plant // Int. J. Environ. Sci. Technol. 2021. Vol. 18. P. 3855–3870. <https://doi.org/10.1007/s13762-020-03045-9>



5. Vurukonda S. S. K. P., Sandhya V., Shrivastava M., Ali S. K. Z. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria // *Microbiol. Res.* 2016. Vol. 184. P. 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.12.003>
6. Hsiao T. C. Plant responses to water stress // *Ann. Rev. Plant Physiol.* 1973. Vol. 24. P. 519–570. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.24.060173.002511>
7. Bogino P. C., Oliva M. M., Sorroche F. G., Giordano W. The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. Vol. 14. P. 15838–15859. <https://doi.org/10.3390/ijms140815838>
8. Lerner A., Valverde A., Castro-Sowinski S., Lerner H., Okon Y., Burdman S. Phenotypic variation in *Azospirillum brasilense* exposed to starvation // *Environ. Microbiol. Rep.* 2010. Vol. 2. P. 577–586. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00149.x>
9. Volfson V., Fibach-Paldi Sh., Paulucci N. S., Dardanelli M., Matan O., Burdman S., Okon Y. Phenotypic variation in *Azospirillum brasilense* Sp7 does not influence plant growth promotion effects // *Soil Biology and Biochemistry.* 2013. Vol. 67. P. 255–262. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.09.008>
10. Petrova L. P., Borisov I. V., Katsy E. I. Plasmid rearrangements in *Azospirillum brasilense* // *Microbiology (Moscow).* 2005. Vol. 74, № 4. P. 495–497. <https://doi.org/10.1007/s1102100500948>
11. Petrova L. P., Shelud'ko A. V., Katsy E. I. Plasmid rearrangements and alterations in *Azospirillum brasilense* biofilm formation // *Microbiology (Moscow).* 2010. Vol. 79, № 1. P. 121–124. <https://doi.org/10.1134/S00226261710010169>
12. Katsy E. I., Petrova L. P. Genome rearrangements in *Azospirillum brasilense* Sp7 with the involvement of the plasmid pRhico and the prophage ΦAb-Cd // *Russ. J. Genet.* 2015. Vol. 51, № 132. P. 1165–117. <https://doi.org/10.1134/S1022795415110095>
13. Shelud'ko A. V., Mokeev D. I., Evstigneeva S. S., Filip'echeva Yu. A., Burov A. M., Petrova L. P., Ponomareva E. G., Katsy E. I. Cell ultrastructure in biofilms of *Azospirillum brasilense* // *Microbiology.* 2020. Vol. 89, № 1. P. 50–63. <https://doi.org/10.1134/S0026261720010142>
14. Flemming H.-C., Wingender J. The biofilm matrix // *Nat. Rev. Microbiol.* 2010. Vol. 8, № 9. P. 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
15. Ramírez-Mata A., López-Lara L. I., Xiqui-Vázquez L., Jijón-Moreno S., Romero-Osorio A., Baca B. E. The cyclic-di-GMP diguanylate cyclase CdgA has a role in biofilm formation and exopolysaccharide production in *Azospirillum brasilense* // *Res. Microbiol.* 2016. Vol. 167. P. 190–201. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.12.004>
16. Wang D., Xu A., Elmerich C., Ma L. Z. Biofilm formation enables free-living nitrogen-fixing rhizobacteria to fix nitrogen under aerobic conditions // *ISME J.* 2017. Vol. 11. P. 1602–1613. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.30>
17. Shelud'ko A. V., Filip'echeva Yu. A., Telesheva E. M., Burov A. M., Evstigneeva S. S., Burygin G. L., Petrova L. P. Characterization of carbohydrate-containing components of *Azospirillum brasilense* Sp245 biofilms // *Microbiology.* 2018. Vol. 87, № 5. P. 610–620. <https://doi.org/10.1134/S0026261718050156>
18. Wisniewski-Dyé F., Vial L. Phase and antigenic variation mediated by genome modifications // *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol.* 2008. Vol. 94. P. 493–515. <https://doi.org/10.1007/s10482-008-9267-6>
19. Versalovic J., Koeuth T., Lupski R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes // *Nucleic Acids Res.* 1991. Vol. 19, № 24. P. 6823–6831. <https://doi.org/10.1093/nar/19.24.6823>
20. Fancelli S., Castaldini M., Ceccherini M. T., Di Serio C., Fani R., Gallori E., Marangolo M., Miclaus N., Bazzicalupo M. Use of random amplified polymorphic DNA markers for the detection of *Azospirillum* strains in soil microcosms // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1998. Vol. 49, № 2. P. 221–225. <https://doi.org/10.1007/s002530051162>
21. Tarrand J. J., Krieg N. R., Döbereiner J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum braslense* sp. nov. // *Can. J. Microbiol.* 1978. Vol. 24, № 8. P. 967–980. <https://doi.org/10.1139/m78-160>
22. Eskew D. L., Focht D. D., Ting L. P. Nitrogen fixation, denitrification and pleomorphic growth in a highly pigmented *Spirillum lipoferum* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1977. Vol. 34. P. 582–585. <https://doi.org/10.1128/aem.34.5.582-585.1977>
23. Döbereiner J., Day J. M. Associative symbiosis in tropical grass: Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites // *Symposium on Nitrogen Fixation* / eds. W. E. Newton, C. J. Nijmans. Pullman : Washington State University Press, 1976. P. 518–538.
24. O'Toole G. A., Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: A genetic analysis // *Mol. Microbiol.* 1998. Vol. 28, № 3. P. 449–461. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x>
25. Chutia J., Borah S. P. Water stress effects on leaf growth and chlorophyll content but not the grain yield in traditional rice (*Oryza sativa* Linn.) genotypes of Assam, India: II. Protein and proline status in seedlings under PEG induced water stress // *Am. J. Plant Sci.* 2012. Vol. 3. P. 971–980. <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2012.37115>
26. Malinich E. A., Bauer C. E. The plant growth promoting bacterium *Azospirillum brasilense* is vertically transmitted in *Phaseolus vulgaris* (common bean) // *Symbiosis.* 2018. Vol. 76, № 2. P. 97–108. <https://doi.org/10.1007/s13199-018-0539-2>
27. Schloter M., Hartmann A. Endophytic and surface colonization of wheat roots (*Triticum aestivum*) by different *Azospirillum brasilense* strains studied with strain-specific monoclonal antibodies // *Symbiosis.* 1998. Vol. 25. P. 159–179.



28. Pradedova E. V., Isheeva O. D., Salyaev R. K. Classification of the antioxidant defense system as the ground for reasonable organization of experimental studies of the oxidative stress in plants // *Russ. J. Plant. Physiol.* 2011. Vol. 58. P. 210–217. <https://doi.org/10.1134/S1021443711020166>
29. Notununu I., Moleleki L., Roopnarain A., Adeleke R. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on the molecular responses of maize under drought and heat stresses: A review // *Pedosphere.* 2022. Vol. 32. P. 90–106. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(21\)60051-6](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(21)60051-6)
10. Petrova L. P., Borisov I. V., Katsy E. I. Plasmid rearrangements in *Azospirillum brasilense*. *Microbiology (Moscow)*, 2005, vol. 74, no. 4, pp. 495–497. <https://doi.org/10.1007/s1102100500948>
11. Petrova L. P., Shelud'ko A. V., Katsy E. I. Plasmid rearrangements and alterations in *Azospirillum brasilense* biofilm formation. *Microbiology (Moscow)*, 2010, vol. 79, no. 1, pp. 121–124. <https://doi.org/10.1134/S00226261710010169>
12. Katsy E. I., Petrova L. P. Genome rearrangements in *Azospirillum brasilense* Sp7 with the involvement of the plasmid pRhico and the prophage ΦAb-Cd. *Russ. J. Genet.*, 2015, vol. 51, no. 112, pp. 1165–117. <https://doi.org/10.1134/S1022795415110095>
13. Shelud'ko A. V., Mokeev D. I., Evstigneeva S. S., Filip'echeva Yu. A., Burov A. M., Petrova L. P., Ponomareva E. G., Katsy E. I. Cell ultrastructure in biofilms of *Azospirillum brasilense*. *Microbiology*, 2020, vol. 89, no. 1, pp. 50–63. <https://doi.org/10.1134/S0026261720010142>
14. Flemming H.-C., Wingender J. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2010, vol. 8, no. 9, pp. 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
15. Ramírez-Mata A., López-Lara L. I., Xiqui-Vázquez L., Jijón-Moreno S., Romero-Osorio A., Baca B. E. The cyclic-di-GMP diguanylate cyclase CdgA has a role in biofilm formation and exopolysaccharide production in *Azospirillum brasilense*. *Res. Microbiol.*, 2016, vol. 167, pp. 190–201. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.12.004>
16. Wang D., Xu A., Elmerich C., Ma L. Z. Biofilm formation enables free-living nitrogen-fixing rhizobacteria to fix nitrogen under aerobic conditions. *ISME J.*, 2017, vol. 11, pp. 1602–1613. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.30>
17. Shelud'ko A. V., Filip'echeva Yu. A., Telesheva E. M., Burov A. M., Evstigneeva S. S., Burygin G. L., Petrova L. P. Characterization of carbohydrate-containing components of *Azospirillum brasilense* Sp245 biofilms. *Microbiology*, 2018, vol. 87, no. 5, pp. 610–620. <https://doi.org/10.1134/S0026261718050156>
18. Wisniewski-Dyé F., Vial L. Phase and antigenic variation mediated by genome modifications. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol.*, 2008, vol. 94, pp. 493–515. <https://doi.org/10.1007/s10482-008-9267-6>
19. Versalovic J., Koeuth T., Lupski R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.*, 1991, vol. 19, no. 24, pp. 6823–6831. <https://doi.org/10.1093/nar/19.24.6823>
20. Fancelli S., Castaldini M., Ceccherini M. T., Di Serio C., Fani R., Gallori E., Marangolo M., Miclaus N., Bazzicalupo M. Use of random amplified polymorphic DNA markers for the detection of *Azospirillum* strains in soil microcosms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1998, vol. 49, no. 2, pp. 221–225. <https://doi.org/10.1007/s002530051162>
21. Tarrand J. J., Krieg N. R., Döbereiner J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two spe-
1. Fibach-Paldi S., Burdman S., Okon Y. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promoting abilities of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2012, vol. 326, pp. 99–108. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02407.x>
2. Fukami J., Cerezini P., Hungria M. *Azospirillum*: Benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. *AMB Expr.*, 2018, vol. 8, pp. 73–85. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0608-1>
3. Lipa P., Janczarek M. Phosphorylation systems in symbiotic nitrogen-fixing bacteria and their role in bacterial adaptation to various environmental stresses. *PeerJ.*, 2020, Feb 11 : 8 : e8466. <https://doi.org/10.7717/peerj.8466>
4. Ansari F. A., Jabeen M., Ahmad I. *Pseudomonas azotoformans* FAP5, a novel biofilm-forming PGPR strain, alleviates drought stress in wheat plant. *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, 2021, vol. 18, pp. 3855–3870. <https://doi.org/10.1007/s13762-020-03045-9>
5. Vurukonda S. S. K. P., Sandhya V., Shrivastava M., Ali S. K. Z. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiol. Res.*, 2016, vol. 184, pp. 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.12.003>
6. Hsiao T. C. Plant responses to water stress. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 1973, vol. 24, pp. 519–570. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.24.060173.002511>
7. Bogino P. C., Oliva M. M., Sorroche F. G., Giordano W. The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, vol. 14, pp. 15838–15859. <https://doi.org/10.3390/ijms140815838>
8. Lerner A., Valverde A., Castro-Sowinski S., Lerner H., Okon Y., Burdman S. Phenotypic variation in *Azospirillum brasilense* exposed to starvation. *Environ. Microbiol. Rep.*, 2010, vol. 2, pp. 577–586. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00149.x>
9. Volfson V., Fibach-Paldi Sh., Paulucci N. S., Dardanelli M., Matan O., Burdman S., Okon Y. Phenotypic variation in *Azospirillum brasilense* Sp7 does not influence plant growth promotion effects. *Soil Biology and Biochemistry*, 2013, vol. 67, pp. 255–262. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.09.008>



- cies, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can. J. Microbiol.*, 1978, vol. 24, no. 8, pp. 967–980. <https://doi.org/10.1139/m78-160>
22. Eskew D. L., Focht D. D., Ting L. P. Nitrogen fixation, denitrification and pleomorphic growth in a highly pigmented *Spirillum lipoferum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1977, vol. 34, pp. 582–585. <https://doi.org/10.1128/aem.34.5.582-585.1977>
23. Döbereiner J., Day J. M. Associative symbiosis in tropical grass: Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. In: Newton W. E., Nijmans C. J., eds. *Symposium on Nitrogen Fixation*. Pullman, Washington State University Press, 1976, pp. 518–538.
24. O'Toole G. A., Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.*, 1998, vol. 28, no. 3, pp. 449–461. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x>
25. Chutia J., Borah S. P. Water stress effects on leaf growth and chlorophyll content but not the grain yield in traditional rice (*Oryza sativa* Linn.) genotypes of Assam, India: II. Protein and proline status in seedlings under PEG induced water stress. *Am. J. Plant Sci.*, 2012, vol. 3, pp. 971–980. <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2012.37115>
26. Malinich E. A., Bauer C. E. The plant growth promoting bacterium *Azospirillum brasilense* is vertically transmitted in *Phaseolus vulgaris* (common bean). *Symbiosis*, 2018, vol. 76, no. 2, pp. 97–108. <https://doi.org/10.1007/s13199-018-0539-2>
27. Schloter M., Hartmann A. Endophytic and surface colonization of wheat roots (*Triticum aestivum*) by different *Azospirillum brasilense* strains studied with strain-specific monoclonal antibodies. *Symbiosis*, 1998, vol. 25, pp. 159–179.
28. Pradedova E. V., Isheeva O. D., Salyaev R. K. Classification of the antioxidant defense system as the ground for reasonable organization of experimental studies of the oxidative stress in plants. *Russ. J. Plant. Physiol.*, 2011, vol. 58, pp. 210–217. <https://doi.org/10.1134/S1021443711020166>
29. Notununu I., Moleleki L., Roopnarain A., Adeleke R. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on the molecular responses of maize under drought and heat stresses: A review. *Pedosphere*, 2022, vol. 32, pp. 90–106. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(21\)60051-6](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(21)60051-6)

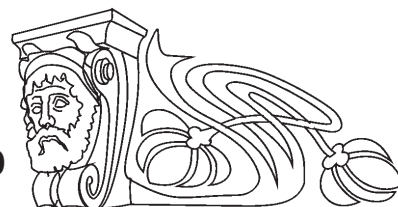
Поступила в редакцию 01.06.2023; одобрена после рецензирования 21.06.2023; принята к публикации 01.07.2023
The article was submitted 01.06.2023; approved after reviewing 21.06.2023; accepted for publication 01.07.2023



Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 4. С. 437–446
Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology, 2023, vol. 23, iss. 4, pp. 437–446
<https://ichbe.sgu.ru> <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-4-437-446>, EDN: PYHRCY

Научная статья
УДК 616.98:579.842.23

Молекулярно-генетический анализ штаммов *Yersinia pestis*, выделенных в различные эпизоотические периоды на территории Урало-Эмбенского пустынного природного очага чумы в XX веке



А. В. Коврижников , А. Н. Балыкова, Л. М. Куклева, Е. А. Нарышкина,
А. В. Федоров, Н. С. Червякова, Г. А. Ерошенко, В. В. Кутырев

ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Россия, 410005, г. Саратов, ул. Университетская, д. 46

Коврижников Александр Викторович, лаборант-исследователь лаборатории молекулярной микробиологии, alexander.kovrizhnikov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-7752-6321>

Балыкова Алина Николаевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии, alinabalnik@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-3766-7979>

Куклева Любовь Михайловна, кандидат биологических наук, старший сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии, rusrapi@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2438-8364>

Нарышкина Екатерина Александровна, научный сотрудник лаборатории геномного и протеомного анализа, rusrapi@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9190-099X>

Федоров Андрей Витальевич, младший научный сотрудник лаборатории геномного и протеомного анализа, rusrapi@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7190-4427>

Червякова Надежда Сергеевна, кандидат биологических наук, старший сотрудник отдела «Государственная коллекция патогенных бактерий», rusrapi@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3133-3820>

Ерошенко Галина Александровна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии, rusrapi@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5403-989X>

Кутырев Владимир Викторович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, директор, rusrapi@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3788-3452>

Аннотация. Проведен молекулярно-генетический анализ штаммов *Yersinia pestis*, выделенных в различные эпизоотические периоды на территории Урало-Эмбенского пустынного природного очага чумы в XX в. В работе изучено 24 штамма *Y. pestis*, выделенных на территории данного очага с 1945–1991 гг., а также 21 штамм *Y. pestis* с сопредельных территорий. Все исследованные штаммы из Урало-Эмбенского природного очага чумы относились к высоковирулентному и эпидемически значимому средневековому биовару основного подвида *Y. pestis*. По результатам WG-SNP-анализа и последующей филогенетической реконструкции на основе 1353 SNPs методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood, модель GTR) выявлено 6 ключевых филопопуляций, в которые вошли штаммы, изолированные в различные периоды эпидемической и эпизоотической активности на исследуемой территории. Установлено, что на территории Урало-Эмбенского природного очага происходило три волны распространения ветви 2.MED1 средневекового биовара: 1) штаммы, выделенные до 1945 г., которые относились к первой волне распространения ветви 2.MED1 на территорию очагов Северного Прикаспия; 2) штаммы, периода 1968–1974 гг., которые имеют близкое генетическое родство со штаммами из Мангышлакского (1978 г.) и Устюртского пустынных очагов чумы (1962 и 1975 гг.); 3) штаммы, которые начали выделяться после 1966 г. и были генетическими потомками волны распространения ветви 2.MED1 из очагов Северного Приаралья (1945 г.) после межэпизоотического периода. Полученные данные будут использованы для молекулярно-генетической детализации паспортизации очагов, в которых циркулирует этот высоковирулентный средневековый биовар *Y. pestis*. Они важны для определения закономерностей пространственно-временного распространения высоковирулентных штаммов линии 2.MED1 средневекового биовара в XX в. и для долгосрочного прогнозирования эпизоотической активности очагов чумы Северо-Восточного Прикаспия в текущем XXI в.

Ключевые слова: чума, *Yersinia pestis*, SNPs, филогения, природные очаги


Для цитирования: Коврижников А. В., Балыкова А. Н., Куклева Л. М., Нарышкина Е. А., Федоров А. В., Червякова Н. С., Ерошенко Г. А., Кутырев В. В. Молекулярно-генетический анализ штаммов *Yersinia pestis*, выделенных в различные эпизоотические периоды на территории Урало-Эмбенского пустынного природного очага чумы в XX веке // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 4. С. 437–446. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-4-437-446>, EDN: PYHRCY

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



Article

Molecular genetic analysis of *Yersinia pestis* strains isolated in different epizootic periods on the territory of the Ural-Embensky desert natural plague focus area in the twentieth century

A. V. Kovrizhnikov , A. N. Balykova, L. M. Kukleva, E. A. Naryshkina, A. V. Fedorov, N. S. Chervyakova, G. A. Eroshenko, V. V. Kutyrev

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", 46 Universitetskaya St., Saratov 410005, Russia

Aleksandr V. Kovrizhnikov, alexander.kovrizhnikov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-7752-6321>

Alina N. Balykova, <https://orcid.org/0000-0003-3766-7979>

Lyubov M. Kukleva, <https://orcid.org/0000-0003-2438-8364>

Naryshkina A. Ekaterina, <https://orcid.org/0000-0002-9190-099X>

Andrey V. Fedorov, <https://orcid.org/0000-0001-7190-4427>

Nadezhda S. Chervyakova, <https://orcid.org/0000-0003-3133-3820>

Galina A. Eroshenko, <https://orcid.org/0000-0001-5403-989X>

Vladimir V. Kutyrev, <https://orcid.org/0000-0003-3788-3452>

Abstract. We performed a molecular genetic analysis of *Yersinia pestis* strains isolated in the Ural-Embensky desert natural plague focus area in the twentieth century. We studied 24 strains of *Y. pestis* isolated on this territory since 1945 to 1991, as well as 21 strains of *Y. pestis* from adjacent territories. All of the strains studied from the Ural-Embensky natural focus of plague belonged to the highly virulent and epidemically significant medieval biovar of the main subspecies *Y. pestis*. According to the results of the WG-SNP analysis and subsequent phylogenetic reconstruction based on 1353 SNPs, the maximum likelihood method (Maximum Likelihood, GTR model) revealed 6 key phylopopulations, which included strains isolated during different periods of epidemic and epizootic activity in the study area. It has been established that there were three waves of spread of the 2.MED1 branch of the medieval biovar to the territory of Ural-Embensky desert natural plague focus. Strains isolated before 1945 belong to the first wave of spread of the 2.MED1 branch to the territory of the Northern Caspian Region. The second wave is considered to be the 1968–1974 strains. They have close genetic similarities with strains from the Mangyshlak (1978) and Ustyurt desert plague foci (1962 and 1975). The third wave includes strains isolated after 1966. They are genetically close to the strains from the North Aral foci (1945). The data obtained will be used for molecular-genetic detailing of the certification of foci in which this highly virulent medieval *Y. pestis* biovar circulates. They are important for determining the patterns of spatiotemporal distribution of highly virulent strains of the 2.MED1 branch of the medieval biovar in the 20th century and for long-term forecasting of the epizootic activity of plague foci in the North-Eastern Caspian region in the current 21st century.

Keywords: plague, *Yersinia pestis*, SNPs, phylogeny, natural foci

For citation: Kovrizhnikov A. V., Balykova A. N., Kukleva L. M., Naryshkina E. A., Fedorov A. V., Chervyakova N. S., Eroshenko G. A., Kutyrev V. V. Molecular genetic analysis of *Yersinia pestis* strains isolated in different epizootic periods on the territory of the Ural-Embensky desert natural plague focus area in the twentieth century. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2023, vol. 23, iss. 4, pp. 437–446 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-4-437-446>, EDN: PYHRCY

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

Введение

Урало-Эмбенский пустынный природный очаг чумы (УЭППО) (№18) расположен на территории Атырауской и Западно-Казахстанской областей Казахстана в пределах Северо-Восточного Прикаспия и занимает 57700 кв. км [1]. Значительная часть УЭППО находится на Прикаспийской низменности и входит в состав Среднеазиатского пустынного природного очага чумы. Впервые эпизоотии чумы на данной территории были зарегистрированы в 1951 г., повышенная эпизоотическая активность отмечалась в 1970–1973, 1975, 1978–1979, 1982, 1984–1987, 1989–1990 гг. [2]. В соответствии с отмечаемой ранее тенденцией развития межэпизоотических периодов в пустынных очагах чумы России и Казахстана, с 1995 г. эпизоотическая активность в УЭППО значительно снизилась. Очаг разделен

на 8 ландшафтно-экологических районов (ЛЭР), индекс эпизоотической активности которых варьирует от 0,34 до 0,86 [3]. На территории Атырауской области заболеваемость чумой человека регистрировалась в 1955 г. (летальный случай, бубонная форма), в 1958 г. (4 случая бубонной формы), в 1961 г. (летальный случай, септическая форма), в 1968 г. (1 случай бубонной формы). С 1964 г. проводится истребление песчанок и уничтожение их блох, что способствует снижению эпизоотической активности очага. В современных границах очага последняя эпизоотия отмечалась в 2002 г. [4].

Основным носителем в очаге является большая песчанка (*Rhombomys opimus*), которая в середине прошлого века начала активно расширять свой ареал обитания на север, за счет чего произошло расширение границ УЭППО.



Кроме большой песчанки, носителями также являются малый суслик (*Spermophilus pygmaeus*), полуденная песчанка (*Meriones meridianus*) и еще более 20 видов мелких млекопитающих [3, 4]. В качестве основного переносчика выступает паразит большой песчанки – блоха *Xenopsylla skrjabini*. Кроме *X. skrjabini* переносчиками являются также *Nosopsyllus laeviceps*, *Coptopsylla lamellifer* и еще более 10 видов блох. Таким образом, УЭППО характеризуется как полигостальностью, так и поливекторностью. Особенностью Урало-Эмбенского пустынного очага чумы является повышение эпизоотической активности в летний период, в отличие от других очагов песчаночьевого типа, с преимущественным повышением эпизоотической активности в весенний и осенний периоды [4].

По данным молекулярно-генетического и биохимического анализов, на территории УЭППО циркулируют высоковирулентные лейциннезависимые штаммы, относящиеся к средневековому биовару филогенетической ветви 2.MED1. Несмотря на имеющиеся данные по фенотипическим и молекулярно-генетическим характеристикам возбудителя чумы из очагов Северного и Восточного Прикаспия, малоизученными остаются особенности организации генома средневекового биовара разных периодов активности УЭППО, отсутствуют данные о причинах активизации этого очага после межэпизоотического периода середины XX в. [5]. Также не проводилась филогенетическая реконструкция штаммов *Yersinia pestis* в целях определения генетического родства с популяциями *Y. pestis* из сопредельных очагов чумы, что важно для выяснения пространственно-временных закономерностей циркуляции возбудителя чумы в этом регионе. Наличие протяженных границ и развитие торгово-экономические отношения создают предпосылки для заноса эпидемически опасных штаммов возбудителя чумы на территорию России. В связи с этим возникает необходимость тщательного изучения молекулярно-генетических характеристик популяций *Y. pestis*, циркулирующих на этих территориях, для совершенствования методов дифференциации и отслеживания эпидемических штаммов возбудителя чумы.

С учетом активных экономических связей между Россией и Казахстаном, а также для детализации молекулярно-генетической паспортизации этого региона, повышения эффективности мониторинга и прогнозирования активизации

сопредельных с границами России природных очагов чумы целью данной работы стал анализ пространственно-временной циркуляции *Yersinia pestis* на территории УЭППО в XX в. на основе молекулярно-генетических данных.

Материалы и методы

Исследовано 24 штамма *Y. pestis*, выделенных от носителей и переносчиков на территории УЭППО с 1945 по 1990 гг. в различные периоды эпизоотической активности, 21 штамм *Y. pestis* с сопредельных территорий аналогичного периода, а также 8 штаммов из разных очагов мира, относящихся к разным филогенетическим линиям. Штаммы *Y. pestis* выращивали при температуре 28 °С в течение 24–48 ч на среде LB. Анализ биохимических свойств исследуемых штаммов проводили в соответствии со стандартными методами лабораторной диагностики возбудителя чумы. Выделение ДНК штаммов *Y. pestis* проводили с помощью набора PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, США). Высокопроизводительное секвенирование проводили по технологии Ion Torrent на платформе Ion GeneStudio S5 System (Thermo Fischer Scientific, США). Для первичной подготовки библиотеки фрагментов использовались наборы Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit and Ion Xpress™ Barcode Adapter 1–96 Kit. Для автоматической подготовки матрицы использовались Ion Chef System, а также Ion 510™ & 520™ & Ion 530™ Chip Kit. Контроль качества полученных прочтений проводили в программе FastQC v0.11.9. Для обработки данных и сборки необработанных коротких прочтений генома *de novo* использовали Ion Torrent Suite software package 5.12, Newbler gsAssembler 2.6, Unicycler v0.4.9 [6, 7]. Определение и анализ VNTR и CRISPR-локусов осуществляли с помощью авторских программ на языке программирования python v3.10 (модули библиотек pandas, Biopython [8]). Однонуклеотидные полиморфизмы выявляли путем выравнивания контигов на штамм CO92 (NCBI AL590842.1) с помощью программы snippy 4.6 с последующим удалением 28 гомоплазий [9–11]. Филогенетическую реконструкцию на основе 1353 SNPs, идентифицированных в коровом геноме 53 штамма *Y. pestis*, осуществляли методом Maximum Likelihood (модель нуклеотидных замен GTR, 500 бутстреп-реплик) [12] с использованием программы gubbins 3.3 [13]. Средний размер собранных геномов составил ~4,5 м.п.н., средняя глубина покрытия была 50×, среднее содержание %GC равнялось 47,5%.



Результаты и их обсуждение

В данной работе изучено 24 штамма *Y. pestis*, выделенных от носителей и переносчиков на территории УЭППО с 1945 по 1990 гг. в различные периоды эпизоотической активности и 22 штамма с сопредельных территорий, в том числе 6 штаммов из Волго-Уральского степного очага чумы (№15), 6 штаммов из Волго-Уральского песчаного очага чумы (№ 16), 3 штамма из Урало-Уильского степного очага чумы (№ 17), 2 штамма из Предустюртского пустынного очага чумы (№ 19) и 4 штамма из очагов Северного Приаралья. Штаммы были получены от человека (6), от верблюда (2), от *S. pygmaeus* (3), от *R. opimus* (16), от *M. tamariscinus* (1), от *M. meridianus* (3), от *C. laeviceps* (2), от клещей без определения (2), от *N. setosa* (1), от блох без определения (3), от *X. scirjabini* (3).

Анализ биохимических свойств показал, что все исследованные штаммы обладали типичным фенотипом средневекового биовара основного подвида возбудителя чумы: ферментировали глицерин и арабинозу и были негативны по редукции нитратов и утилизации рамнозы.

На первом этапе нами был проведен анализ VNTR-локусов 24 штаммов *Y. pestis* из УЭППО для оценки разнообразия генотипов и вариабельности локусов. Наиболее вариабельными оказались локусы ms46 (7 аллелей) и ms62 (6 аллелей). В число вариабельных локусов также вошли ms56, ms70, ms71 и ms74, представленные в трех различных аллелях. Дискриминационный индекс Симпсона составил 0.948, что свидетельствует о высокой разрешающей способности данных локусов для дифференцирования популяций возбудителя чумы с исследуемой территории. Также нами было проведено сравнение CRISPR-элементов, которые отвечают за иммунную систему бактерий и могут сохранять в себе информацию о прошлых интервенциях фагов. Сравнение проводилось по трем CRISPR-локусам: YPa, YPb и YPc. Внутри очага никаких отличий выявлено не было. Размер YPa составил 305 п.н., размер YPc – 321 п.н., следует отметить, что локус YPb отсутствовал у всех штаммов из этого очага.

Для проведения филогенетической реконструкции использовались 45 штаммов *Y. pestis*, выделенных на территории природных очагов чумы Северо-Восточного Прикаспия за период 1925–1990 гг. Полногеномное секвенирование проводилось для 22 штаммов

из УЭППО, остальные были секвенированы нами ранее. Также в качестве аутгрупп использовались 8 штаммов *Y. pestis* из базы данных NCBI Genbank: Pestoides A (0.PE4a, NZ_ACNT00000000), Pestoides F (0.PE2, NC_009381), 620024 (0.PE7, ADPM00000000), CO92 (1.ORI1, AL590842.1), 351001 (2.ANT2, ADPF00000000), 91 (2.MED2, ADPU00000000), CMCC125002 (2.MED3, ADQN00000000), C-627 (2.MED0, MBSI00000000.1).

Дендрограмма построена методом WG-SNP-анализа на основе 1353 SNPs, обнаруженных в коровом геноме 53 штаммов *Y. pestis* (рисунок). Данные об аутгруппах на дендрограмме не приводятся для улучшения визуального разрешения филогенетического дерева.

По данным молекулярно-генетического анализа и филогенетической реконструкции все изученные штаммы средневекового биовара представлены 5 филогенетическими ветвями: 2.MED0 (Центрально-Кавказский высокогорный очаг чумы), 2.MED2 и 2.MED3 (Китай), недавно выявленная ветвь 2.MED4, которая по данным ретроспективного анализа существовала в Северном Прикаспии в первой половине XX в. Штаммы из очагов Северо-Восточного Прикаспия, выделенные в период 1945–1990 гг., вошли в наиболее молодую ветвь средневекового биовара 2.MED1, которая получила широкое территориальное распространение в очагах чумы Восточной Европы и Центральной Азии (см. рисунок).

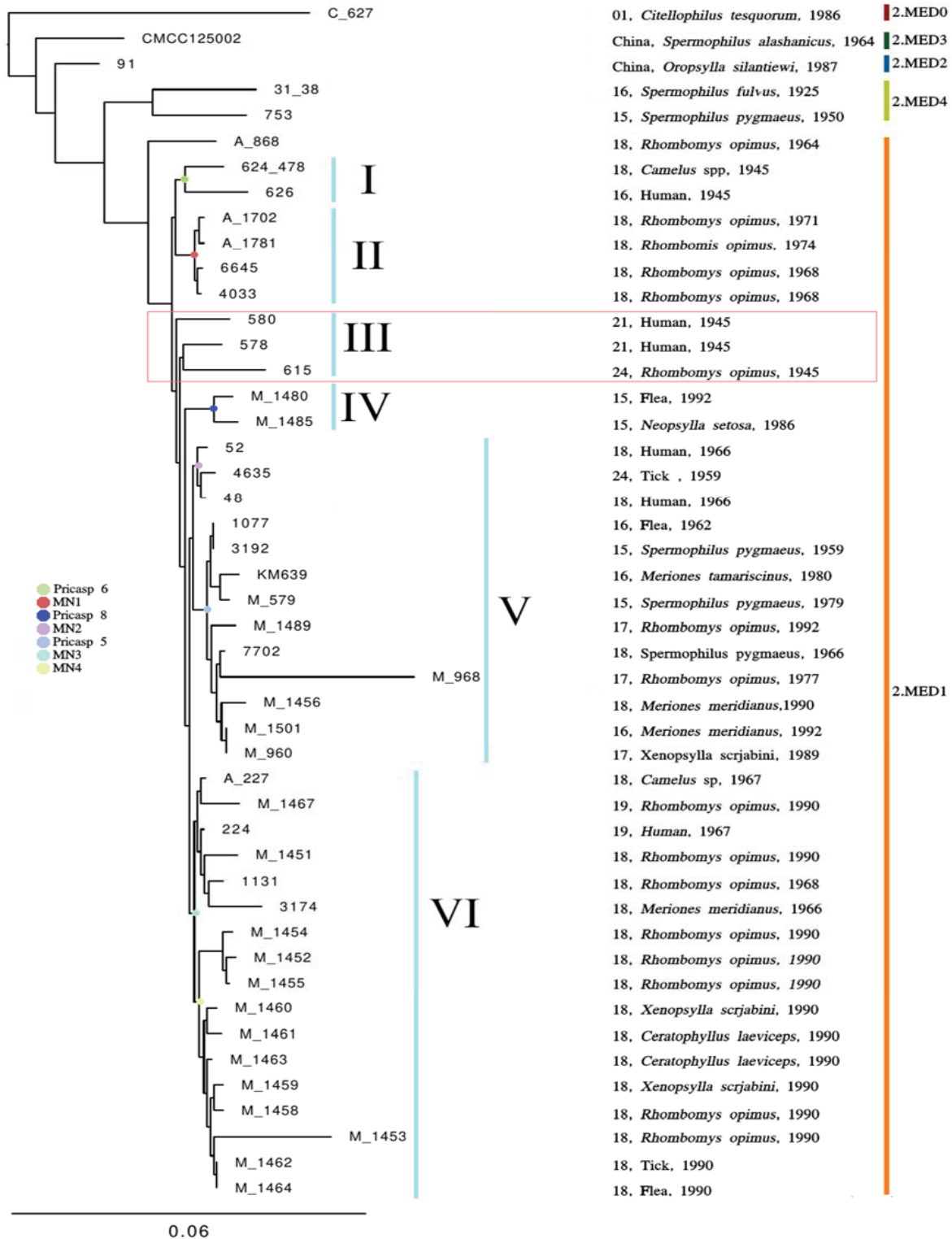
По итогам проведенного филогенетического анализа установлена популяционная структура *Y. pestis* средневекового биовара в УЭППО и сопредельных очагах чумы и выявлено 6 филогрупп, показывающих генетическое родство популяций на территории Северо-Восточного Прикаспия. Первая филогруппа включает в себя два штамма, выделенных в одном году из УЭППО и Волго-Уральского песчаного природного очагов чумы (ВУППО), относящихся к ветви 2.MED1. Данная филогруппа относится к охарактеризованному нами ранее SNP-генотипу Pricasp 6 [14]. Учитывая, что УЭППО и ВУППО являются граничащими между собой очагами, а в 1945–1946 гг. в этом регионе отмечалась крупная эпизоотия, соотносящаяся с первой волной распространения штаммов 2.MED1 на территории Северного Прикаспия [4], можно сделать предположение, что появление этого геноварианта в УЭППО произошло вследствие заноса из ВУППО.



Таблица 1 / Table 1

Штаммы *Y. pestis* из Урало-Эмбенского пустынный очага чумы, использованные в работе
***Y. pestis* strains from the Ural- Embensky desert plague focus used in this work**

Штамм Strain	Объект выделения Object of isolation	Место выделения Place of isolation
624(478)	<i>Camelus</i> species, 1945 г.	Казахстан, Атырауская обл. Kazakhstan, Atyrau region
7702	<i>Spermophilus pygmaeus</i> , 1966 г.	Казахстан, Атырауская обл., лев. бер. р. Урала, 300 с-в г. Гурьева Kazakhstan, Atyrau region, left bank of the Ural River, 300 s. to the town of Guriev
3174	<i>Meriones meridianus</i> , 1966 г.	Казахстан, Атырауская обл., лев. бер. р. Урала Kazakhstan, Atyrau region, left bank of the Ural River
48	Человек / Human, 1966 г.	Казахстан, Актюбинская обл. Kazakhstan, Aktobe region
52	Человек / Human, 1966 г.	Казахстан, Актюбинская обл. Kazakhstan, Aktobe Oblas.
A-227	<i>Camelus</i> species, 1967 г.	Казахстан, Атырауская обл., Жылыойский р-н, г. Кульсары. Kazakhstan, Atyrau region, Zhylyojskij district, Kulsary city
1131	<i>Rhombomys opimus</i> , 1968 г.	Казахстан, Атырауская обл., лев. бер. р. Урала Kazakhstan, Atyrau region, left bank of the Ural River
4033	<i>Rhombomys opimus</i> , 1968 г.	Казахстан, 19 км от Мунайлинского р-на Kazakhstan, 19 km from the Munaylinskiy district
6645	Блоха без определения / Flea without identification, 1968 г.	Казахстан, 21 км от Мунайлинского р-на Kazakhstan, 21 km from the Munaylinskiy district
A-1702	<i>Rhombomys opimus</i> , 1971 г.	Казахстан Kazakhstan
A-1781	<i>Rhombomys opimus</i> , 1974 г.	Казахстан, Пески Сам, Мангистауская обл. Kazakhstan, Peski Sam, Mangistau region
M-1451	<i>Rhombomys opimus</i> , 1990 г.	Казахстан, Атырауская обл., Макатский р-н Kazakhstan, Atyrau region, Makatsk district
M-1452	<i>Rhombomys opimus</i> , 1990 г.	Казахстан, Атырауская обл., Макатский р-н Kazakhstan, Atyrau region, Makatsk district
M-1453	<i>Rhombomys opimus</i> , 1990 г.	Казахстан, Атырауская обл., Махамбетский р-н Kazakhstan, Atyrau region, Makhambet district
M-1454	<i>Rhombomys opimus</i> , 1990 г.	Казахстан, Атырауская обл., Макатский р-н Kazakhstan, Atyrau region, Makatsk district
M-1455	<i>Rhombomys opimus</i> , 1990 г.	Казахстан, Атырауская обл., Макатский р-н Kazakhstan, Atyrau region, Makatsk district
M-1456	<i>Meriones meridianus</i> , 1990 г.	Казахстан, Атырауская обл. Kazakhstan, Atyrau region
M-1458	<i>Rhombomys opimus</i> , 1990 г.	Казахстан, Атырауская обл., Махамбетский р-н Kazakhstan, Atyrau region, Makhambet district
M-1459	<i>Xenopsylla skrjabini</i> , 1990 г.	Казахстан, Атырауская обл., Махамбетский р-н Kazakhstan, Atyrau region, Makhambet district
M-1460	<i>Xenopsylla skrjabini</i> , 1990 г.	Казахстан, Атырауская обл., Махамбетский р-н Kazakhstan, Atyrau region, Makhambet district
M-1461	<i>Ceratophyllus laeviceps</i> , 1990 г.	Казахстан, Атырауская обл., Махамбетский р-н Kazakhstan, Atyrau region, Makhambet district
M-1462	<i>Haemophilus</i> , 1990 г.	Казахстан, Атырауская обл., Махамбетский р-н Kazakhstan, Atyrau region, Makhambet district
M-1463	<i>Ceratophyllus laeviceps</i> , 1990 г.	Казахстан, Атырауская обл., Махамбетский р-н Kazakhstan, Atyrau region, Makhambet district
M-1464	Блоха без определения / Flea without identification, 1990 г.	Казахстан, Атырауская обл., Махамбетский р-н Kazakhstan, Atyrau region, Makhambet district



Филогенетический анализ 53 штаммов *Yersinia pestis* из Урало-Эмбенского пустынного очага чумы и сопредельных территорий по данным полногеномного секвенирования. Дендрограмма Maximum Likelihood построена на основе выявленных в коровом геноме 1353 SNPs с использованием модели GTR с 500 bootstrap-подкреплением. SNPs в узлах MN1–MN4 (MN – medieval node) приведены в табл. 2. I–VI – выделенные филогруппы, описываемые в тексте.

Красной рамкой отмечена группа штаммов из очагов Северного Приаралья (цвет онлайн)

Figure. Phylogenetic analysis of 53 strains of *Yersinia pestis* from the Ural-Embensky desert plague focus and adjacent territories by whole genome sequencing. The Maximum Likelihood dendrogram is based on 1353 SNPs identified in the core genome (GTR model) with 500 bootstrap replications. SNPs in nodes MN1–4 (MN – medieval node) are presented in the Table 2. I–VI – phyllogroups described in the article. A group of strains from North Aral foci is marked with a red frame (color online)



Вторая филогруппа включает в себя 4 штамма, выделенных в период с 1968–1974 в УЭППО. Они подразделяются на два кластера. Все штаммы этой филогруппы относятся к ветви 2.MED1. Они выделены во второй половине XX в. от основного носителя – большой песчанки. Были обнаружены 4 маркерные SNPs характерных для этой филогруппы (табл. 2, узел MN1 – 4 SNPs). С помощью сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей коллекционных штаммов *Y. pestis* по выявленным SNPs в узле MN1 установлено, что выделенные в этот период в УЭППО штаммы относятся ко второй волне распространения линии 2.MED1 с территорий

Мангышлакского (1978 г.) и Устюртского пустынных очагов чумы (1962 и 1975 гг.) в Северо-Восточный Прикаспий. Согласно данным эпизоотологического и филогенетического анализа, эти штаммы являются потомками первой волны распространения 2.MED1 в первой половине XX в. Интересно, что в самом Северном Прикаспии после 1945 г. данный геновариант уже не выделялся из-за наступления межэпизоотического периода. С определенной долей вероятности можно предположить, что активизация УЭППО в 1968 г. была вызвана распространением штаммов ветви 2.MED1 из очагов чумы, расположенных на Устюртском плато.

Таблица 2 / Table 2

Маркерные SNPs для филогенетических узлов дендрограммы
Marker SNPs for phylogenetic nodes of dendrogram

Узел Node	Координаты SNPs по геному CO92 (AL590842.1) SNPs coordinates by CO92 genome (AL590842.1)	Замена нуклеотида Nucleotide substitution	Локализация Localization
MN1	472490	G→C	Межгенное пространство Intergenic space
	1424616	G→T	<i>bcr</i>
	1961220	A→T	<i>gltP</i>
	4589546	G→A	Межгенное пространство Intergenic space
MN2	2281966	C→T	Межгенное пространство Intergenic space
MN3	2958240	C→T	Межгенное пространство Intergenic space
MN4	2600092	T→C	Межгенное пространство Intergenic space

В третью филогруппу вошли штаммы, выделенные из очагов Северного Приаралья и относящиеся к ветви 2.MED1. В 1960–1970 гг. прошлого века в связи с изменившимися климатическими условиями и флуктуациями уровня Каспийского моря произошло повышение эпизоотической активности и изменение пространственно-временной структуры популяций *Y. pestis*, что послужило отправной точкой для распространения штаммов ветви 2.MED1 из очагов Северного Приаралья в очаги Северного и Северо-Западного Прикаспия, поэтому филогруппы 4–6 предположительно являются потомками штаммов из очагов Северного Приаралья [5]. Четвертая филогруппа включает два штамма, выделенных в 1986 и 1992 гг. в Волго-Уральском степном очаге чумы. Оба штамма

выделены от блох и относятся к SNP-генотипу Pricasp 8, подробная характеристика которого была дана нами ранее [14]. Пятая филогруппа включает в себя 13 штаммов, которые разделяются на два кластера. В малый кластер входит 3 штамма (MN2 – 1 SNPs), один из которых был выделен на территории Северного Приаралья (Приаральско-Каракумский пустынный очаг) в 1959 г., а два других на территории Северо-Восточного Прикаспия (УЭППО) в 1962 и 1966 гг., что также свидетельствует об интродукции штаммов Северного Приаралья на территорию Северо-Восточного Прикаспия и третьей волне распространения штаммов 2.MED1. Второй кластер включает в себя 10 штаммов и относится к охарактеризованному нами ранее SNP-генотипу Pricasp 5 [14]. В шестую филогруппу (MN3 – 1



SNPs) вошли 17 штаммов. Доминирующая часть изолятов (15 штаммов) выделена на территории УЭППО в 1990-е гг. и три штамма выделены в период с 1966 по 1968 гг. Также два штамма выделены в Предустюртском пустынном очаге в 1967 и 1990 гг. По имеющимся данным, эта волна распространения ветви 2.MED1 была вызвана климатическими изменениями, связанными с новым повышением уровня Каспийского моря во второй половине XX в. Штаммы, которые выделялись в 1990 г. на территории УЭППО, имели одну уникальную SNPs (MN4), тем не менее данный геновариант внутри себя подразделяется на несколько кластеров, отличающихся 1-2 SNPs, которые в основном являются уникальными для единичных штаммов, что можно связать с активными эпизоотическими процессами в очаге, которые способствовали внутривидовому генетическому разнообразию.

Таким образом, нами проведен комплексный молекулярно-генетический анализ штаммов *Y. pestis*, выделенных в различные периоды активности УЭППО, методами сравнительного анализа CRISPR/VNTR локусов, а также WG-SNP-анализа и филогенетической реконструкции. Анализ VNTR-локусов выявил, что высоковариабельными локусами в данном очаге являлись ms46 (7 аллелей) и ms62 (6 аллелей), а также ms56, ms70, ms71 и ms74, представленные в трех различных аллелях. Анализ CRISPR-локусов (YP1, YP2 и YP3) не выявил отличий между штаммами с территориями УЭППО. Полученные данные о популяционной структуре на основе филогенетической реконструкции полногеномных последовательностей штаммов *Y. pestis*, циркулирующих на территории УЭППО и сопредельных очагов чумы, в комплексе с эпизоотическими и эпидемиологическими сведениями свидетельствуют о наличии трех волн распространения филогенетической ветви 2.MED1 средневекового биоценоза на территорию УЭППО. Первая волна распространения на территорию УЭППО пришла из Северо-Западного и Северного Прикаспия в первой половине XX в. Далее на территории очагов чумы Северного Прикаспия наступил межэпизоотический период, вызванный климатическими изменениями, влиянием антропогенных факторов, что в совокупности обусловило изменение биоценотической структуры очагов этого региона, падение численности носителей и переносчиков и смену популяции возбудителя. Активизация УЭППО очага после 1966 г. была обусловлена распростра-

нением штаммов *Y. pestis* ветви 2.MED1 из очагов Северного Приаралья (1945 г.). Важно отметить, что штаммы возбудителя чумы, выделенные в УЭППО в период 1968–1974 гг., имеют близкое генетическое родство со штаммами из Мангышлакского (1978 г.) и Устюртского пустынных очагов чумы (1962 и 1975 гг.). Согласно данным эпизоотологического и филогенетического анализа, эти штаммы являются потомками первой волны распространения 2.MED1 на территории Северного Прикаспия первой половины XX в., которые после 1945 г. в самом Северном Прикаспии уже не выделялись. После межэпизоотического периода в 1966 г. и в 1968 г. на территории УЭППО одновременно циркулировали потомки двух разных волн распространения ветви 2.MED1: с Устюртского плато и с Северного Приаралья.

Заключение

Полученные данные будут использованы для молекулярно-генетической детализации паспортизации очагов, в которых циркулирует этот высоковирулентный средневековый биоценоз *Y. pestis*, а также могут повысить эффективность эпидемиологического мониторинга на данной территории. Выяснение пространственно-временных закономерностей циркуляции *Y. pestis* важно для понимания функционирования природных очагов, составления долгосрочных эпидемиологических прогнозов, а также предотвращения заноса из эпизоотически активных очагов чумы сопредельных стран.

Список литературы

1. Абдел З. Ж., Ерубаяев Т. К., Токмурзиева Г. Ж., Аймаханов Б. К., Далибаяев Ж. С., Мусажалиева Р. С., Жумадилова З. Б., Мека-Меченко В. Г., Мека-Меченко Т. В., Матжанова А. М., Абдрасилова А. А., Умарова С. К., Рысбекова А. К., Есимсеит Д. Т., Абделиев Б. З., Кобыратбаев К. К., Исаков Б. Г., Белый Д. Г., Ескермесов М. К., Кулемин М. В., Аскар Ж. С., Калдыбаяев Т. Е., Мухтаров Р. К., Давлетов С. Б., Сутягин В. В., Лездиньш И. А. Демаркация границ Центральноазиатского пустынного природного очага чумы Казахстана и мониторинг ареала основного носителя *Rhombomys opimus* // Проблемы особо опасных инфекций. 2021. № 2. С. 71–78.
2. Аймаханов Б. К., Куница Т. Н., Бурделов Л. А., Мека-Меченко В. Г., Сагдиев З. А., Садовская В. П., Даниярова А. Б., Умбетьярова Л. Б., Далибаяев Ж. С., Хамзин Т. Х., Сараяев Ф. А., Камзина Ж. К. Анализ эпизоотолого-эпидемиологической ситуации по чуме в Атырауской области // West Kazakhstan Medical Journal. 2017. № 4 (56). С. 4–13.



3. Паспорт регионов Казахстана по особо опасным инфекциям / под ред. д-ра биол. наук, проф. Л. А. Бурделова. Алматы : NV Print, 2015. 179 с.
4. Кадастр эпидемических и эпизоотических проявлений чумы на территории Российской Федерации и стран ближнего зарубежья (с 1876 по 2016 г.) / под ред. акад. РАН В. В. Кутырева и проф. А. Ю. Поповой. Саратов : ООО «Амирит», 2016. 248 с.
5. Eroshenko G. A., Popov N. V., Al'khova Z. V., Kukleva L. M., Balykova A. N., Chervyakova N. S., Naryshkina E. A., Kutyrev V. V. Evolution and circulation of *Yersinia pestis* in the Northern Caspian and Northern Aral Sea regions in the 20th–21st centuries // PLoS ONE. 2021. Vol. 2. P. e0244615. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244615>
6. Wick R. R., Judd M. L., Gorrie L. C., Holt K. E. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads // PLoS Computational Biology. 2017. Vol 13, № 6. P. e1005595. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>
7. Armengol G., Sarhadi V.K., Rönty M., Tikkanen M., Knuutila A., Knuutila S. Driver gene mutations of non-small-cell lung cancer are rare in primary carcinoids of the lung: NGS study by ion torrent // Lung. 2015. Vol. 193. P. 303–308. <https://doi.org/10.1007/s00408-015-9690-1>
8. Cock J. A. P., Antao T., Chang J. T., Chapman B. A., Cox C. J., Dalke A., Friedberg I., Hamelryck T., Kauff F., Wilczynski B., de Hoon M. J. L. Biopython: Freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics // Bioinformatics. 2009. Vol. 25, № 11. P. 1422.
9. Motro Y., Moran-Gilad J. Next-generation sequencing applications in clinical bacteriology // Biomolecular Detection and Quantification. 2017. Vol. 14. P. 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.10.002>.
10. Wu M. C., Kraft P., Epstain M. P., Taylor D. M., Chanock S. J., Hunter D. J., Lin X. Powerful SNP-Set Analysis for case-control genome-wide association studies // The American Journal of Human Genetics. 2010. Vol. 86. P. 929–942. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.05.002>
11. Wu Y., Hao T., Qian X., Zhang X., Songz Y., Yang R., Cui Y. Small insertions and deletions drive genomic plasticity during adaptive evolution of *Yersinia pestis* // Microbiology Spectrum. 2022. Vol. 10. P. E02242-21. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02242-21>
12. De Bruyn A., Martin D. P., Lefeuvre P. Phylogenetic reconstruction methods: An overview // Molecular Plant Taxonomy: Methods and Protocols. 2014. Vol. 1115. P. 257–277. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-767-9_13
13. Croucher N. J., Page A. J., Connor T. R., Delaney A. J., Keane J. A., Bentley S. D., Parkhill J., Harris S. R. Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins // Nucleic Acids Research. 2015. Vol. 43. P. e15. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1196>
14. Балькова А. Н., Куклева Л. М., Горюнова П. А., Шевченко К. С., Коврижников А. В., Краснов Я. М., Червякова Н. С., Ерошенко Г. А., Кутырев В. В. SNP-профили штаммов *Yersinia pestis* средневекового био-вара из очагов чумы Прикаспия // Проблемы особо опасных инфекций. 2022. № 4. С. 41–49. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2022-4-41-49>

References

1. Abdel Z. Zh., Erubaev T. K., Tokmurzieva G. Zh., Ajmahanov B. K., Dalibaev Zh. S., Musagalieva R. S., Zhumadilova Z. B., Meka-Mechenko V. G., Meka-Mechenko T. V., Matzhanova A. M., Abdrasilova A. A., Umarova S. K., Rysbekova A. K., Esimseit D. T., Abdeliev B. Z., Konyratbaev K. K., Iskakov B. G., Belyj D. G., Eskermesov M. K., Kulemin M. V., Askar Zh. S., Kaldybaev T. E., Muhtarov R. K., Davletov S. B., Sutjagin V. V., Lezdin'sh I. A. Demarcation of the boundaries of the Central Asian desert natural plague foci of Kazakhstan and monitoring of the range of the main carrier of *Rhombomys opimus*. *Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2021, no. 2, pp. 71–78 (in Russian).
2. Ajmahanov B. K., Kunica T. N., Burdelov L. A., Mekamechenko V. G., Sagiev Z. A., Sadovskaja V. P., Danijarova A. B., Umbet'jarova L. B., Dalibaev Zh. S., Hamzin T. H., Saraev F. A., Kamzina Zh. K. Analysis of the epizootological and epidemiological situation of plague in the Atyrau region. *West Kazakhstan Medical Journal*, 2017, vol. 4 (56), pp. 4–13 (in Russian).
3. *Passport regionov Kazakhstana po osobo opasnym infektsiyam*. Pod red. L. A. Burdelova [Burdelov L. A., ed. Passport of Regions of Kazakhstan on Particularly Dangerous Infections]. Almaty, NV Print, 2015. 179 p. (in Russian).
4. *Kadastr epidemicheskikh i epizooticheskikh proyavleniy chумы na territorii Rossiyskoy Federatsii i stran blizhnego zarubezh'ya (s 1876 po 2016 g.)*. Pod red. V. V. Kutyreva, A. Yu. Popovoy [Kutyrev V. V., Popova A. Yu., eds. Cadastre of epidemic and epizootic manifestations of plague in the Russian Federation and neighboring countries (from 1876 to 2016)]. Saratov, LLC "Amirit", 2016. 248 p. (in Russian).
5. Eroshenko G. A., Popov N. V., Al'khova Z. V., Kukleva L. M., Balykova A. N., Chervyakova N. S., Naryshkina E. A., Kutyrev V. V. Evolution and circulation of *Yersinia pestis* in the Northern Caspian and Northern Aral Sea regions in the 20th–21st centuries. *PLoS ONE*, 2021, vol. 2, pp. e0244615. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244615>
6. Wick R. R., Judd M. L., Gorrie L. C., Holt K. E. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Computational Biology*, 2017, vol 13, no. 6, pp. e1005595. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>
7. Armengol G., Sarhadi V.K., Rönty M., Tikkanen M., Knuutila A., Knuutila S. Driver gene mutations of



- non-small-cell lung cancer are rare in primary carcinoids of the lung: NGS study by ion torrent. *Lung*, 2015, vol. 193, pp. 303–308. <https://doi.org/10.1007/s00408-015-9690-1>
8. Cock J. A. P., Antao T., Chang J. T., Chapman B. A., Cox C. J., Dalke A., Friedberg I., Hamelryck T., Kauff F., Wilczynski B., de Hoon M. J. L. Biopython: Freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. *Bioinformatics*, 2009, vol. 25, no. 11, pp. 1422.
 9. Motro Y., Moran-Gilad J. Next-generation sequencing applications in clinical bacteriology. *Biomolecular Detection and Quantification*, 2017, vol. 14, pp. 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.10.002>
 10. Wu M. C., Kraft P., Epstein M. P., Taylor D. M., Chanock S. J., Hunter D. J., Lin X. Powerful SNP-Set Analysis for case-control genome-wide association studies. *The American Journal of Human Genetics*, 2010, vol. 86, pp. 929–942. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.05.002>
 11. Wu Y., Hao T., Qian X., Zhang X., Songz Y., Yang R., Cui Y. Small insertions and deletions drive genomic plasticity during adaptive evolution of *Yersinia pestis*. *Microbiology Spectrum*, 2022, vol. 10, pp. E02242-21. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02242-21>
 12. De Bruyn A., Martin D. P., Lefeuvre P. Phylogenetic reconstruction methods: An overview. *Molecular Plant Taxonomy: Methods and Protocols*, 2014, vol. 1115, pp. 257–277. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-767-9_13
 13. Croucher N. J., Page A. J., Connor T. R., Delaney A. J., Keane J. A., Bentley S. D., Parkhill J., Harris S. R. Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins. *Nucleic Acids Research*, 2015, vol. 43, pp. e15. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1196>
 14. Balykova A. N., Kukleva L. M., Goryunova P. A., Shevchenko K. S., Kovrizhnikov A. V., Krasnov Y. M., Chervyakova N. S., Eroshenko G. A., Kuttyrev V. V. SNP-profiles of *Yersinia pestis* strains of the medieval biovar from the Caspian Sea Region plague foci. *Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2022, vol. 4, pp. 41–49 (in Russian). <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2022-4-41-49>

Поступила в редакцию 15.06.2023; одобрена после рецензирования 17.06.2023; принята к публикации 01.07.2023
The article was submitted 15.06.2023; approved after reviewing 17.06.2023; accepted for publication 01.07.2023



Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 4. С. 447–460
Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology, 2023, vol. 23, iss. 4, pp. 447–460
<https://ichbe.sgu.ru> <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-4-447-460>, EDN: QDBXIT

Научная статья
УДК 631.42.504.75

Биологические свойства почв Надеждинского и Северо-Камышанского нефтяных месторождений, расположенных на территории заказника «Меклетинский»



А. А. Булуктаев

Калмыцкий научный центр Российской академии наук, Россия, 358000, г. Элиста, ул. им. И. И. Илишкина, д. 8

Булуктаев Алексей Александрович, кандидат биологических наук, научный сотрудник отдела комплексного мониторинга и информационных технологий, buluktaev89@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2329-465X>

Аннотация. Острейшая экологическая проблема во многих регионах России и других странах – загрязнение природной среды нефтью и нефтепродуктами. Загрязнение почвы нефтепродуктами может возникнуть при различных аварийных ситуациях в районах добычи и переработки нефти, при прорывах нефтепроводов, что вызывает утечку и разливы их на поверхности почвы, а также в местах распределения нефтепродуктов. Целью настоящего исследования является изучение биологических свойств почв Калмыкии в условиях загрязнения нефтью и нефтепродуктами. В качестве объектов исследования выбраны почвы нефтепромыслов «Надеждинское» и «Северо-Камышанское», расположенные на территории заказника «Меклетинский». Лабораторно-аналитические исследования, а также отбор проб выполнены с использованием общепринятых в биологии и почвоведении методов. Содержание нефтепродуктов в почвах нефтепромысла находится в широких пределах – от 0,4 до 12,5%. Между содержанием в почве нефтепродуктов и активностью каталазы и фосфатазы установлена отрицательная корреляционная зависимость. Нефтепродукты оказывают негативное воздействие на рост и развитие редиса. Эксплуатация нефтяных месторождений на особо охраняемых природных территориях приводит к поступлению нефти и нефтепродуктов в окружающую среду. В почвах Калмыкии на территории нефтепромыслов под воздействием загрязнения нефтью и нефтепродуктами происходит ингибирование активности почвенных ферментов, кроме того, почвы проявляют высокую степень фитотоксичности по отношению к тест-растениям.

Ключевые слова: Республика Калмыкия, особо охраняемые природные территории, нефтепромыслы, нефтяное загрязнение, заказник, ферментативная активность, фитотоксичность

Благодарности: Исследование проведено в рамках государственной субсидии – проект «Ассиметрично развивающиеся территории перед традиционными и новыми вызовами: исследование динамики социально-экономических процессов и изменчивости экологической ситуации» (№ госрегистрации 122022700133-9) (2022–2026 гг.).

Для цитирования: Булуктаев А. А. Биологические свойства почв Надеждинского и Северо-Камышанского нефтяных месторождений, расположенных на территории заказника «Меклетинский» // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 4. С. 447–460. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-4-447-460>, EDN: QDBXIT

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

Article

Biological properties of soils of the "Nadedzhdinsky" and "Severo-Kamyshansky" oil fields located in the territory of the "Mekletsky" reserve

А. А. Buluktaev

Kalmyk Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, 8 I. K. Ilishkina St., Elista 358000, Russia

Aleksey A. Buluktaev, buluktaev89@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2329-465X>

Abstract. The most acute environmental problem in many regions of Russia and other countries is environmental pollution with oil and oil products. Soil pollution with oil products can occur in various emergencies in areas of oil production and processing, when oil pipelines break, which causes leakage and spills on the soil surface, as well as in places where oil products are distributed. The purpose of this study is to study the biological properties of soils in Kalmykia under conditions of oil and oil products pollution. The soils of the Nadezhdinskoye and Severo-Kamyshanskoye oilfields located on the territory of the Mekletinsky nature reserve were chosen as the objects of study. Laboratory and analytical studies, as well as sampling, were carried out using methods generally accepted in biology and soil science. The content of oil products in the soils of the oil field is in a wide range: from 0.4 to 12.5%. A negative correlation was established between the content



of oil products in the soil and the activity of catalase and phosphatase. Oil products have a negative impact on the growth and development of radishes. The exploitation of oil fields in specially protected natural areas leads to the flow of oil and oil products into the environment. In the soils of Kalmykia on the territory of oil fields, under the influence of pollution with oil and oil products, the activity of soil enzymes is inhibited, in addition, the soils exhibit a high degree of phytotoxicity with respect to test plants.

Keywords: Republic of Kalmykia, specially protected natural areas, oil fields, oil pollution, nature reserve, enzymatic activity, phytotoxicity

Acknowledgments: The research was carried out within the framework of a state subsidy – the project "Asymmetrically developing territories facing traditional and new challenges: A study of the dynamics of socio-economic processes and the variability of the environmental situation" (State registration number 122022700133-9) (2022–2026).

For citation: Buluktaev A. A. Biological properties of soils of the "Nadedzhdinsky" and "Severo-Kamyshansky" oil fields located in the territory of the "Mekletsky" reserve. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2023, vol. 23, iss. 4, pp. 447–460 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-4-447-460>, EDN: QDBXIT

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 на территории Республики Калмыкии учтены 30 месторождений нефти и газа. Начальные геологические запасы нефтепродуктов составляют 202 млн т нефти, 898,7 млрд м³ газа, 112,6 млн т конденсата [1]. Уровень добычи по Республике Калмыкии значительно ниже, чем в соседних регионах (Волгоградская обл. – более 2,5 млн т, Ставропольский край – около 1 млн т, Чеченская Республика – более 2 млн т, Дагестан – около 200 тыс. т) [2–5].

Следует отметить, что предприятия по добыче нефти и нефтепродуктов функционируют даже на особо охраняемых природных территориях (ООПТ), создавая риски попадания загрязнителей в окружающую среду. Так, на территориях заповедника «Черные земли» и заказника федерального значения «Меклетинский» (рис. 1) в результате аварийных ситуаций, изношенности оборудования и других факторов ежегодно фиксируются случаи разливов нефти и нефтепродуктов [6].

Попадание в почву нефти и нефтепродуктов приводит к изменению активности ферментов, участвующих в важных биологических процессах, что неоднозначно влияет на азотный, фосфорный, серный и углеводный обмен, вызывая изменение активности ряда ферментов, нефть и нефтепродукты негативно влияют на рост и развитие растений [7–22].

Материалы и методы

Надеждинское и Северо-Камышанское нефтяные месторождения расположены в центре Черноземельского района Республики Калмыкии, в восьми километрах от районного центра – пос. Комсомольский. Надеждинское нефтяное месторождение находится на терри-

тории заказника «Меклетинский». Почвенный покров сложен бурыми полупустынными почвами в комплексе с солонцами. Геоботаническое обследование данной территории показало, что основу травостоя составляют злаково-тавричско-сантониннополынные сообщества. По данным земельной службы Черноземельского района, Надеждинское месторождение занимает 17,67 га. Часть нефтяных скважин Северо-Камышанского нефтяного месторождения расположена на территории Федерального заказника «Меклетинский». Почвенный покров представлен песчаными разностями в комплексе с солонцами. Основу травостоя составляют лебедово-солянково-сантониннополынные сообщества. Разработка Надеждинского месторождения начата 31 июня 1976 г., Северо-Камышанского – с 1974 г. Недропользователем действующих месторождений является ООО «Нефтяная компания «ЕвроСибОйл».

В ходе исследования территорий месторождений зафиксировано 20 нефтяных вышек, из которых 7 – действующие. Законсервированы 2 вышки, временно не действуют 12 вышек, так как они находятся в процессе ремонта по замене станков-качалок на электронасосные системы. Координаты местоположения всех нефтяных вышек были зафиксированы с помощью навигатора Garmin (табл. 1).

Пробы почв отбирались непосредственно у нефтяных вышек, нефтепровода и нефтяных разливов. Фоновые образцы были отобраны на расстоянии 250–500 м от нефтепромыслов. Почвы отбирались с поверхностного слоя 0–20 см по общепринятым методикам.

Содержание нефтепродуктов в почве определяли гравиметрическим методом путем экстракции нефтепродуктов из почв хлороформом и гексаном (ПНД Ф 16.1.41-04, 2004).

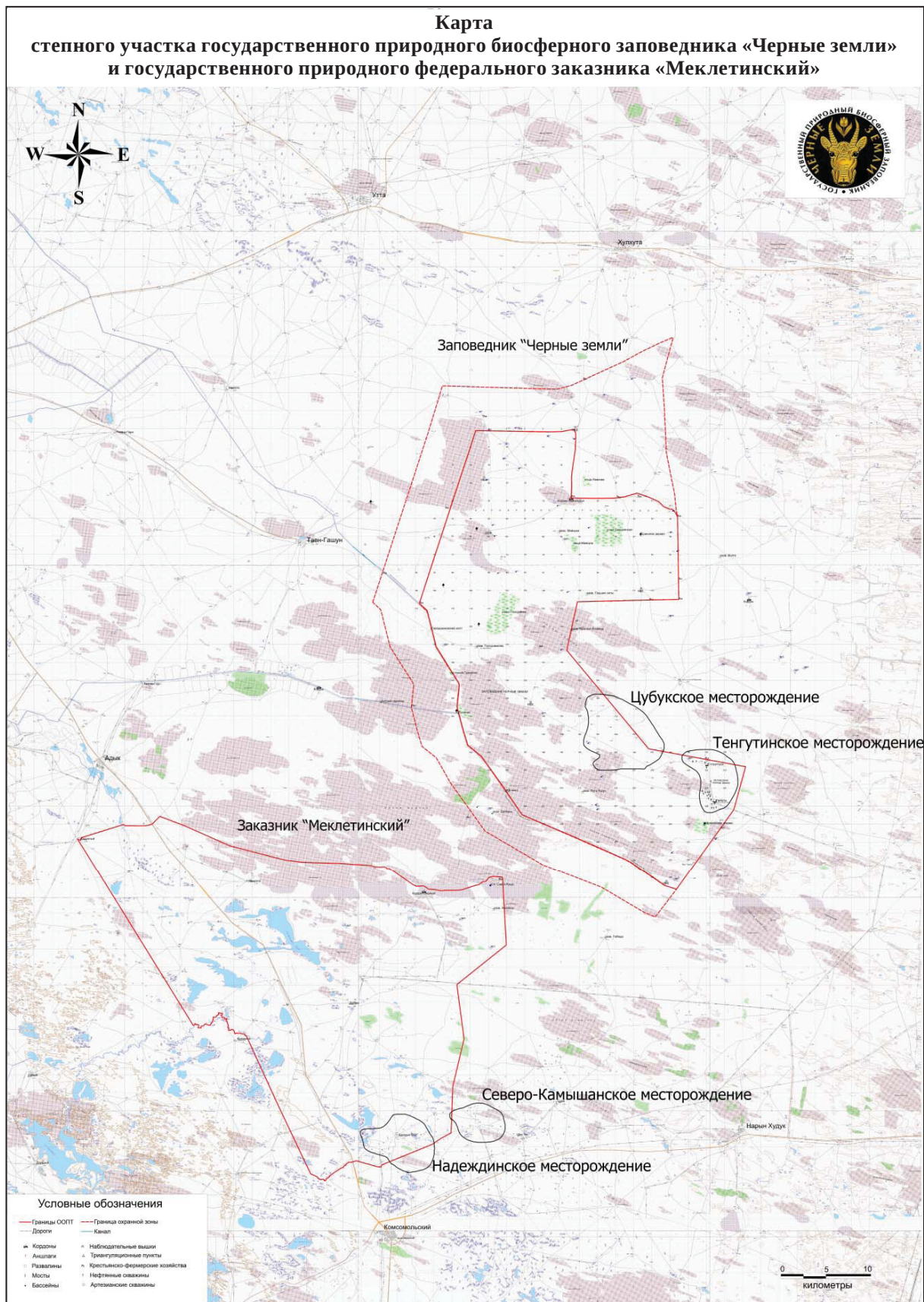


Рис. 1. Схема расположения нефтепромыслов на территории заповедника «Черные земли» и заказника «Меклетинский»
Fig. 1. Scheme of the location of oil fields on the territory of the «Chernye Zemlya» Reserve and the «Mekletinsky» Reserve



Таблица 1 / Table 1

Координаты мест отбора почвенных образцов
Coordinates of soil sampling sites

№	Порядковый номер нефтяной вышки / Serial number of the oil rig	Координаты мест отбора проб / Sampling site coordinates	Статус / Status
Надеждинское нефтегазовое месторождение / Nadezhdinskoye oil and gas field			
1	Скважина № 127 / Well No. 127	N45° 25.147' E46° 01.718'	Действующая / Working
2	Скважина № 37 / Well No. 37	N45° 25.147' E46° 01.718'	Действующая / Working
3	Скважина № 145 / Well No. 145	N45° 25.566' E46° 01.131'	Действующая / Working
4	Скважина № 150 / Well No. 150	N45° 25.815' E46° 00.983'	Временно недействующая / Temporarily idle oil rig
5	Скважина № 42 / Well No. 42	N45° 25.908' E46° 01.413'	Временно недействующая / Temporarily idle oil rig
6	Скважина № 126 / Well No. 126	N45° 24.999' E46° 01.399'	Законсервирована / Stopped
7	Скважина № 137 / Well No. 137	N45° 25.033' E46° 00.945'	Временно недействующая / Temporarily idle oil rig
8	Скважина № 125 / Well No. 125	N45° 24.849' E46° 01.074'	Временно недействующая / Temporarily idle oil rig
9	Скважина № 143 / Well No. 143	N45° 25.202' E46° 00.202'	Действующая / Working
10	Скважина № 52 / Well No. 52	N45° 25.178' E45° 59.845'	Действующая / Working
11	Скважина № 131 / Well No. 131	N45° 24.991' E46° 02.194'	Временно недействующая / Temporarily idle oil rig
12	Скважина № 4 / Well No. 4	N45° 25.107' E46° 02.618'	Временно недействующая / Temporarily idle oil rig
13	Скважина № 133 / Well No. 133	N45° 24.892' E46° 02.552'	Временно недействующая / Temporarily idle oil rig
14	Скважина № 135 / Well No. 135	N45° 24.732' E46° 02.241'	Временно недействующая / Temporarily idle oil rig
15	Скважина № 132 / Well No. 132	N45° 24.601' E46° 01.836'	Законсервирована / Stopped
16	Скважина № 146 / Well No. 146	N45° 25.712' E46° 01.355'	Действующая / Working
17	Скважина без номера / Well without a number	N46° 20.110' E45° 25.043'	Временно недействующая / Temporarily idle oil rig
18	Скважина без номера / Well without a number	N46° 10.199' E45° 25.919'	Временно недействующая / Temporarily idle oil rig
Северо-Камышанское нефтяное месторождение / Severo-Kamyshanskoye oil field			
19	Скважина № 20 / Well No. 20	N45° 25.997' E46° 10.703'	Действующая / Working
20	Скважина № 17 / Well No. 17	N45° 26.129' E46° 10.206'	Временно недействующая / Temporarily idle oil rig



Активность каталазы и дегидрогеназ измеряли по методикам Галстяна (Галстян, 1978), уреазы – по методу Галстяна (Галстян, 1978), фосфатазы – по методу Штефаника, Ярни, Томеску (Stefanic et al., 1965), активность инвертазы определяли по А. Ш. Галстяну в модификации Ф. Х. Хазиева (Галстян, 1990).

О фитотоксичности почв судили по изменению показателей прорастания семян (всхожесть) и интенсивности начального роста проростков (длина корней, длина зеленых проростков, масса проростков, общая фитомасса) (ГОСТ 33061-2014, 2015). В качестве тест-объекта был использован редис (*Raphanus sativus* L.) сорта «Рубин». Всхожесть семян тест-растений определяли в лабораторных условиях на чашках Петри. Для этого исследуемые (фоновые и загрязненные) почвы помещали в чашки Петри слоем 1 см, массой 80 г и увлажняли водой. В каждую чашку Петри высеивали по 20 семян исследуемых тест-растений и инкубировали в комнатных условиях, по мере необходимости почву увлажняли, не допуская пересыхания. Через 2 недели после посева растения удаляли, определяли длину побегов и корней, затем промывали корни водопроводной водой, высушивали и определяли массу растений.

Для объединения биологических показателей была использована методика определения интегрального показателя биологических свойств почвы (ИПБС) предложенная С. И. Колесниковым, К. Ш. Казеевым и В. Ф. Вальковым [23]. Данная методика позволяет оценить совокупность биологических показателей. Для этого значение каждого из показателей на контроле принималось за 100% и по отношению к нему в процентах выражались значения, полученные в остальных вариантах опыта (в загрязненной почве). Затем суммировались относительные значения многих показателей, поскольку их абсолютные значения не могут быть суммированы, так как имеют разные единицы измерения. Итог был выражен в процентах по отношению к контролю. ИПБС был рассчитан по следующим показателям: всхожесть, длина корней, активность каталазы, дегидрогеназ, фосфатазы, уреазы и инвертазы.

Все варианты лабораторных экспериментов закладывали в трех повторностях, а при проведении биотестирования также использовали образцы в трехкратной повторности.

Результаты и их обсуждение

Содержание нефтепродуктов в почвах нефтепромыслов находится в широких пределах:

от 0,4 до 12,5%, причем минимальные концентрации нефтепродуктов зафиксированы в почвах законсервированных скважин, а максимальные – в почвах под нефтяным разливом. Фоновые образцы почв Надеждинского и Северо-Камышанского месторождений имеют следовые значения нефтепродуктов, что можно объяснить методом экстракции нефтепродуктов. Так, гексан и хлороформ растворяют все органические соединения почв (прил. 1). Стоит отметить, что активности исследованных почвенных ферментов низкие даже на фоновых участках, что характерно для бурых полупустынных почв Калмыкии, вследствие климатических условий (прессинг высоких температур, недостаточная влажность и скудность растительного покрова).

В работе Ф. Х. Хазиева установлена существенная трансформация ферментного пула черноземов Шкаповского месторождения, при загрязнении нефтью и нефтепродуктами. Автором доказано, что активность окислительно-восстановительных и гидролитических ферментов ингибируется, однако это зависит от концентрации, состава нефтепродукта и срока экспозиции поллютанта с почвой [24]. В работе С. И. Колесникова и соавторов исследовано изменение активности каталазы при действии различных доз нефти, в результате авторами установлено ингибирование активности каталазы на всех исследуемых почвах, причем чем выше концентрация вносимой нефти, тем сильнее ингибируется активность каталазы. Каталаза, по мнению авторов, является хорошим индикационным ферментом процессов окисления нефти [25].

Активность каталазы в фоновых почвах исследуемых нефтепромыслов находится в пределах 2,36 мл O_2 1 г / 1 минуту, при содержании в почве нефтепродуктов 12,5% активность каталазы ингибируется до 0,23 мл O_2 1 г / 1 мин. При среднем содержании нефти в почвах нефтепромысла активность каталазы снижается до 1,40 мл O_2 1 г / 1 мин, что в 1,68 раза меньше чем фоновые значения. Высокая каталазная активность отмечается в почвах у законсервированных скважин № 132 и 126, которые были ликвидированы еще в начале 2000-х гг., это может говорить о восстановлении в них биологических процессов. Между содержанием в почве нефтепродуктов и активностью каталазы установлена отрицательная корреляционная зависимость ($r = -0,96$) (рис. 2, а).

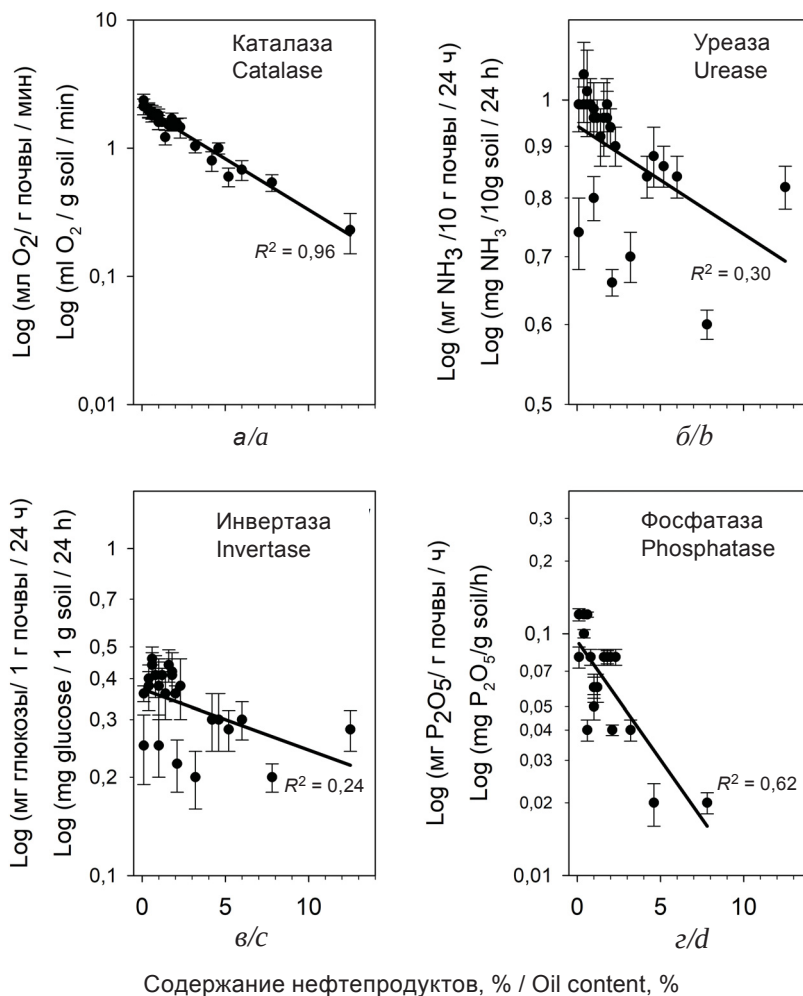


Рис. 2. Корреляционная зависимость между концентрацией нефтепродуктов и активностью ферментов (а – каталазы, б – уреазы, в – инвертазы и г – фосфатазы) в почвах месторождений в полулогарифмической системе координат

Fig. 2. Correlation between the concentration of petroleum products and the activity of enzymes (a – catalase, b – urease, c – invertase, d – phosphatase) in the soils of the oil fields in a semilogarithmic coordinate system

В работе Л. К. Каримуллина и А. М. Петрова показано то, что активность уреазы при загрязнении нефтью практически не изменяется, а ее вариация определяется как типом почв, так и остаточным содержанием в них нефтепродуктов [26]. В работе Е. И. Новоселовой и соавторов установлено увеличение активности уреазы при загрязнении товарной нефтью от 0,39 до 1,24 мг NH_3 при концентрации нефти 25 л/м². Активность инвертазы при нефтяном загрязнении находится на уровне контрольных значений независимо от уровня загрязнения [27].

В настоящем исследовании изменения активностей уреазы и инвертазы в почвах следующие: при относительно низких кон-

центрациях нефтепродуктов (до 2%) в почвах активности этих почвенных ферментов увеличиваются, при высоких концентрациях (более 2%) активности ингибируются. Фоновые показатели данных ферментов следующие: уреазы – 0,99 мг NH_3 10 г / 24 ч; инвертазы – 0,36 мг глюкозы на 1 г почвы за 24 ч. При максимальной концентрации нефти в 12,5% в почвах активность уреазы снижается до 0,82 мг NH_3 10 г / 24 ч, а активность инвертазы снижается до 0,28 мг глюкозы на 1 г почвы за 24 ч. У законсервированных скважин активность данных ферментов превышает фоновые показатели и составляет соответственно 1,06 мг NH_3 10 г / 24 ч и 0,40 мг глюкозы на



1 г почвы за 24 ч. Между содержанием в почвах нефтепродуктов и активностями уреазы и инвертазы не прослеживается высокой степени корреляции, поэтому мы считаем, что данные показатели не информативны и не подходят для мониторинга аридных территорий, подверженных загрязнению нефтью и нефтепродуктами (см. рис. 2 б, в).

Фоновые почвы характеризуются относительно невысокой активностью фосфатазы 0,12 мг P_2O_5 на 1 г почвы за 1 ч. Фосфатазная активность при нефтяном загрязнении снижается, стоит отметить, что при высоких концентрациях нефти в почве фосфатазная активность снижается до нулевых значений, исключением являются почвы у скважины под № 131 – где содержание нефти составляет 1%, однако фосфатазная активность ингибируется полностью, что, скорее всего, связано с загрязнением почв пластовыми и буровыми водами. Активность фосфатазы в почвах законсервированных скважин находится на уровне фоновых значений. Степень корреляции между содержанием в почвах нефтепродуктов и активностью фосфатазы $r = -0,62$ (см. рис. 2, з).

И. А. Павловым и А. С. Цепляевой проведено исследование фитотоксических свойств нефтезагрязненных светло-каштановых и бурых почв Волгоградской области. В результате на всех типах исследуемых почв отмечался эффект торможения роста стебля и корней салата, редиса и яровой пшеницы, установлено, что степень угнетения зависит от их индивидуальных особенностей и типов почв. Для всех исследуемых растений можно отметить, что высокие концентрации нефти и нефтепродуктов задерживают фазы прорастания и развития растений [28].

А. А. Околеловой и соавторами доказано, что фитотоксичность светло-каштановой почвы Волгоградской области зависит от уровня загрязнения нефтепродуктами. Авторами проведен лабораторный эксперимент с почвами ООО «ЛУКОЙЛ-Волгограднефтепереработка» с целью установления их фитотоксических свойств, в качестве тест-растения использован редис. В результате проведенного исследования установлено, что на почвах санитарной зоны ООО «ЛУКОЙЛ-Волгограднефтепереработка», всхожесть семян редиса при концентрации нефти 146,4 мг/кг в 2,5 раза ниже, чем на фоновых светло-каштановых почвах, а при концентрации загрязнения 347 мг/кг всхожесть семян редиса снижается до 1% [18].

Общеизвестно, что нефтяное загрязнение почвы приводит к снижению всхожести, уменьшению длины корней и побегов, а также общей фитомассы тест-растений. Однако для расчета ИПБС необходимы данные показатели.

Фитотоксические свойства почв нефтепромыслов Калмыкии при загрязнении нефтью и нефтепродуктами не столь очевидны. Так, при низких концентрациях нефтяное загрязнение может даже стимулировать длину корней такого растения, как редис (*Raphanus sativus* L.). В исследуемых почвах происходит снижение всхожести в зависимости от концентрации поллютанта. Так, концентрация нефтепродуктов 12,5% в почвах привела к гибели семян редиса. На почвах законсервированных скважин всхожесть и показатели роста редиса находятся на уровне контрольных значений (прил. 2). Зависимость снижения всхожести от концентрации нефтепродуктов очень высокая и составляет в среднем $r = -0,90$ (рис. 3, а).

Установлена высокая корреляционная зависимость между концентрацией нефтепродуктов и длиной побегов и корней редиса ($r = -0,81$ и $r = -0,80$) (см. рис. 3, б, в). Нефтепродукты приводят к торможению роста и развития редиса, высокие концентрации поллютанта в почве приводят к уменьшению длины побегов и корней в 5 раз по сравнению с фоновыми значениями. Важным параметром оценки токсичности загрязненных почв является фитомасса растений, т. е. продуктивность почв. В настоящем исследовании доказано, что нефтепродукты в почвах существенно снижают фитомассу тест-растений (см. рис. 3, з).

С. И. Колесников с соавторами предполагает, что значительного нарушения экологических свойств почвы не происходит до тех пор, пока значение ИПБС не снизится более чем на 10%.

Результаты изменения показателя ИПБС в нефтезагрязненных почвах показаны на рис. 4. Установлено, что существенное снижение ИПБС (более чем на 10%) происходило в загрязненных почвах уже при минимальном уровне загрязнения 0,6%. При максимальной дозе нефтепродуктов 12,5% ИПБС сокращается до 21% по сравнению с контролем. ИПБС почв у законсервированных скважин находится на уровне фоновых значений (табл. 2).

Таким образом, установлено, что концентрация нефти даже 0,6% вызывает снижение

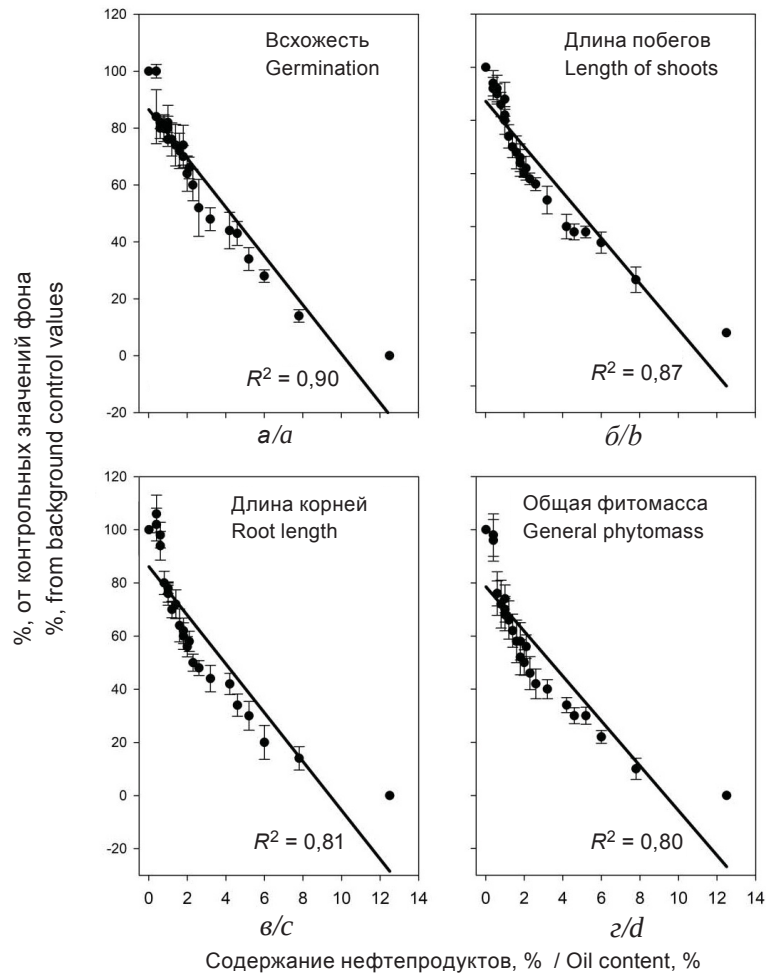


Рис. 3. Корреляционная зависимость между концентрацией нефтепродуктов и ростом и развитием редиса обыкновенного (*a* – всхожесть, *b* – длина побегов, *v* – длина корней, *z* – общая фитомасса) на почвах месторождений
Fig. 3. Correlation between the concentration of oil products and the growth and development of radish (*a* – germination, *b* – shoot length, *v* – root length, *z* – general phytomass) on the soils of oil fields

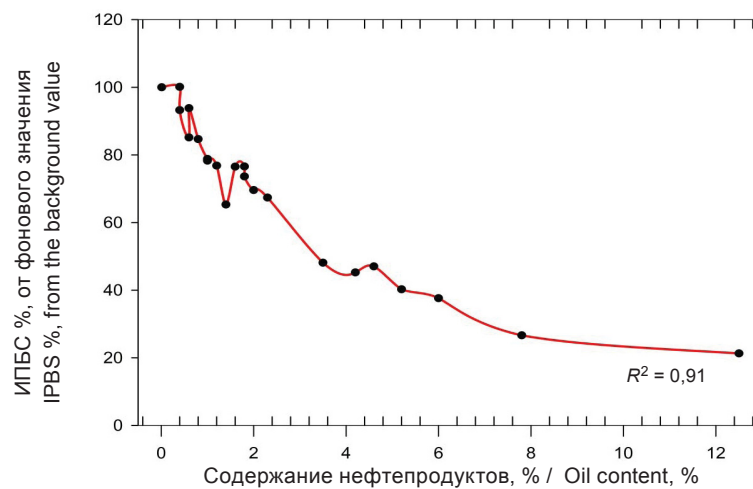


Рис. 4. Изменение интегрального показателя биологического состояния почвы при нефтяном загрязнении
Fig. 4. Changes in the integral indicator of the biological state of the soil in case of oil pollution



Таблица 2 / Table 2

Снижение интегрального показателя биологических свойств почв нефтепромыслов
Decrease in the integral index of biological properties of oil field soils

Место отбора / Sampling location	Нефтепродукты, % / Content of oil products, %	ИПБС, % / Integral indicator of the biological state of soils
Фон / Control	0,01	100,00*
У скважины № 132 / Well No. 132	0,40	100,11*
У скважины № 52 / Well No. 52	0,60	93,82*
У скважины № 4 / Well No. 4	0,40	93,24*
У скважины № 126 / Well No. 126	0,60	85,17**
У скважины № 125 / Well No. 125	0,80	84,67**
У скважины № 150 / Well No. 150	1,00	78,80**
У скважины № 42 / Well No. 42	1,00	78,29**
У скважины № 137 / Well No. 137	1,20	76,83**
У скважины № 135 / Well No. 135	1,80	76,57**
У скважины № 127 / Well No. 127	1,60	76,53**
Без номера 2 / Well without a number	1,80	73,62***
У скважины № 133 / Well No. 133	2,00	69,60***
У скважины № 37 / Well No. 37	2,30	67,37***
У скважины № 131 / Well No. 131	1,40	65,32***
У скважины № 17 / Well No. 17	3,20	48,12***
У скважины № 146 / Well No. 146	4,60	47,03***
У скважины № 145 / Well No. 145	4,20	45,26***
Без номера 1 / Well without a number	5,20	40,25***
У скважины № 143 / Well No. 143	6,00	37,62***
У нефтепровода / At the oil pipeline	7,80	26,63***
Под нефтяным разливом / Under an oil spill	12,50	21,29***

Примечание. Доза загрязнения: * – безопасная, ** – умеренно опасная, *** – высокая.
 Note. Dose of pollution: * – safe, ** – moderately dangerous, *** – high degree.

ИПБС почвы более, чем на 10%. Концентрация нефти 3% вызывает снижение ИПБС более, чем на 40%. Сокращение ИПБС на 50% зарегистрировано при загрязнении нефтью почвы в концентрации 7,8%, более чем на 70% – при концентрации нефтепродуктов в почве 12,5%.

Заключение

Исследование нефтепромыслов, расположенных на ООПТ показало, что почвы нефтепромыслов подвергаются значительной антропогенной нагрузке. Часть почвенных образцов имеет повышенное содержание неф-

тепродуктов и пониженную ферментативную активность. Активности каталазы и фосфатазы можно использовать как индикаторы нефтяного загрязнения почв аридных территорий.

Наиболее информативными показателями влияния нефтепродуктов на биологические свойства почв являются их фитотоксические свойства по отношению к тест-растениям. Интегральный показатель биологического состояния почв нефтепромыслов снижается в зависимости от уровня загрязнения, и практически все почвы нефтепромыслов характеризуются значительным нарушением экологических свойств.



Содержание нефтепродуктов и активность почвенных ферментов в почвах месторождений
Content of oil products and activity of soil enzymes in soils of oil fields

Место отбора / sampling location	Нефте-продукты, % / Content of oil products, %	Активность каталазы, мл O ₂ на 1 г почвы за 1 мин / Catalase activity, ml O ₂ per 1 g of soil in 1 minute	Активность уреазы, мг NH ₃ на 10 г почвы за 24 ч / Urease activity, mg NH ₃ per 10 g of soil in 24 hours	Активность инвертазы, мг глюкозы на 1 г почвы за 24 ч / Invertase activity, mg of glucose per 1 g of soil in 24 hours	Активность фосфатазы, мг P ₂ O ₅ на 1 г почвы за 1 ч / Phosphatase activity, mg P ₂ O ₅ per 1 g of soil for 1 hour
У скважины № 132 / Well No. 132	0,40	2,00	1,06	0,40	0,12
У скважины № 4 / Well No. 4	0,40	1,96	0,99	0,38	0,10
У скважины № 126 / Well No. 126	0,60	1,80	0,99	0,46	0,12
У скважины № 52 / Well No. 52	0,60	1,92	1,02	0,44	0,10
У скважины № 125 / Well No. 125	0,80	1,86	0,99	0,41	0,08
У скважины № 150 / Well No. 150	1,00	1,65	0,96	0,38	0,06
У скважины № 42 / Well No. 42	1,00	1,60	0,98	0,38	0,06
У скважины без № / Well without a number	1,00	1,82	0,80	0,25	0,05
У скважины № 137 / Well No. 137	1,20	1,60	0,96	0,41	0,06
У скважины № 131 / Well No. 131	1,40	1,22	0,92	0,36	0,00
У скважины № 127 / Well No. 1127	1,60	1,52	0,96	0,44	0,08
У скважины № 135 / Well No. 132	1,80	1,70	0,99	0,41	0,08
Без номера 2 / Well without a number	1,80	1,48	0,96	0,42	0,08
У скважины № 133 / Well No. 133	2,00	1,54	0,94	0,36	0,08
У скважины № 20 / Well No. 20	2,10	1,56	0,66	0,22	0,04
У скважины № 37 / Well No. 37	2,30	1,46	0,90	0,38	0,08
У скважины № 17 / Well No. 17	3,20	1,04	0,70	0,20	0,04
У скважины № 145 / Well No. 145	4,20	0,80	0,84	0,30	0,00
У скважины № 146 / Well No. 146	4,60	1,00	0,88	0,30	0,02
Без номера 1 / Well without a number	5,20	0,60	0,86	0,28	0,00
У скважины № 143 / Well No. 143	6,00	0,68	0,84	0,30	0,00
У нефтепровода / At the oil pipeline	7,80	0,54	0,60	0,20	0,02
Под нефтяным разливом / under an oil spill	12,50	0,23	0,82	0,28	0,00
Фон / Control	0,01	2,36	0,99	0,36	0,12



Показатели роста и развития редиса на почвах нефтепромыслов
Indicators of growth and development of radish on the soils of oil fields

Место отбора / Sampling location	Нефтепродукты, % / Content of oil products, %	Всхожесть, % / Germination, %	Длина побегов, % / Shoot length, %	Длина корней, % / Root length, %	Общая фитомасса, % / General phytomass, %
У скважины № 132 / Well No. 132	0,40	100	100	100	100
У скважины № 4 / Well No. 4	0,40	84	94	106	98
У скважины № 126 / Well No. 126	0,60	80	92	102	96
У скважины № 52 / Well No. 52	0,60	82	90	98	76
У скважины № 125 / Well No. 125	0,80	80	92	94	76
У скважины № 150 / Well No. 150	1,00	82	86	80	72
У скважины № 42 / Well No. 42	1,00	76	80	76	70
У скважины без № / Well without a number	1,00	80	88	76	74
У скважины № 137 / Well No. 137	1,20	76	82	78	68
У скважины № 131 / Well No. 131	1,40	74	74	70	66
У скважины № 127 / Well No. 1127	1,60	72	70	72	62
У скважины № 135 / Well No. 132	1,80	74	68	64	58
Без номера 2 / Well without a number	1,80	70	66	62	58
У скважины № 133 / Well No. 133	2,00	64	64	60	52
У скважины № 20 / Well No. 20	2,10	66	62	58	56
У скважины № 37 / Well No. 37	2,30	60	60	56	50
У скважины № 17 / Well No. 17	3,20	48	50	44	40
У скважины № 145 / Well No. 145	4,20	44	40	42	34
У скважины № 146 / Well No. 146	4,60	43	38	34	30
Без номера 1 / Well without a number	5,20	34	38	30	30
У скважины № 143 / Well No. 143	6,00	28	34	20	22
У нефтепровода / at the oil pipeline	7,80	14	20	14	10
Под нефтяным разливом / under an oil spill	12,50	0	0	0	0
Фон / Control	0,01	100	100	100	100



Список литературы

1. Республика Калмыкия. Статистический ежегодник. 2021 : статистический сборник / Астраханьстат. Элиста : Б. и., 2021. 164 с.
2. Волгоградская область в цифрах. 2021 : краткий сборник / Волгоградстат. Волгоград : Б. и., 2021. 384 с.
3. Ставропольский край в цифрах. 2021 : краткий статистический сборник / Северо-Кавказстат. Ставрополь : Б. и., 2021. 88 с.
4. Чеченская республика в цифрах. 2021 : краткий статистический сборник / Чеченстат. Грозный : Б. и., 2021. 156 с.
5. Республика Дагестан в цифрах. 2021: краткий статистический сборник / Дагестанстат. Махачкала : Б. и., 2021. 468 с.
6. Булуктаев А. А. Аварийный разлив нефти на территории Тенгутинского нефтегазового месторождения, расположенного в пределах заповедника «Черные земли» // Russian Journal of Ecosystem Ecology. 2022. № 3. С. 43–51. <https://doi.org/10.21685/2500-0578-2022-3-4>
7. Гилязов М. Ю. Изменение некоторых агрофизических свойств выщелоченного чернозема при загрязнении товарной нефтью в условиях Татарстана // Почвоведение. 2002. № 12. С. 1515–1519.
8. Солнцева Н. П., Пиковский Ю. И. Особенности загрязнения почв при нефтедобыче // Миграция загрязняющих веществ в почвах и сопредельных средах. Л. : Гидрометеиздат, 1980. С. 76–95.
9. Хазиев Ф. Х., Фатхиев Ф. Ф. Изменение биохимических процессов в почвах при нефтяном загрязнении и активации разложения нефти // Агрехимия. 1981. № 10. С. 102–111.
10. Гайнутдинов М. З., Храмов И. Т., Гилязов М. Ю. Загрязнение почв нефтепромысловыми сточными водами // Химия в сельском хозяйстве. 1985. № 3. С. 68–71.
11. Сангаджиева Л. Х., Сангаджиева О. С., Даваева Ц. Д., Манджиев В. У. Мониторинг загрязнения окружающей среды в Республике Калмыкия // Актуальные проблемы экологии и охраны окружающей среды: тезисы докл. Всерос. конф. молодых ученых и студентов (г. Уфа, 18–22 октября 2004 г.). Уфа : Башкирский госуниверситет, 2004. С. 99–101.
12. Демидиенко А. Я., Демурджан В. М. Пути восстановления плодородия нефтезагрязненных почв черноземной зоны Украины // Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем. М. : Наука, 1988. С. 197–206.
13. Васильева Г. К., Стрижакова Е. Р., Бочарникова Е. А., Семенюк Н. Н., Яценко В. С., Слюсаревский А. В., Барышникова Е. А. Нефть и нефтепродукты как загрязнители почв. Технология комбинированной физико-биологической очистки загрязненных почв // Российский химический журнал. 2013. Т. 57, № 1. С. 79–104.
14. Воеводина Т. С., Русанов А. М., Васильченко А. В. Влияние нефти на химические свойства чернозема обыкновенного южного Предуралья // Вестник Оренбургского государственного университета. 2015. № 10 (185). С. 157–161.
15. Киракосян Д. В., Молчанова Я. П. Анализ первых последствий нефтяного разлива в Норильске // Успехи в химии и химической технологии. 2021. № 2. С. 43–46.
16. Киреева Н. А., Митрофанова А. М., Кузьяматов Г. Г. Влияние загрязнения нефтью на фитотоксичность серой лесной почвы // Агрехимия. 2001. № 5. С. 64–69.
17. Колесников С. И., Татлок Р. К., Тлехас З. Р. Влияние загрязнения нефтью, мазутом, бензином и дизельным топливом на биологические свойства дерново-карбонатных почв Западного Кавказа // Новые технологии. 2012. № 2. С. 97–101.
18. Околелова А. А., Мерзлякова А. С., Герман Н. В. Фитотоксичность нефтезагрязненных почв // Естественно-гуманитарные исследования. 2014. № 1 (3). С. 26–31.
19. Miralles I., Domingo F., Cantón Y., Trasar-Cepeda C., Leirós M.C., Gil-Sotres F. Hydrolase enzyme activities in a successional gradient of biological soil crusts in arid and semi-arid zones // Soil Biology and Biochemistry. 2012. Vol. 53. P. 124–132.
20. Ansari N., Hassanshahian M., Ravan H. Study the microbial communities' changes in desert and farmland soil after crude oil pollution // International Journal of Environmental Research. 2018. Vol. 12, iss. 3. P. 391–398. <https://doi.org/10.1007/s41742-018-0099-6>
21. Błońska E., Lasota J., Szuszkiewicz M., Łukasik A., Klamerus-Iwan A. Assessment of forest soil contamination in Krakow surroundings in relation to the type of stand // Environmental Earth Sciences. 2016. Vol. 75. P. 1205. <https://doi.org/10.1007/s12665-016-6005-7>
22. Chukwuma C. C., Monanu M. O., Ikewuchi J. C., Ekeke C. Variance in protease, dehydrogenase, phosphatase and respiratory activities during phytoremediation of crude oil polluted agricultural soil using *Schwenkia americana* L. and *Spermacoce ocyroides* Burm f. // Annual Research & Review in Biology. 2018. Vol. 28, № 6. P. 1–9. <https://doi.org/10.9734/ARRB/2018/44122>
23. Колесников С. И., Казеев К. Ш., Вальков В. Ф. Биологические принципы мониторинга и нормирования загрязнения. Ростов н/Д : Центры валеологии вузов России, 2001. 64 с.
24. Хазиев Ф. Х. Экологические связи ферментативной активности почв // Экобиотех. 2018. Т. 1, № 2. С. 80–92.
25. Колесников С. И., Азнаурьян Д. К., Казеев К. Ш., Вальков В. Ф. Устойчивость биологических свойств почв Юга России к нефтяному загрязнению // Экология. 2010. № 5. С. 357–364.
26. Каримуллин Л. К., Петров А. М. Биологическая активность и фитотоксичность почв, содержащих нефтяное загрязнение // Журнал экологии и промышленной безопасности. 2013. № 3. С. 65–66.



27. Новоселова Е. И., Киреева Н. А., Гарипова М. И. Роль ферментативной активности почв в осуществлении ею трофической функции в условиях нефтяного загрязнения // Вестник Башкирского университета. 2014. Т. 19, № 2. С. 474–479.
28. Павлов И. А., Цепляева А. С. Влияние загрязнения нефтью на рост и развитие сельскохозяйственных культур // Наука и молодежь: новые идеи и решения в АПК : материалы Всерос. науч.-метод. конф. с междунар. участием. Т. 1. Иваново : ФГБОУ ВПО Ивановская ГСХА им. акад. Д. К. Беляева, 2018. 242 с.

References

1. *Respublika Kalmykia. Statisticheskii ezhegodnik. 2021: statisticheskii sbornik* [Republic of Kalmykia. Statistical Yearbook. 2021. Astrakhanstat]. Elista, 2021. 164 p. (in Russian).
2. *Volgogradskaya oblast' v tsifrakh. 2021: kratkii sbornik* [Volgograd region in numbers. 2021: Short statistical collection. Volgogradstat]. Volgograd, 2021. 384 p. (in Russian).
3. *Stavropol'skii krai v tsifrakh. 2021: kratkii statisticheskii sbornik* [Stavropol Territory in numbers. 2021: Short statistical collection. Severo-Kavkazstat]. Stavropol', 2021. p. (in Russian).
4. *Chechenskaia respublika v tsifrakh. 2021: kratkii statisticheskii sbornik* [Chechen Republic in numbers. 2021: Short statistical collection. Chechenstat]. Grozny, 2021. 156 p. (in Russian).
5. *Respublika Dagestan v tsifrakh. 2021: kratkii statisticheskii sbornik* [Republic of Dagestan in numbers. 2021: Short statistical collection. Dagestanstat]. Makhachkala, 2021. 468 p. (in Russian).
6. Buluktaev A. A. Tengutinsky oil and gas field: exploring one emergency oil spill in the Chyornye Zemli Nature Reserve. *Russian Journal of Ecosystem Ecology*, 2022, no. 3, pp. 43–51 (in Russian). <https://doi.org/10.21685/2500-0578-2022-3-4>
7. Gilyazov M. Yu. Changes in agrophysical properties of leached chernozem upon its contamination by commercial oil in the Republic of Tatarstan. *Eurasian Soil Science*, 2002, no. 12, pp. 1515–1519 (in Russian).
8. Solntseva N. P., Pikovsky Yu. I. Features of soil pollution during oil production. In: *Migratsiya zagryaznyashchikh veshchestv v pochvakh i sopredel'nykh sredakh* [Migration of pollutants in soils and adjacent environments]. Leningrad, Gidrometeoizdat, 1980, pp. 76–95 (in Russian).
9. Khaziev F. Kh., Fatkhiev F. F. Changes in biochemical processes in soils under oil pollution and activation of oil decomposition. *Agrochemistry*, 1981, no. 10, pp. 102–111 (in Russian).
10. Gainutdinov M. Z., Khramov I. T., Gilyazov M. Yu. Soil pollution by oilfield wastewater. *Chemistry in Agriculture*, 1985, no. 3, pp. 68–71 (in Russian).
11. Sangadzhieva L. Kh., Sangadzhieva O. S., Davayeva Ts. D., Mandzhiev V. U. Monitoring of environmental pollution in the Republic of Kalmykia. In: *Aktual'nye problemy ekologii i okhrany okruzhaiushchei sredy: tezisy dokl. Vseros. konf. molodykh uchenykh i studentov* [Actual problems of ecology and environmental protection: Abstracts of reports. All-Rus. conf. young scientists and students]. Ufa, Bashkir State University Publ., 2004, pp. 99–101 (in Russian).
12. Demidienko A. Ya., Demurdzhan V. M. Ways to restore the fertility of oil-contaminated soils of the chernozem zone of Ukraine. In: *Vosstanovlenie neftezagryaznennykh pochvennykh ekosistem* [Restoration of oil-contaminated soil ecosystems]. Moscow, Nauka, 1988, pp. 197–206 (in Russian).
13. Vasilyeva G. K., Strizhakova E. R., Bocharnikova E. A., Semenyuk N. N., Yatsenko V. S., Slyusarevsky A. V., Baryshnikova E. A. Oil and oil products as soil pollutants. Technology of combined physico-biological treatment of polluted soils. *Russian Chemical Journal*, 2013, vol. 57, no. 1, pp. 79–104 (in Russian).
14. Voevodina T. S., Rusanov A. M., Vasilchenko A. V. Influence of oil on the chemical properties of ordinary chernozem in the southern Cis-Urals. *Bulletin of the Orenburg State University*, 2015, no. 10 (185), pp. 157–161 (in Russian).
15. Kirakosyan D. V., Molchanova Ya. P. Analysis of first consequences of the oil spill in Norilsk. *Advances in Chemistry and Chemical Technology*, 2021, no. 2, pp. 43–46 (in Russian).
16. Kireeva N. A., Mitrofanova A. M., Kuzyakhmetov G. G. Influence of oil pollution on the phytotoxicity of gray forest soil. *Agrochemistry*, 2001, no. 5, pp. 64–69 (in Russian).
17. Kolesnikov S. I., Tatlok R. K., Tlekhas Z. R. Influence of pollution by oil, fuel oil, gasoline and diesel fuel on the biological properties of soddy-calcareous soils of the Western Caucasus. *New Technologies*, 2012, no. 2, pp. 97–101 (in Russian).
18. Okolelova A. A., Merzlyakova A. S., German N. V. Phytotoxicity of oil-contaminated soils. *Natural-humanitarian Research*, 2014, no. 1 (3), pp. 26–31 (in Russian).
19. Miralles I., Domingo F., Cantón Y., Trasar-Cepeda C., Leirós M. C., Gil-Sotres F. Hydrolase enzyme activities in a successional gradient of biological soil crusts in arid and semi-arid zones. *Soil Biology and Biochemistry*, 2012, no. 53, pp. 124–132.
20. Ansari N., Hassanshahian M., Ravan H. Study the microbial communities' changes in desert and farmland soil after crude oil pollution. *International Journal of Environmental Research*, 2018, no. 12, pp. 391–398. <https://doi.org/10.1007/s41742-018-0099-6>
21. Błońska E., Lasota J., Szuszkiewicz M., Łukasik A., Klamerus-Iwan A. Assessment of forest soil contamination in Krakow surroundings in relation to the type of stand. *Environmental Earth Sciences*, 2016, no. 75, pp. 1205. <https://doi.org/10.1007/s12665-016-6005-7>



22. Chukwuma C. C., Monanu M. O., Ikwuchi J. C., Ekeke C. Variance in protease, dehydrogenase, phosphatase and respiratory activities during phytoremediation of crude oil polluted agricultural soil using *Schwenkia americana* L. and *Spermacoce ocyroides* Burm f. *Annual Research & Review in Biology*, 2018, vol. 28, no. 6, pp. 1–9. <https://doi.org/10.9734/ARRB/2018/44122>
23. Kolesnikov S. I., Kazeev K. Sh., Valkov V. F. *Biologicheskie printsipy monitoringa i normirovaniya zagryazneniya* [Bioecological principles of monitoring and normalization (rate setting) of contamination of soils by heavy metals]. Rostov-on-Don, Centers of Valeology of Russian Universities Publ., 2001. 64 p. (in Russian).
24. Khaziev F. Kh. Ecological connections of soil enzymatic activity. *Ecobiotech.*, 2018, vol. 1, no. 2, pp. 80–92 (in Russian).
25. Kolesnikov S. I., Aznaur'ian D. K., Kazeev K. Sh., Val'kov V. F. Sustainability of biological properties of soils in the South of Russia to oil pollution. *Ecology*, 2010, no. 5, pp. 357–364 (in Russian).
26. Karimullin L. K., Petrov A. M. Biological activity and phytotoxicity of soils containing oil pollution. *Journal of Ecology and Industrial Safety*, 2013, no. 3, pp. 65–66 (in Russian).
27. Novoselova E. I., Kireeva N. A., Garipova M. I. Role of enzymatic activity of soils in the discharge of the trophic function in oil pollution. *Bulletin of the Bashkir University*, 2014, vol. 19, no. 2, pp. 474–479 (in Russian).
28. Pavlov I. A., Tsepliaeva A.S. Influence of oil pollution on the growth and development of agricultural crops. In: *Nauka i molodezh': novye idei i resheniia v APK: materialy Vseros. nauch.-metod. konf. s mezhdunarodnym uchastiem* [Science and youth: New ideas and solutions in the agro-industrial complex. Materials of All-Russian scientific method. conf. with international participation]. Ivanovo, FGBOU VPO Ivanovo State Agricultural Academy named after acad. D. K. Belyaeva Publ., 2018. 242 p. (in Russian).

Поступила в редакцию 14.04.2023; одобрена после рецензирования 01.05.2023; принята к публикации 01.07.2023
The article was submitted 14.04.2023; approved after reviewing 01.05.2023; accepted for publication 01.07.2023



Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 4. С. 461–471
Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology, 2023, vol. 23, iss. 4, pp. 461–471
<https://ichbe.sgu.ru> <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-4-461-471>, EDN: YEIHNQ

Научная статья
УДК 595.771

Цитогенетическая характеристика видов рода *Chironomus* группы “*plumosus*” (Diptera, Chironomidae) природно-территориальных комплексов Уральского региона



Т. Н. Филинкова

Уральский государственный педагогический университет, Россия, 620017, г. Екатеринбург, пр. Космонавтов, д. 26

Филинкова Татьяна Николаевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры биологии, химии, экологии и методики их преподавания, filink_57@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0003-2819-8143>

Аннотация. Изучены политенные хромосомы клеток слюнных желез личинок *Ch. plumosus* L. 1758, *Ch. entis* Shobanov 1989, *Ch. borokensis* Kerkis et al. 1988 и *Ch. curabilis* Beljanina et al. 1990 из 20 водоемов шести природно-территориальных комплексов уральского региона. На основе цитотаксономического исследования установлено, что природные комплексы отличаются между собой видовым составом группы “*plumosus*”, соотношением (в %) между видами, теми или иными параметрами цитогенетической изменчивости *Ch. plumosus*, *Ch. entis* и *Ch. borokensis*. Обнаружена достоверно более низкая частота встречаемости последовательности хромосомных дисков pluA1.2 в пределах Уральской равнинно-горной страны (Западный предгорный и Среднеуральский низкогорный районы) по сравнению с природными комплексами на восточных склонах Южного Урала и Западно-Сибирской равнины на стыке с Уральским горным хребтом. Популяции *Ch. plumosus* Уральской равнинно-горной страны имеют между собой более низкие цитогенетические расстояния по сравнению с популяциями *Ch. plumosus* на восточных склонах Южного Урала и Западно-Сибирской равнины на стыке с Уральским горным хребтом. Относительно *Ch. entis* данные территории отличаются между собой отсутствием в пределах Уральской равнинно-горной страны последовательности хромосомных дисков entA1.2. По цитогенетическим расстояниям популяции *Ch. entis* на восточных склонах Южного Урала и Западно-Сибирской равнинной страны на стыке с Уральским горным хребтом отличаются в большую сторону от популяции *Ch. entis* Уральской равнинно-горной страны, чем между собой. В направлении север – юг следует указать на достоверно более низкую частоту встречаемости последовательности хромосомных дисков borB1.2 в пределах Уральской равнинно-горной страны (Восточный подгорный район) относительно природного комплекса с более южным местоположением в пределах Западно-Сибирской равнинной страны (Туринский равнинный район). Для *Ch. borokensis* впервые подсчитаны межпопуляционные цитогенетические расстояния (0.0128 ± 0.0017), отличающиеся по данному показателю между природными комплексами Уральского региона не установлены.

Ключевые слова: род *Chironomus*, группа “*plumosus*”, цитогенетическая изменчивость, природно-территориальные комплексы

Для цитирования: Филинкова Т. Н. Цитогенетическая характеристика видов рода *Chironomus* группы “*plumosus*” (Diptera, Chironomidae) природно-территориальных комплексов Уральского региона // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 4. С. 461–471. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-4-461-471>, EDN: YEIHNQ

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

Article

Cytogenetic characteristics of species of the genus *Chironomus* of the group “*plumosus*” (Diptera, Chironomidae) in natural-territorial complexes of the Ural region

T. N. Filinkova

Urals State Pedagogical University, 26 Kosmonavtov Ave., Ekaterinburg 620017, Russia

Tatiana N. Filinkova, filink_57@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0003-2819-8143>

Abstract. The polytene chromosomes of the cells of the salivary glands of the larvae of *Ch. plumosus* L. 1758, *Ch. entis* Shobanov 1989, *Ch. borokensis* Kerkis et al. 1988 and *Ch. curabilis* Beljanina et al. 1990 from 20 reservoirs of six natural-territorial complexes of the Ural region were studied. On the basis of a cytotaxonomic study, it was established that natural complexes differ from each other in the species composition of the “*plumosus*” group, the ratio (in %) between species and, certain parameters of cytogenetic variability of *Ch. plumosus*, *Ch. entis* and *Ch. borokensis*. Comparative analysis revealed differences between groups of natural complexes. A significantly lower frequency of occurrence of sequence of chromosome disks pluA1.2 was found within the Ural plain-mountainous country (Western foothill and Middle Ural low-mountain regions) compared with natural complexes on the eastern slopes of the Southern Urals and the West Siberian Plain at the junction with the Ural mountain range. Populations of *Ch. plumosus* of the Ural plain-mountainous country have lower cytogenetic distances between themselves compared to populations of *Ch. plumosus* on



the eastern slopes of the Southern Urals and the West Siberian Plain at the junction with the Ural Mountain Range. With respect to *Ch. entis*, these territories differ from each other in the absence of sequence of chromosome disks entA1.2 within the Ural plain-mountain country. According to cytogenetic distances, the populations of *Ch. entis* on the eastern slopes of the Southern Urals and the West Siberian Plain country at the junction with the Ural Mountain Range differ more from the population of *Ch. entis* of the Ural plain-mountain country than among themselves. In the north-south direction, it is necessary to indicate a significantly lower frequency of occurrence of sequence of chromosome disks borB1.2 within the Ural plain-mountain country (Eastern Podgorny region) relative to a natural complex with a more southern location within the West Siberian Plain country (Tura Plain region). For *Ch. borokensis* the interpopulation cytogenetic distances were calculated for the first time (0.0128 ± 0.0017). Differences in this indicator between the natural complexes of the Ural region have not been established.

Keywords: genus *Chironomus*, "plumosus" group, cytogenetic variability, natural-territorial complexes

For citation: Filinkova T. N. Cytogenetic characteristics of species of the genus *Chironomus* of the group "plumosus" (Diptera, Chironomidae) in natural-territorial complexes of the Ural region. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2023, vol. 23, iss. 4, pp. 461–471 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-4-461-471>, EDN: YEIHNQ

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

Введение

Закономерности распространения и распределения животных на земной поверхности изучает зоогеография. Относительно хирономид известно, что имеется несколько голарктических видов [1]. Отмечается, что более или менее циркулярное распространение имеют некоторые виды рода *Chironomus* и что Сибирь и Западная Европа близки зоогеографически [2], фауна хирономид горного Алтая отличается от фауны хирономид равнинных районов [3] и имеет большое сходство с фауной Швейцарских Альп и высоких широт [4].

На примере хирономид возможно изучение не только соответствия видов различным природным территориям, но и исследование зоогеографических особенностей их кариотипов [5–19]. Виды цитоконкомплекса *pseudothummi* распространены повсеместно, а виды цитоконкомплекса *thummi* обитают только в Северном полушарии [5]. Кариотипы палеарктических и неарктических видов хирономид, в том числе рода *Chironomus*, сильно различаются по спектру палеарктических, неарктических и голарктических последовательностей хромосомных дисков (ПДХ), что отражает степень их дивергенции [6, 7]. В Палеарктике цитогенетические расстояния у представителей рода *Chironomus* составляют 0.047–0.166, в Неарктике – 0.004–0.022, цитогенетические расстояния между палеарктическими и неарктическими популяциями голарктических видов оказываются значительно выше – 0.699–0.756 [8–11]. Цитогенетический мониторинг сибирских популяций хирономид показал, что для большинства из них характерен более высокий уровень хромосомного полиморфизма, чем для европейских и в особенности неарктических популяций [12]. Высокая степень гетерозиготности популяций хирономид

отмечена для водоемов центра европейской части России и низкая степень гетерозиготности популяций установлена по направлению на юго-восток и север [13, 14]. В кариотипе видов рода *Chironomus* преобладают палеарктические последовательности (в среднем их 62%), при этом палеарктические виды более хромосомно-полиморфны, чем неарктические [15]. Для *Ch. plumosus* детально охарактеризованы географические закономерности цитогенетической дифференциации популяций на Евразийском и Североамериканском континентах [8, 16]. Неарктические популяции *Ch. plumosus* отличаются от палеарктических фиксацией некоторых последовательностей, высокой частотой встречаемости в Неарктике ПДХ pluA9, неарктические популяции оказались менее полиморфными, чем палеарктические по таким показателям, как среднее количество ПДХ в популяциях, среднее число гетерозиготных инверсий (ГИ) на особь и средний процент гетерозиготных личинок в популяции [17]. Межпопуляционные расстояния у *Ch. plumosus* в Палеарктике составляют 0.064 ± 0.003 , а в Неарктике – 0.020 ± 0.003 [18], при этом на примере *Ch. plumosus* сделан вывод об отсутствии связи между географическими и цитогенетическими расстояниями между популяциями [8]. В пределах ареала *Ch. plumosus* в направлении с запада на восток не выявлено клинальной изменчивости ни по частоте инверсионных вариантов в хромосомах, ни по уровню инверсионного полиморфизма, но с юга на север обнаруживается тенденция к замене одних ПДХ на другие, альтернативные, например, A11 на A22 через гетерозиготное состояние [19].

Одним из направлений зоогеографии является изучение закономерностей распределения животных по ландшафтам и зонам, то есть территориям, для которых характерна однородность (или закономерное сочетание) комплекса



взаимосвязанных и взаимодействующих компонентов природы, среди которых выделяют ведущие компоненты (геолого-геоморфологический и климатический) и зависимые от них (вода, почва, растительность и животный мир). Район нашего исследования расположен на стыке двух частей света в пределах Уральского горного хребта, Восточно-Европейской и Западно-Сибирской равнин, при этом Уральские горы с севера на юг пересекают несколько природных зон, а горный рельеф создает различия между западными и восточными склонами. Все вышеперечисленное привело к появлению в Уральском регионе большого разнообразия природно-территориальных комплексов. В данной работе шесть природно-территориальных комплексов (ПТК) Уральского региона сравниваются между собой по видовому составу, соотношению между видами (в %) и параметрам цитогенетической изменчивости видов рода *Chironomus* группы “*plumosus*” – *Ch. plumosus* L. 1758, *Ch. entis* Shobanov 1989, *Ch. borokensis* Kerkis et al. 1988 и *Ch. curabilis* Beljanina et al. 1990. Виды *Ch. plumosus* и *Ch. entis* являются голарктическими, *Ch. borokensis* обнаружен только в водоемах России [17, 20], *Ch. curabilis* – в Саратовской, Брянской областях и в Северной Болгарии [21–23]. Цель сравнительного анализа кариотипов представителей рода *Chironomus* группы “*plumosus*” из водоемов разных природно-территориальных комплексов Уральского региона – обоснование вывода о влиянии географического положения водоемов на цитогенетическую изменчивость исследуемых видов.

Материалы и методы

Изучены политенные хромосомы клеток слюнных желез личинок *Ch. plumosus*, *Ch. entis*, *Ch. borokensis* и *Ch. curabilis* из 20 водоемов Уральского региона с указанием по каждому из видов относительного числа (%) изученных особей в пробах. Изготовление кариологических препаратов производили по этил-орсеиновой методике [24]. Хромосомы картировали по системе Максимовой [25]. При обозначении ПДХ использовали общеизвестную символику: plu – это *Ch. plumosus*, ent – *Ch. entis*, bor – *Ch. borokensis*, буквы (A, B, C, D, E, F) обозначают хромосомные плечи, цифры после буквы указывают вариант ПДХ гомологов. Сравнительный анализ хромосомного и геномного полиморфизма видов группы “*plumosus*” разных природных территорий проводился по целому ряду цитогенетических показателей (табл. 1–3). Цитогенетические

расстояния между популяциями определяли по методу Нея [26]. Для сравнения природных комплексов между собой использовали среднее арифметическое и стандартную ошибку среднего для каждого из цитогенетических показателей. Анализируемые параметры имеют нормальное распределение, поэтому достоверность различий устанавливали при помощи критерия *t* Стьюдента при уровне доверительной вероятности $P = 0.95$. При статистической обработке данных использовали программы Excel.

Результаты и их обсуждение

Согласно картам природных районов и ландшафтов [27–29] изученные нами водоемы находятся в пределах шести природно-территориальных комплексов (рисунок):

1) Уральская равнинно-горная страна Западный предгорный район таежной зоны подзоны южной тайги с южнотаежными, широколиственными-хвойнотаежными ландшафтами темнохвойных лесов и лесостепными (барьерными) ландшафтами возвышенных равнин и увалов на осадочных обломочных породах (условное обозначение природного комплекса УРГС-ЗП, в пределах комплекса исследовано два водоема: 1 – Бакряжский пруд, 08.05.2006 г., 24.09.2006 г.; 2 – пруд на территории пос. Бисерт, 15.02.2007 г.);

2) Уральская равнинно-горная страна Среднеуральский низкогорный район таежной зоны подзоны южной тайги с таежными ландшафтами горных хребтов, увалов и кражей на метаморфических и интрузивных породах (УРГС-СН, 1 – оз. Таватуй, 06.03.1989 г., 16.06.1989 г.; 2 – оз. Шарташ, 05.04.1988 г.; 3 – Верх-Исетский пруд, 20.02.1989 г.; 4 – Волчихинское в-ще, 13.03.1989 г., 23.05.1989 г., 30.09.1989 г.);

3) Уральская равнинно-горная страна Восточный подгорный район таежной зоны подзоны средней тайги с таежными ландшафтами светлохвойных лесов цокольных равнин и увалов на метаморфических и интрузивных породах Северного Урала (УРГС-ВП, 1 – Осиновская старица, 28.09.2008 г.; 2 – карстовая впадина, 08.08.2009 г.; 3 – временный водоем, 05.11.2009 г.);

4) Западно-Сибирская равнинная страна Туринский равнинный район таежной зоны подзоны средней тайги с таежными ландшафтами пологоувалистых полигенетических равнин и болотными ландшафтами (ЗСРС-ТР, 1 – пруд Юконка, 01.04.2007 г., 05.02.2008 г.; 2 – карьер, 03.05.2008 г.; 3 – пруд Кряква, 23.11.2008 г.; 4 – р. Тура, 02.04.2008 г.);

Таблица 1 / Table 1
Цитогенетические показатели *Ch. plumosus*, *Ch. entis* и *Ch. borokensis* природно-территориальных комплексов Уральского региона
Cytogenetic parameters of *Ch. plumosus*, *Ch. entis* and *Ch. borokensis* natural-territorial complexes (NTC) of the Ural region

Цитогенетические показатели / Cytogenetic indicators		ПТК (1, 2, 3, 4, 5 – водоемы, их названия указаны в тексте; р, е, b – количество изученных личинок <i>Ch. plumosus</i> , <i>Ch. entis</i> и <i>Ch. borokensis</i> ; прочерк означает, что вид в водоемах ПТК не обнаружен) / NTC (1, 2, 3, 4, 5 – reservoirs, their names are indicated in the text; p, e, b – the number of studied larvae of <i>Ch. plumosus</i> , <i>Ch. entis</i> and <i>Ch. borokensis</i> ; a dash means that the species has not been found in the reservoirs of NTC).					
		УРГС-3П / URGC-ZP 1: 67р, 2e 2: 90р, 8e	УРГС-СН / URGC-CN 1: 35р 2: 33р 3: 22р 4: 23р	УРГС-ВП / URGC-VP 1: 30б 2: 45б 3: 43б	ЗСРС-ТР / ZCRC-TR 1: 79р, 16б 2: 12р, 12б 3: 5р, 29б 4: 12р, 1б	ВСЮУ-ЗСРС / VCYUU-ZCRC 1: 93р, 10e 2: 50р, 18e 3: 51р, 17e, 1b 4: 134р, 30e 5: 71р, 26e	ЗСРС-ЮЗС / ZCRC-YUZC 1: 66р, 98e 2: 59р, 31e
Цитогенетические показатели / Cytogenetic indicators	pluA1.2	0.04–0.06 0.05 ± 0.01	0.03–0.09 0.07 ± 0.02	–	0.08–0.33 0.22 ± 0.05	0.08–0.41 0.22 ± 0.06	0.27–0.36 0.32 ± 0.04
	pluB1.2	0.06	0.30–0.45 0.36 ± 0.04	–	0.00–0.33 0.18 ± 0.08	0.00–0.37 0.11 ± 0.07	0.00–0.03 0.02 ± 0.01
	pluC1.2	0.40–0.45 0.43 ± 0.03	0.33–0.55 0.39 ± 0.06	–	0.00–0.33 0.21 ± 0.08	0.00–0.05 0.01 ± 0.01	0.00–0.11 0.06 ± 0.06
	pluD1.2	0.28–0.37 0.33 ± 0.04	0.00–0.22 0.09 ± 0.06	–	0.08–0.50 0.25 ± 0.09	0.00–0.008 0.002 ± 0.002	0.00–0.03 0.02 ± 0.01
	pluE1.2	0.00–0.02 0.01 ± 0.01	0.00–0.13 0.03 ± 0.04	–	0.00–0.04 0.01 ± 0.01	0.00	0.00–0.03 0.02 ± 0.01
	pluF1.2	0.01	0.00	–	0.00	0.00–0.008 0.002 ± 0.002	0.00
	entA1.2	0.00	–	–	–	0.17–0.31 0.24 ± 0.03	0.08–0.13 0.11 ± 0.03
	entA1.4	0.00	–	–	–	0.00	0.09–0.16 0.13 ± 0.04
	entA1.5	0.00	–	–	–	0.00	0.00–0.09 0.05 ± 0.04
	entA1.6	0.00	–	–	–	0.00–0.08 0.02 ± 0.02	0.08–0.13 0.11 ± 0.03
entA1.7	0.00–0.25 0.13 ± 0.13	–	–	–	0.00	0.00–0.09 0.05 ± 0.04	
entC1.2	0.00	–	–	–	0.00–0.06 0.02 ± 0.01	0.00	
borA1.2	–	0.00–0.23 0.11 ± 0.07	0.07–0.17 0.12 ± 0.03	–	0.00	–	
borB1.2	–	0.00–0.20 0.07 ± 0.07	0.00–0.31 0.17 ± 0.09	–	0.00	–	
borD1.2	–	0.00–0.21 0.08 ± 0.06	0.00–0.31 0.11 ± 0.10	–	0.00	–	
Частота особей с ГИ / Frequency of individuals with GI	<i>Ch. plumosus</i>	0.57–0.70 0.64 ± 0.06	0.61–1.00 0.87 ± 0.09	–	0.40–0.83 0.63 ± 0.09	0.22–0.52 0.34 ± 0.05	0.36–0.50 0.43 ± 0.07
	<i>Ch. entis</i>	0.25	–	–	–	0.17–0.39 0.27 ± 0.04	0.42–0.44 0.43 ± 0.01
	<i>Ch. borokensis</i>	–	–	–	–	0.00	–
	<i>Ch. plumosus</i>	0.87–0.90 0.89 ± 0.01	0.67–1.17 0.95 ± 0.12	–	0.40–1.33 0.87 ± 0.19	0.22–0.55 0.35 ± 0.06	0.36–0.47 0.42 ± 0.06
	<i>Ch. entis</i>	0.25	–	–	–	0.17–0.38 0.27 ± 0.04	0.42–0.44 0.43 ± 0.01
Среднее число ГИ на особь / Average number of GI per individual	<i>Ch. borokensis</i>	–	–	0.11–0.37 0.23 ± 0.08	0.17–0.50 0.35 ± 0.10	0.00	–
	<i>Ch. plumosus</i>	0.19–0.27 0.23 ± 0.04	0.00–0.17 0.08 ± 0.04	–	0.00–0.32 0.14 ± 0.07	0.00	0.00
Частоты особей с двумя и более ГИ в кариотипе / Freqen- cies of individuals with two or more GI in the karyotype	<i>Ch. plumosus</i>	–	–	0.00–0.10 0.03 ± 0.03	0.03–0.12 0.05 ± 0.03	0.00	–
	<i>Ch. borokensis</i>	–	–	–	–	–	–
Частота особей с В-хромосомой / Fre- quency of individuals with B-chromosome	<i>Ch. plumosus</i>	0.06–0.15 0.11 ± 0.04	0.00–0.03 0.01 ± 0.01	–	0.00–0.03 0.01 ± 0.01	0.00–0.01 0.004 ± 0.002	0.02–0.05 0.04 ± 0.01
	<i>Ch. entis</i>	0.00	–	–	–	0.00	0.03



Таблица 2 / Table 2

Цитогенетические расстояния между популяциями *Ch. plumosus* природно-территориальных комплексов Уральского региона (n – количество популяций)
Cytogenetic distances between *Ch. plumosus* populations of natural-territorial complexes (NTC) of the Ural region (n – the number of populations)

ПТК / NTC	УРГС-ЗП / URGC-ZP	УРГС-СН / URGC-CN	ЗСРС-ТР / ZCRC-TR	ВСЮУ-ЗСРС / VCYUU-ZCRC	ЗСРС-ЮЗС / ZCRC-YUZC
УРГС-ЗП / URGC-ZP (n = 2)	0.0019	0.0163–0.0555 0.0301 ± 0.0045	0.0155–0.0379 0.0275 ± 0.0031	0.0421–0.0720 0.0557 ± 0.0029	0.0373–0.0658 0.0516 ± 0.0069
УРГС-СН / URGC-CN (n = 4)	–	0.0032–0.0187 0.0112 ± 0.0022	0.0023–0.0949 0.0355 ± 0.0061	0.0153–0.1019 0.0476 ± 0.0053	0.0129–0.0964 0.0486 ± 0.0090
ЗСРС-ТР / ZCRC-TR (n = 4)	–	–	0.0191–0.0452 0.0287 ± 0.0038	0.0067–0.0659 0.0326 ± 0.0047	0.009–0.0705 0.0306 ± 0.0085
ВСЮУ-ЗСРС / VCYUU-ZCRC (n = 5)	–	–	–	0.0008–0.0346 0.0126 ± 0.0034	0.0004–0.0304 0.0086 ± 0.0033
ЗСРС-ЮЗС / ZCRC-YUZC (n = 2)	–	–	–	–	0.0029

Таблица 3 / Table 3

Цитогенетические расстояния между популяциями *Ch. entis* природно-территориальных комплексов уральского региона (n – количество популяций)
Cytogenetic distances between *Ch. entis* populations of natural-territorial complexes (NTC) of the Ural region (n – the number of populations)

ПТК / NTC	ВСЮУ-ЗСРС / VCYUU-ZCRC	ЗСРС-ЮЗС / ZCRC-YUZC
УРГС-ЗП / URGC-ZP (n = 1)	0.0073–0.0141 0.0101 ± 0.0013	0.0065–0.0115 0.0090 ± 0.0031
ВСЮУ-ЗСРС / VCYUU-ZCRC (n = 5)	0.0005–0.0057 0.0028 ± 0.0007	0.0048–0.0084 0.0071 ± 0.0003
ЗСРС-ЮЗС / ZCRC-YUZC (n = 2)	–	0.0021

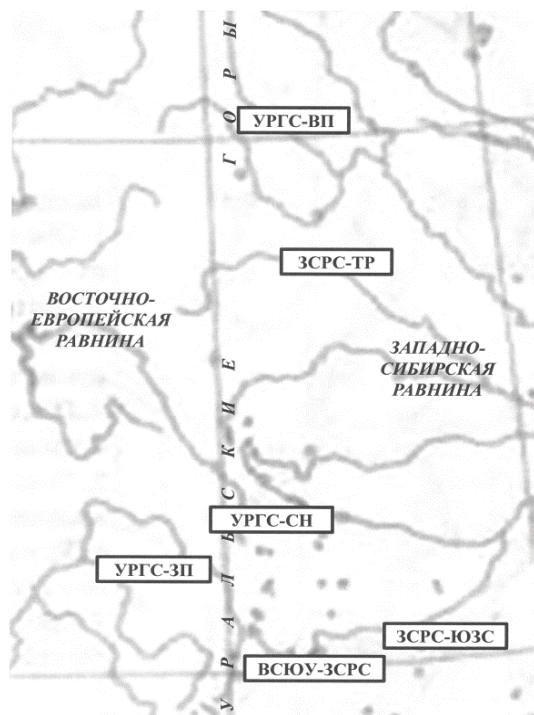


Схема расположения природно-территориальных комплексов: УРГС-ЗП – Уральская равнинно-горная страна Западный предгорный район, УРГС-СН – Уральская равнинно-горная страна Среднеуральский низкогорный район, УРГС-ВП – Уральская равнинно-горная страна Восточный подгорный район, ЗСРС-ТР – Западно-Сибирская равнинная страна Туринский равнинный район, ВСЮУ-ЗСРС – северная подзона лесостепная зона на восточных склонах Южного Урала и Западно-Сибирской равнинной страны, ЗСРС-ЮЗС – Западно-Сибирская равнинная страна в ее юго-западном секторе в составе подтаёжной подзоны лесной зоны

Fig. Scheme of the location of the natural-territorial complexes: УРГС-ЗП – Ural plain-mountainous country Western foothill region, УРГС-СН – Ural plain-mountainous country Sredneural'sky low-mountain region, УРГС-ВП – Ural plain-mountainous country Eastern Piedmont region, ЗСРС-ТР – West Siberian Plain Country Turin Plain Region, ВСЮУ-ЗСРС – northern subzone forest-steppe zone on the eastern slopes of the Southern Urals and the West Siberian plain country, ЗСРС-ЮЗС – West Siberian plain country in its southwestern sector as part of the subtaiga subzone of the forest zone



5) северная подзона лесостепная зона на восточных склонах Южного Урала и Западно-Сибирской равнинной страны (ВСЮУ-ЗСРС, 1 – оз. Иткуль, 08.04.2008 г.; 2 – оз. Карагуз, 08.03.2008 г.; 3 – оз. Силач, 10.04.2008 г.; 4 – оз. Агашкуль, 27.06.2006 г.; 5 – оз. Беликуль, 14.02.2005 г., 20.06.2007 г.);

6) Западно-Сибирская равнинная страна в ее юго-западном секторе в составе подтаёжной подзоны лесной зоны (ЗСРС-ЮЗС, 1 – оз. Беркут, 14.02.2005 г., 12.03.2006 г.; 2 – оз. Кривское, 17.05.2006 г.).

Личинки *Ch. plumosus* обнаружены в 5 природных комплексах, в каждом из них встретились ГИ pluA1.2, pluB1.2, pluC1.2, pluD1.2; в 4 отмечена ГИ pluE1.2; самая редкая ГИ pluF1.2 обнаружена в 2 природных комплексах. В водоемах 3 природных комплексов обитают личинки *Ch. entis*, для данных комплексов не установлено ни одной общей ГИ *Ch. entis*. Относительно *Ch. borokensis* сравнивались между собой два природных комплекса, в каждом из них отмечены ГИ borA1.2, borB1.2, borD1.2. В одном из природных комплексов обнаружены личинки *Ch. curabilis*, имеющие стандартные ПДХ.

В водоемах природного комплекса УРГС-ЗП обнаружены личинки *Ch. plumosus*, *Ch. entis* и *Ch. curabilis* с явным преобладанием *Ch. plumosus*. Доля личинок *Ch. plumosus* в пробах составляет 83.75–90.84%. По ряду характеристик цитогенетической изменчивости *Ch. plumosus* и *Ch. entis* УРГС-ЗП отличается от других природных комплексов:

1) от УРГС-СН достоверно отличается более низкой частотой встречаемости ПДХ pluB1.2 и более высокой частотой встречаемости ПДХ pluD1.2;

2) от ЗСРС-ТР достоверно отличается более низкой частотой встречаемости ПДХ pluA1.2;

3) от ВСЮУ-ЗСРС достоверно отличается более низкой частотой встречаемости ПДХ pluA1.2, более высокими частотами встречаемости ПДХ pluC1.2 и pluD1.2, более высокой частотой особей *Ch. plumosus* с ГИ, более высоким числом ГИ на особь у *Ch. plumosus*, более высокой частотой особей с В-хромосомами у *Ch. plumosus*, наличием ПДХ entA1.7, отсутствием ПДХ entA1.2 и entC1.2;

4) от ЗСРС-ЮЗС достоверно отличается более низкой частотой встречаемости ПДХ pluA1.2, более высокими частотами встречаемости ПДХ pluC1.2 и pluD1.2, более высоким числом ГИ на особь у *Ch. plumosus*, наличием особей *Ch. plu-*

mosus с двумя и более ГИ в кариотипе, отсутствием ПДХ entA1.2, entA1.4 и entA1.5, отсутствием В-хромосом у *Ch. entis*.

В водоемах природного комплекса УРГС-СН обитают личинки *Ch. plumosus* и по ряду характеристик цитогенетической изменчивости *Ch. plumosus* УРГС-СН отличается от других природных комплексов:

1) отличия от УРГС-ЗП указаны выше;

2) от ЗСРС-ТР достоверно отличается более низкой частотой встречаемости ПДХ pluA1.2;

3) от ВСЮУ-ЗСРС достоверно отличается более низкой частотой встречаемости ПДХ pluA1.2, более высокими частотами встречаемости ПДХ pluB1.2 и pluC1.2, более высокой частотой особей *Ch. plumosus* с ГИ, более высоким числом ГИ на особь у *Ch. plumosus*;

4) от ЗСРС-ЮЗС достоверно отличается более низкой частотой встречаемости ПДХ pluA1.2, более высокими частотами встречаемости ПДХ pluB1.2 и pluC1.2, более высокой частотой особей *Ch. plumosus* с ГИ, более высоким числом ГИ на особь у *Ch. plumosus*, наличием особей *Ch. plumosus* с двумя и более ГИ в кариотипе.

В водоемах природного комплекса УРГС-ВП обитают личинки *Ch. borokensis*, популяции которых цитогенетически достоверно отличаются более низкой частотой ПДХ borB1.2 от таковых природного комплекса ЗСРС-ТР.

В водоемах природного комплекса ЗСРС-ТР обитают личинки *Ch. plumosus* и *Ch. borokensis*. Доля личинок *Ch. plumosus* в пробах относительно *Ch. borokensis* составляет 14.70–92.31%. ЗСРС-ТР по ряду характеристик цитогенетической изменчивости *Ch. plumosus* и *Ch. borokensis* отличается от других природных комплексов:

1) отличия от УРГС-ЗП, УРГС-СН и УРГС-ВП указаны выше;

2) от ВСЮУ-ЗСРС достоверно отличается более высокими частотами встречаемости ПДХ pluC1.2 и pluD1.2, более высокой частотой особей *Ch. plumosus* с ГИ, более высоким числом ГИ на особь у *Ch. plumosus*;

3) от ЗСРС-ЮЗС отличается наличием особей *Ch. plumosus* с двумя и более ГИ в кариотипе.

В водоемах природного комплекса ВСЮУ-ЗСРС обитают личинки *Ch. plumosus* и *Ch. entis*. Доля личинок *Ch. plumosus* в пробах относительно *Ch. entis* составляет 73.20–90.29%. Следует указать, что в одном из водоемов данного природного комплекса в единственном экземпляре обнаружена личинка *Ch. borokensis*, кариотип которой имел стандартные ПДХ. ВСЮУ-ЗСРС



по ряду характеристик цитогенетической изменчивости *Ch. plumosus* и *Ch. entis* отличается от других природных комплексов:

1) отличия от УРГС-ЗП, УРГС-СН и ЗСРС-ТР указаны выше;

2) от ЗСРС-ЮЗС достоверно отличается более высокой частотой особей *Ch. plumosus* с В-хромосомой, наличием особей *Ch. plumosus* с двумя и более ГИ в кариотипе, достоверно отличается более высокой частотой встречаемости ПДХ entA1.2, более низкой частотой особей *Ch. entis* с ГИ, более низким числом ГИ на особь у *Ch. entis*, наличием ПДХ entC1.2, отсутствием ПДХ entA1.4, entA1.5 и entA1.7, отсутствием В-хромосом у *Ch. entis*.

В водоемах природного комплекса ЗСРС-ЮЗС обитают личинки *Ch. plumosus* и *Ch. entis*. Доля личинок *Ch. plumosus* в пробах относительно *Ch. entis* составляет 40.24–65.56%. ЗСРС-ЮЗС по ряду характеристик цитогенетической изменчивости *Ch. plumosus* и *Ch. entis* отличается от других природных комплексов, все отличия указаны выше.

Кроме того, в каждом из природных комплексов имеются личинки *Chironomus* с максимальными частотами встречаемости тех или иных ПДХ. Например, в популяциях *Chironomus* УРГС-ЗП наибольшие частоты (0.01 и 0.25) относительно других природных комплексов отмечены для ПДХ pluF1.2 и entA1.7 соответственно. В УРГС-СН наибольшие частоты (0.45, 0.55 и 0.13) установлены для ПДХ pluB1.2, pluC1.2 и pluE1.2 соответственно. В водоемах УРГС-ВП наибольшая частота (0.23) обнаружена для ПДХ borA1.2. В ЗСРС-ТР наибольшие частоты (0.50, 0.31 и 0.31) выявлены для ПДХ pluD1.2, borB1.2 и borD1.2 соответственно. В ВСЮУ-ЗСРС наибольшие частоты (0.41, 0.31 и 0.06) имеют ПДХ pluA1.2, entA1.2 и entC1.2 соответственно. В ЗСРС-ЮЗС наибольшие частоты (0.16, 0.09 и 0.13) обнаружены для ПДХ entA1.4, entA1.5 и entA1.6 соответственно.

В четырех природных комплексах (исключение составляют УРГС-ВП и ВСЮУ-ЗСРС) имеются максимальные значения по другим показателям цитогенетической изменчивости. В УРГС-ЗП отмечена наибольшая частота (0.15) особей *Ch. plumosus* с В-хромосомами. В УРГС-СН отмечена наибольшая частота (1.00) особей *Ch. plumosus* с ГИ. В ЗСРС-ТР у *Ch. plumosus* обнаружено наибольшее число ГИ на особь (1.33), наибольшая частотой особей с двумя и более ГИ в кариотипе (0.32); у *Ch. borokensis* – наи-

большая частота (0.5) особей с ГИ, наибольшее число ГИ на особь (0.63) и наибольшая частотой особей с двумя и более ГИ в кариотипе (0.12). В ЗСРС-ЮЗС для *Ch. entis* отмечены самые высокие значения частоты особей с ГИ (0.44), число ГИ на особь (0.44) и только в водоемах ЗСРС-ЮЗС в кариотипах *Ch. entis* обнаружены В-хромосомы.

Сравнительный анализ показал, что в пределах Уральской равнинно-горной страны (Западный предгорный и Среднеуральский низкогорный районы) отмечены достоверно более низкие частоты ПДХ pluA1.2 относительно восточных склонов Южного Урала и прилегающих территорий Западно-Сибирской равнины (природные комплексы ЗСРС-ТР, ВСЮУ-ЗСРС и ЗСРС-ЮЗС). Частота встречаемости ПДХ pluC1.2 в пределах Уральской равнинно-горной страны достоверно выше по сравнению с восточными склонами Южного Урала и прилегающими территориями Западно-Сибирской равнины. Данный вывод относится к двум природным комплексам (ВСЮУ-ЗСРС и ЗСРС-ЮЗС), природный комплекс ЗСРС-ТР, имеющий более северное местоположение, не имеет достоверного отличия по частоте встречаемости ПДХ pluC1.2 с природными комплексами Уральской равнинно-горной страны. Природные комплексы УРГС-ЗП и УРГС-СН, расположенные в пределах Уральской равнинно-горной страны, достоверно отличаются между собой по двум параметрам цитогенетической изменчивости относительно *Ch. plumosus*. Природные комплексы ВСЮУ-ЗСРС и ЗСРС-ЮЗС, расположенные на восточных склонах Южного Урала и Западно-Сибирской равнине, относительно *Ch. plumosus* отличаются между собой так же по двум параметрам цитогенетической изменчивости. При этом каждый из природных комплексов Уральской равнинно-горной страны (УРГС-ЗП и УРГС-СН) достоверно отличается от природных комплексов, расположенных на восточных склонах Южного Урала и Западно-Сибирской равнине (ВСЮУ-ЗСРС и ЗСРС-ЮЗС), по 5–6 параметрам цитогенетической изменчивости *Ch. plumosus*.

Сравнение параметров цитогенетической изменчивости *Ch. entis* природного комплекса УРГС-ЗП, расположенного в пределах Уральской равнинно-горной страны, с комплексами на восточных склонах Южного Урала и Западно-Сибирской равнине (ВСЮУ-ЗСРС и ЗСРС-ЮЗС) относительно *Ch. plumosus* выявило обратную картину. Природные комплексы ВСЮУ-ЗСРС и ЗСРС-ЮЗС отличаются между собой по 8 признакам цитогенетической из-



менчивости *Ch. entis* и по 3–4 признакам отличаются от природного комплекса УРГС-ЗП.

Сравнительный анализ трех природных комплексов, расположенных на восточных склонах Южного Урала и Западно-Сибирской равнине, обнаружил следующее. Из трех комплексов два имеют более южное местоположение (ВСЮУ-ЗСРС и ЗСРС-ЮЗС) и один – более северное (ЗСРС-ТР). Природные комплексы с более южным местоположением, как уже отмечалось выше, имеют между собой два отличия по параметрам цитогенетической изменчивости *Ch. plumosus*, то есть достаточно близки между собой. При этом один из них (ВСЮУ-ЗСРС) достоверно отличается по четырем параметрам цитогенетической изменчивости от природного комплекса с более северным местоположением (ЗСРС-ТР). Второй природный комплекс с южным местоположением (ЗСРС-ЮЗС) отличается от природного комплекса с северным местоположением (ЗСРС-ТР) всего одним признаком (отсутствием особей *Ch. plumosus* с двумя и более ГИ в кариотипе).

Следует отметить, что природные комплексы в пределах Уральской равнинно-горной страны (УРГС-ЗП и УРГС-СН) отличаются от природных комплексов, расположенных на восточных склонах Южного Урала и Западно-Сибирской равнине (ВСЮУ-ЗСРС и ЗСРС-ЮЗС) по 5–6 параметрам цитогенетической изменчивости *Ch. plumosus* и всего по одному параметру от природного комплекса ЗСРС-ТР, расположенного в пределах Западно-Сибирской равнины, но с более северным местоположением.

Анализ цитогенетических расстояний между популяциями *Ch. plumosus* (см. табл. 2) обнаружил, что данный показатель в пределах природного комплекса УРГС-ЗП заметно ниже цитогенетических расстояний между популяциями УРГС-ЗП и популяциями из других природно-территориальных комплексов (УРГС-СН, ЗСРС-ТР, ВСЮУ-ЗСРС, ЗСРС-ЮЗС). Аналогичный вывод следует и относительно природного комплекса УРГС-СН (см. табл. 2). Таким образом, природные комплексы УРГС-ЗП и УРГС-СН, расположенные в пределах Уральской равнинно-горной страны, имеют отличия по цитогенетическим расстояниям как между собой, так и с природными комплексами Уральского региона, находящимися на восточных склонах Южного Урала и Западно-Сибирской равнине (ЗСРС-ТР, ВСЮУ-ЗСРС, ЗСРС-ЮЗС), которые, в свою очередь, между собой не име-

ют отличий по цитогенетическим расстояниям между популяциями *Ch. plumosus*. В целом по Уральскому региону межпопуляционные цитогенетические расстояния *Ch. plumosus* составляют 0.0008–0.1019 (0.0301 ± 0.0020), что укладывается в пределы изменчивости данного признака *Ch. plumosus* Европы и Сибири, а именно 0.001–0.780 (0.164 ± 0.015) [8], но оказываются ниже межпопуляционных расстояний *Ch. plumosus* для Палеарктики (0.064 ± 0.003) [18].

Цитогенетические расстояния между популяциями *Ch. entis* (см. табл. 3) природного комплекса ВСЮУ-ЗСРС ниже, чем аналогичные показатели между популяциями ВСЮУ-ЗСРС и популяциями других природных комплексов (УРГС-ЗП, ЗСРС-ЮЗС). По данному параметру ВСЮУ-ЗСРС (восточные склоны Южного Урала и Западно-Сибирская равнинная страна) больше отличается от УРГС-ЗП (Уральская равнинно-горная страна), чем от ЗСРС-ЮЗС (Западно-Сибирская равнинная страна в ее юго-западном секторе). Цитогенетические расстояния между популяциями *Ch. entis* природного комплекса ЗСРС-ЮЗС меньше, чем с популяциями из других природных комплексов (см. табл. 3). Разница по цитогенетическим расстояниям между популяциями *Ch. entis* ЗСРС-ЮЗС (Западно-Сибирская равнинная страна в ее юго-западном секторе) и УРГС-ЗП (Уральская равнинно-горная страна) больше, чем с популяциями *Ch. entis* ВСЮУ-ЗСРС (восточные склоны Южного Урала и Западно-Сибирская равнинная страна). В целом по Уральскому региону межпопуляционные цитогенетические расстояния *Ch. entis* составляют 0.0005–0.0141 (0.0060 ± 0.0007), что не противоречит литературным данным, согласно которым цитогенетические расстояния между природными популяциями *Ch. entis* варьируют от 0.001 до 0.231 (0.107 ± 0.019) [10].

Для *Ch. borokensis* нами впервые были подсчитаны межпопуляционные цитогенетические расстояния и они составили в природном комплексе УРГС-ВП 0.0076–0.0191 (0.0117 ± 0.0037), в природном комплексе ЗСРС-ТР – 0.0152–0.0198 (0.0170 ± 0.0014) и между популяциями двух сравниваемых природных комплексов – 0.0005–0.0204 (0.0118 ± 0.0024). Таким образом, по цитогенетическим расстояниям между популяциями *Ch. borokensis* в Уральском регионе отличия не обнаружены. В целом по Уральскому региону межпопуляционные цитогенетические расстояния *Ch. borokensis* изменяются от 0.0005 до 0.0204 (0.0128 ± 0.0017).



Заключение

Исследованные природно-территориальные комплексы отличаются видовым составом группы "plumosus", соотношением (в %) между видами, все природные комплексы, в водоемах которых отмечены личинки *Ch. plumosus*, отличаются между собой по тем или иным параметрам цитогенетической изменчивости *Ch. plumosus*; аналогичные выводы существуют относительно *Ch. entis* и *Ch. borokensis*. Установлена достоверно более низкая частота встречаемости ПДХ pluA1.2 в пределах Уральской равнинно-горной страны по сравнению с природными комплексами на восточных склонах Южного Урала и Западно-Сибирской равнине на стыке с Уральским горным хребтом. Кроме того, популяции *Ch. plumosus* природных комплексов, расположенных в пределах Уральской равнинно-горной страны, между собой имеют более низкие цитогенетические расстояния по сравнению с популяциями *Ch. plumosus* природных комплексов, находящихся на восточных склонах Южного Урала и Западно-Сибирской равнине. Относительно *Ch. entis* данные территории отличаются между собой отсутствием в пределах Уральской равнинно-горной страны ПДХ entA1.2. По цитогенетическим расстояниям популяции *Ch. entis* природных комплексов, расположенные на восточных склонах Южного Урала и Западно-Сибирской равнинной стране, в большую сторону отличаются от популяции *Ch. entis* природного комплекса в пределах Уральской равнинно-горной страны, чем между собой. В направлении север – юг следует указать на достоверно более низкую частоту встречаемости ПДХ borB1.2 в популяциях природного комплекса УРГС-ВП относительно более южной территории (природный комплекс ЗСРС-ТР). На основании проведенного сравнительного анализа целого ряда показателей цитогенетической изменчивости считаем возможным сделать вывод о влиянии географического положения водоемов на цитогенетическую изменчивость изученных нами видов.

Список литературы

1. Шобанов Н. А., Шилова А. И., Белянина С. И. Объем и структура рода *Chironomus* Meigen (Diptera, Chironomidae): обзор мировой фауны // Экология, эволюция и систематика хирономид : сб. статей. Тольятти ; Борок : Институт биологии внутренних вод; Институт экологии Волжского бассейна, 1996. С. 44–96.
2. Вюлкер В. Ф. Зоогеографические отношения сибирских видов *Chironomus* // Экология, эволюция и систематика хирономид : сб. статей. Тольятти ; Борок : Институт биологии внутренних вод; Институт экологии Волжского бассейна, 1996. С. 24–27.
3. Кикнадзе И. И., Истомина А. Г., Голыгина В. В., Брошков А. Д. Цитогенетические исследования хирономид Горного Алтая // Биоразнообразие, проблемы экологии Горного Алтая и сопредельных регионов: настоящее, прошлое, будущее : материалы междунар. конф. : в 2 ч. (22–26 сентября 2008 г., г. Горно-Алтайск). Горно-Алтайск, 2008. Ч. 1. С. 29.
4. Wulker W. Fennoscandian *Chironomus* species (Dipt., Chironomidae) – identified by karyotypes and compared with the Russian and Central European fauna // Studia Dipterologica. 1999. Vol. 6, № 2. P. 425–436.
5. Wulker W. Basic patterns in the chromosome evolution of the genus *Chironomus* (Diptera) // Z. Zool. Syst. Evolut. Forsch. 1980. Vol. 18, № 2. P. 112–123.
6. Kiknadze I. I., Butler M. G., Aimanova K. G., Gunderina L. I., Cooper J. K. Geographic variation in the polytene chromosome banding pattern of the Holarctic midge *Chironomus (Camptochironomus) tentans* (Fabricius) // Can. J. Zool. 1996. Vol. 74, № 2. P. 171–191.
7. Андреева Е. Н. Кариотип и хромосомный полиморфизм у неарктических видов хирономид : дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск, 1999. 283 с.
8. Гундерина Л. И., Кикнадзе И. И., Голыгина В. В. Внутривидовая дифференциация цитогенетической структуры природных популяций *Chironomus plumosus* L. – центрального вида группы видов-двойников // Генетика. 1999. Т. 35, № 2. С. 193–202.
9. Гундерина Л. И., Кикнадзе И. И., Голыгина В. В. Внутрипопуляционная дифференциация цитогенетической структуры у видов рода *Chironomus* (Chironomidae: Diptera) // Генетика. 1999. Т. 35, № 3. С. 322–328.
10. Гундерина Л. И., Кикнадзе И. И., Голыгина В. В. Дифференциация цитогенетической структуры природных популяций видов-двойников группы *plumosus Chironomus balatonicus*, *Chironomus entis*, *Chironomus muratensis*, *Chironomus nudiventris* (Chironomidae: Diptera) // Генетика. 1999. Т. 35, № 5. С. 606–614.
11. Гундерина Л. И. Генетическая изменчивость в эволюции хирономид (Diptera, Chironomidae): автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Новосибирск, 2001. 32 с.
12. Кикнадзе И. И., Истомина А. Г. Кариотипы и хромосомный полиморфизм сибирских видов хирономид (Diptera, Chironomidae) // Сибирский экологический журнал. 2000. № 4. С. 445–460.
13. Белянина С. И. Кариотипический анализ хирономид (Chironomidae, Diptera) фауны СССР : дис. ... д-ра биол. наук. М., 1983. 418 с.
14. Белянина С. И. Современное состояние кариофондов хирономид в водоемах СССР // Эволюция, видообразование и систематика хирономид : сб. науч. тр. Новосибирск : Институт цитологии и генетики, 1986. С. 45–49.



15. Кикнадзе И. И. Роль хромосомного полиморфизма в дивергенции популяций и видов в роде *Chironomus* (Diptera) // Зоологический журнал. 2008. Т. 87, № 6. С. 686–701.
16. Butler M. G., Kiknadze I. I., Golygina V. V., Mattin J., Istomina A. G., Wulker W., Sublette J. E., Sublette M. F. Cytogenetic differentiation between Palearctic and Nearctic populations of *Chironomus plumosus* L. (Diptera, Chironomidae) // Genome. 1999. Vol. 42, № 5. P. 797–815.
17. Kiknadze I., Istomina A., Golygina V., Gunderina L. Karyotypes of Palearctic and Holarctic species of the genus *Chironomus*. Novosibirsk : Academic Publishing House «GEO», 2016. 489 p.
18. Кикнадзе И. И., Гольгина В. В., Истомина А. Г., Гундерина Л. И. Закономерности хромосомного полиморфизма при дивергенции популяций и видов у хирономид (Diptera, Chironomidae) // Сибирский экологический журнал. 2004. № 5. С. 635–651.
19. Ильинская Н. Б., Петрова Н. А. Закономерности проявления инверсионного полиморфизма в центре и по краям ареала *Chironomus plumosus* // Экология, эволюция и систематика хирономид: сб. статей. Тольятти ; Борок : Институт биологии внутренних вод; Институт Экологии Волжского бассейна, 1996. С. 8–17.
20. Петрова Н. А., Клишко О. К. Цитодиагностика, инверсионный полиморфизм и V-хромосомы трех видов-двойников *Chironomus* группы “*plumosus*” (Diptera, Chironomidae) из Восточной Сибири // Зоол. журн. 2005. Т. 84, № 8. С. 838–849.
21. Белянина С. И., Сигарева Л. Е., Логинова Н. В. Новый вид *Chironomus curabilis* sp. n. (Diptera, Chironomidae) // Зоол. журн. 1990. Т. 69, № 5. С. 60–70.
22. Полуконова Н. В., Белянина С. И., Михайлова П. В., Гольгина В. В. Сравнительный анализ кариотипов и кариофондов комаров-звонцов *Chironomus nuditaris* и *Ch. curabilis* (Chironomidae, Diptera) // Зоол. журн. 2005. Т. 84, № 2. С. 195–206.
23. Белянина С. И. Полиплоидия в популяциях хирономид (Chironomidae, Diptera) из водоемов на территории, затронутых чернобыльским выбросом // Бюллетень мед. интернет-конференций. 2016. Т. 16, № 9. С. 1483.
24. Демин С. Ю., Шобанов Н. А. Кариотип комара *Chironomus tentans* из группы *plumosus* в европейской части СССР // Цитология. 1990. Т. 32, № 10. С. 1046–1054.
25. Максимова Ф. Л. К вопросу о кариотипе *Chironomus plumosus* усть-ижорской природной популяции Ленинградской области // Цитология. 1976. Т. 18, № 10. С. 1264–1269.
26. Nei M. Genetic distance between populations // American Naturalist. 1972. Vol. 106. P. 283–292.
27. Прокаев В. И. Физико-географическое районирование Свердловской области. Свердловск : Свердловский государственный педагогический институт, 1976. 134 с.
28. Левит А. И. Южный Урал: география, экология, природопользование: учебное пособие. Челябинск : Южно-Уральское книжное изд-во, 2005. 245 с.
29. Тебенькова Е. А. Природные ландшафты Курганской области: теория и методика изучения : учебное пособие. Курган: Изд-во Курганского государственного университета, 2016. 114 с.

Reference

1. Shobanov N. A., Shilova A. I., Belyanina S. I. Scope and structure of the genus *Chironomus* Meigen (Diptera, Chironomidae): A review of the world fauna. In: *Ecologiya, evolyutsiya i taksonomiya khironomid: sb. statei* [Ecology, evolution and taxonomy of chironomids: Coll. arts]. Tolyatti, Borok, Papanin Institute for Biology of Inland Waters RAS, Institute of Ecology of the Volga River Basin RAS Publ., 1996, pp. 44–96 (in Russian).
2. Wulker V. F. Zoogeographic relationships of Siberian species of *Chironomus*. In: *Ecologiya, evolyutsiya i taksonomiya khironomid: sb. statei* [Ecology, evolution and taxonomy of chironomids: Coll. arts]. Tolyatti, Borok, Papanin Institute for Biology of Inland Waters RAS, Institute of Ecology of the Volga River Basin RAS Publ., 1996, pp. 24–27 (in Russian).
3. Kiknadze I. I., Istomina A. G., Golygina V. V., Broshkov A. D. Cytogenetic studies of chironomids of Gorny Altai. In: *Bioraznoobrazie, problemy ekologii Gornogo Altaia i sopredelnykh regionov: nastoyashee, proshloe, budushee: materialy mezhdunar. kohf.: v 2 ch. Ch. 1 (22–26 sentyabrya 2008 g., g. Gorno-Altaysk)* [Biodiversity, problems of ecology of Gorny Altai and adjacent regions: Present, past, future: Materials of the international conference: in 2 parts. Part 1 (September 22–26, 2008, Gorno-Altaysk)]. Gorno-Altaysk, 2008, pp. 29 (in Russian).
4. Wulker W. Fennoscandian *Chironomus* species (Dipt., Chironomidae) – identified by karyotypes and compared with the Russian and Central European fauna. *Studia Dipterologica*, 1999, vol. 6, no. 2, pp. 425–436.
5. Wulker W. Basic patterns in the chromosome evolution of the genus *Chironomus* (Diptera). *Z. Zool. Syst. Evolut. Forsch.*, 1980, vol. 18, no. 2, pp. 112–123.
6. Kiknadze I. I., Butler M. G., Aimanova K. G., Gunderina L. I., Cooper J. K. Geographic variation in the polytene chromosome banding pattern of the Holarctic midge *Chironomus (Camptochironomus) tentans* (Fabricius). *Can. J. Zool.*, 1996, vol. 74, no. 2, pp. 171–191.
7. Andreeva E. N. *Karyotype and chromosomal polymorphism in Nearctic species chironomids*. Thesis Diss. Cand. Sci. (Biol.). Novosibirsk, 1999. 283 p. (in Russian).
8. Gunderina L. I., Kiknadze I. I., Golygina V. V. Intraspecific differentiation of the cytogenetic structure of natural populations of *Chironomus plumosus* L., the central species of the group of twin species. *Genetics*, 1999, vol. 35, no. 2, pp. 193–202 (in Russian).
9. Gunderina L. I., Kiknadze I. I., Golygina V. V. Intrapopulation differentiation of cytogenetic structure in species of the genus *Chironomus* (Chironomidae: Diptera). *Genetics*, 1999, vol. 35, no. 3, pp. 322–328 (in Russian).
10. Gunderina L. I., Kiknadze I. I., Golygina V. V. Differentiation of the cytogenetic structure of natural populations



- of species – twins of the *plumosus* group *Chironomus balatonicus*, *Chironomus entis*, *Chironomus muratensis*, *Chironomus nudiventris* (Chironomidae: Diptera). *Genetics*, 1999, vol. 35, no. 5, pp. 606–614 (in Russian).
11. Gunderina L. I. *Genetic variability in the evolution of chironomids* (Diptera, Chironomidae). Thesis Diss. Dr. Sci. (Biol.). Novosibirsk, 2001. 32 p. (in Russian).
 12. Kiknadze I. I., Istomina A. G. Karyotypes and chromosomal polymorphism of Siberian chironomid species (Diptera, Chironomidae). *Siberian Ecological Journal*, 2000, vol. 4, pp. 445–460 (in Russian).
 13. Belyanina S. I. *Karyotypical analysis of the chironomid (Diptera, Chironomidae) of the USSR fauna*. Diss. Dr. Sci. (Biol.). Moscow, 1983. 455 p. (in Russian).
 14. Belyanina S. I. Current state of chironomid caryofunds in water bodies of the USSR. In: *Evolyutsiya, vidobrazovanie i sistematika khironomid: sb. nauch. tr.* [Evolution, speciation and taxonomy of chironomids: Coll. sci. arts]. Novosibirsk, Institute of Cytology and Genetics Publ., 1986, pp. 45–49 (in Russian).
 15. Kiknadze I. I. The role of chromosomal polymorphism in population and species divergence in the genus *Chironomus* (Diptera). *Zoological Journal*, 2008, vol. 87, no. 6, pp. 686–701 (in Russian).
 16. Butler M. G., Kiknadze I. I., Golygina V. V., Mattin J., Istomina A. G., Wulker W., Sublette J. E., Sublette M. F. Cytogenetic differentiation between Palearctic and Nearctic populations of *Chironomus plumosus* L. (Diptera, Chironomidae). *Genome*, 1999, vol. 42, no. 5, pp. 797–815.
 17. Kiknadze I., Istomina A., Golygina V., Gunderina L. Karyotypes of Palearctic and Holarctic species of the genus *Chironomus*. Novosibirsk, Academic Publishing House “GEO”, 2016. 489 p.
 18. Kiknadze I. I., Golygina V. V., Istomina A. G., Gunderina L. I. Patterns of chromosomal polymorphism during divergence of populations and species in chironomids (Diptera, Chironomidae). *Siberian Ecological Journal*, 2004, vol. 5, pp. 635–651 (in Russian).
 19. Ilyinskaya N. B., Petrova N. A. Patterns of manifestation of inversion polymorphism in the center and along the edges of the range of *Chironomus plumosus*. In: *Ecologiya, evolyutsiya i taksonomiya khironomid: sb. statei* [Ecology, evolution and taxonomy of chironomids: Coll. arts]. Tolyatti, Borok, Papanin Institute for Biology of Inland Waters RAS, Institute of Ecology of the Volga River Basin RAS Publ., 1996, pp. 8–17 (in Russian).
 20. Petrova N. A., Klishko O. K. Cytodiagnosics, inversion polymorphism and B-chromosomes of three twin species of *Chironomus* of the group “*plumosus*” (Diptera, Chironomidae) from Eastern Siberia. *Zoological Journal*, 2005, vol. 84, no. 8, pp. 838–849 (in Russian).
 21. Belyanina S. I., Sigareva L. E., Loginova N. V. A new species of *Chironomus curabilis* sp. n. (Diptera, Chironomidae). *Zoological Journal*, 1990, vol. 69, no. 5, pp. 60–70 (in Russian).
 22. Polukonova N. V., Belyanina S. I., Mikhailova P. V., Golygina V. V. Comparative analysis of karyotypes and karyophonds of the *Chironomus nuditarsis* and *Ch. curabilis* mosquitoes (Chironomidae, Diptera). *Zoological Journal*, 2005, vol. 84, no. 2, pp. 195–206 (in Russian).
 23. Belyanina S. I. Polyploidy in populations of chironomids (Chironomidae, Diptera) from reservoirs on the territory affected by the Chernobyl release. *Bulletin of Medical Internet Conferences*, 2016, vol. 6, iss. 9, pp. 1483 (in Russian).
 24. Dyomin S. Y., Shobanov N. A. Karyotype of *Chironomus entis* (*plumosus* species group) from European part of USSR. *Tsitologiya*, 1990, vol. 32, pp. 1046–1055 (in Russian).
 25. Maximova F. L. The karyotype of *Chironomus plumosus* from Ust-Izhora wild population of Leningrad region. *Tsitologiya*, 1976, vol. 18, no. 10, pp. 1264–1268 (in Russian).
 26. Nei M. Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 1972, vol. 106, pp. 283–292.
 27. Prokaev V. I. *Fiziko-geograficheskoe raionirovanie Sverdlovskoi oblasti* [Physical-geographical zoning of the Sverdlovsk region]. Sverdlovsk, Sverdlovsk State Pedagogical Institute Publ., 1976. 134 p. (in Russian).
 28. Levit A. I. *Yuznyi Ural: geografiya, ekologiya, prirodopolzovanie: uchebnoe posobie* [Southern Urals: Geography, ecology, nature management: textbook]. Chelyabinsk, Yuzhno-Uralskoe knizhnoe izdatel'stvo, 2005. 245 p. (in Russian).
 29. Tebenkova E. A. *Prirodnye landshafty Kurganskoi oblasti: teoriya i metodika izucheniya: uchebnoe posobie* [Natural landscapes of the Kurgan region: Theory and methods of study: Textbook]. Kurgan, Kurgan State University Publ., 2016. 114 p. (in Russian).

Поступила в редакцию 09.08.2022; одобрена после рецензирования 10.07.2023; принята к публикации 12.07.2023
The article was submitted 09.08.2022; approved after reviewing 10.07.2023; accepted for publication 12.07.2023



Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 4. С. 472–478

Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology, 2023, vol. 23, iss. 4, pp. 472–478

<https://ichbe.sgu.ru>

<https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-4-472-478>, EDN: SSVFHT

Научная статья

УДК 544.47:542.943:615.322



Оценка активности пероксидаз, содержащихся в различных растительных источниках

А. А. Соловьева , О. Е. Лебедева, Т. Ч. Фам

Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Россия, 308015, г. Белгород, ул. Победы, д. 85

Соловьева Анна Алексеевна, кандидат химических наук, доцент кафедры общей химии, solovyeva@bsu.edu.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5066-2932>

Лебедева Ольга Евгеньевна, доктор химических наук, профессор кафедры общей химии, olebedeva@bsu.edu.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5021-028X>

Фам Тхи Чинь, магистрант 2-го года обучения Института фармации, химии и биологии, 1097993@bsu.edu.ru, <https://orcid.org/0009-0003-5851-3618>

Аннотация. В данной работе была проведена ферментативная реакция обесцвечивания водного раствора красителя бромфенолового синего в присутствии пероксида водорода и пероксидазы, содержащейся в корнеплодах хрена обыкновенного (*Armoracia rusticana*), редиса (*Raphanus sativus* var. *radicula*), репы желтой (*Brassica napobrassica*), дайкона (*Raphanus sativus*), редьки черной (*Raphanus sativus* 'Niger'), редьки зеленой (*Raphanus*) либо кочерыжке капусты белокочанной (*Brassica capitata*). Реакцию проводили при начальном содержании красителя 25,1 мкМ, концентрации пероксида водорода 0,4 мМ, при $t = 24^\circ\text{C}$ и pH 4,01, в качестве источника пероксидазы использовали кожуру различных овощей, вводя ее в реакцию без предварительного выделения фермента. При использовании отходов хрена, редьки черной, капусты белокочанной, репы удается достигнуть 95% степени обесцвечивания красителя в его водном растворе. Рассчитаны максимальная скорость и константы Михаэлиса ферментативной реакции методом линеаризации в координатах Лайнуивера – Берка. Показано, что функционирование ферментного комплекса, содержащегося в кожуре редьки черной, сохраняется при повышении температуры от 23 до 40°C.

Ключевые слова: пероксидаза хрена, бромфеноловый синий, биодеколоризация

Для цитирования: Соловьева А. А., Лебедева О. Е., Фам Т. Ч. Оценка активности пероксидаз, содержащихся в различных растительных источниках // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 4. С. 472–478. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-4-472-478>, EDN: SSVFHT

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

Article

Evaluation of activity of peroxidases contained in various plant sources

A. A. Solovyeva , O. E. Lebedeva, T. T. Pham

Belgorod State National Research University, 85 Pobedy St., Belgorod 308015, Russia

Anna A. Solovyeva, solovyeva@bsu.edu.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5066-2932>

Olga E. Lebedeva, olebedeva@bsu.edu.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5021-028X>

Thi Trinh Pham, 1097993@bsu.edu.ru, <https://orcid.org/0009-0003-5851-3618>

Abstract. In this study, the decolorization reaction of aqueous solution bromophenol blue dye was carried out in the presence of hydrogen peroxide and peroxidase contained in the roots of horseradish (*Armoracia rusticana*), radish (*Raphanus sativus* var. *radicula*), yellow turnip (*Brassica napobrassica*), daikon (*Raphanus sativus*), black radish (*Raphanus sativus* 'Niger'), green radish (*Raphanus*) or stalk of white cabbage (*Brassica capitata*). The reaction was carried out at an initial dye content of 25,1 μM , a hydrogen peroxide concentration of 0,4 mM, at $t = 24^\circ\text{C}$ and pH 4,01, the peel of various vegetables was used as a source of peroxidase; it was inserted into the reaction without enzyme primary extraction. When using horseradish waste, black radish, white cabbage, turnips, it is possible to get the degree of decolorization of the dye in its aqueous solution by 95%. The maximum rate and Michaelis constants of the enzymatic reaction are calculated by the linearization method in the Linuiver – Burke coordinates. It is shown that the activity of peroxidase contained in the peel of black radish persists with an increase in temperature from 23 to 40°C.

Keywords: horseradish peroxidase, bromophenol blue dye, enzymatic decolorization

For citation: Solovyeva A. A., Lebedeva O. E., Pham T. T. Evaluation of activity of peroxidases contained in various plant sources. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2023, vol. 23, iss. 4, pp. 472–478 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-4-472-478>, EDN: SSVFHT

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



Введение

Загрязнение воды красителями является одной из серьезных экологических проблем, даже в небольших количествах красители существенно снижают прозрачность природной воды. Красители обычно используются в пищевой, косметической, кожевенной, текстильной, бумажной и пластмассовой промышленности. Например, при окрашивании в процессе текстильной обработки происходит значительная потеря красителя (до 50%), который затем попадает в водные объекты в составе сточных вод. Методы обнаружения и устранения загрязнений от красителей постоянно совершенствуются [1]. Наличие недостатков у физико-химических методов разрушения красителей вызвало интерес исследователей по всему миру к разработке альтернативных экономически эффективных и экологически чистых способов обезвреживания. Так, было показано, что в присутствии пероксида водорода пероксидаза хрена окисляет широкий спектр органических субстратов. Красители, содержащиеся в сточных водах, могут быть эффективно удалены с использованием пероксидазы хрена [2–6].

В настоящее время корни хрена обыкновенного (*Armoracia rusticana*) служат основным источником пероксидазы. В работах [7, 8] подробно изучена деструкция органических красителей в присутствии пероксида водорода с участием коммерческой пероксидазы хрена. Однако следует учитывать, что стоимость коммерческой пероксидазы достаточно высока, поскольку процедуры её выделения и очистки требуют дополнительных затрат, и это является существенным недостатком [9]. В связи с этим изучение применения растительных пероксидаз является актуальной задачей. В работе [10] для сравнительной оценки проводилась экстракция пероксидазы из различных растительных объектов: кабачков, репы, капусты, редиса красного, цветной капусты и картофеля. Авторы показали, что среди овощей наибольшая активность наблюдается у пероксидазы репы (*Brassica rapa*) в реакции обесцвечивания азокрасителя Конго красный. В оптимизированных условиях удалось достигнуть полного обесцвечивания реакционной смеси через 16 мин. Встречаются публикации с использованием для различных целей пероксидазы из менее изученных растительных объектов, таких как табак [11, 12], сладкий картофель [13], стебли брокколи [14], краснокочанная капуста [15], цитрусовые растения [16]. Ранее

нами была изучена ферментативная реакция красителя бромфенолового синего с пероксидом водорода в присутствии коммерческого препарата пероксидазы, а также пероксидазы, экстрагированной из корней хрена [17].

Чаще всего для деструкции органических поллютантов используется коммерческий препарат пероксидазы либо пероксидаза, предварительно экстрагированная из частей различных растений. Представляет интерес сокращение стадии экстракции в процессе подготовки фермента для ферментативной деструкции органических веществ, однако такие публикации нам неизвестны.

Целью настоящей работы являлась оценка потенциала отходов различных овощей как источников пероксидазы, используемой в процессе обесцвечивания раствора бромфенолового синего в присутствии пероксида водорода, без необходимости выделения ферментного комплекса из состава овоща.

Материалы и методы

В данной работе в качестве источника пероксидазы использовали отходы корнеплодов хрена (*Armoracia rusticana*), редиса (*Raphanus sativus* var. *radicula*), дайкона (*Raphanus sativus* subsp. *acanthiformis*), редьки черной (*Raphanus sativus* 'Niger'), репы желтой (*Brassica napobrassica*), редьки зеленой (*Raphanus*) и кочерыжку капусты белокочанной (*Brassica capitata*). Для экспериментов использовали счищенную кожуру овощей, предварительно промытых дистиллированной водой от остатков почвы.

В качестве модельного красителя использовали бромфеноловый синий (БФС, регистрационный номер CAS 115-39-9) квалификации «ч.д.а.» без дополнительной очистки.

Обесцвечивание раствора красителя осуществляли при температуре 24°C и pH 4,01 (фталатный буферный раствор). В водный раствор объемом 25 мл БФС с концентрацией 25,1 мкМ помещали 0,5 г кожуры корнеплодов одного из овощей. Реакцию инициировали добавлением 0,1 мл 0,1 М раствора пероксида водорода. После перемешивания регистрировали спектры поглощения в интервале длин волн 350–700 нм с использованием спектрофотометра Specord Analytik Jena 200 plus.

Эффективность удаления красителя (Э), определяли по формуле:

$$\text{Э} = \frac{C_0 - C_t}{C_0} \cdot 100\% ,$$



где C_0 – начальная концентрация красителя, C_t – концентрация красителя в момент времени t .

Концентрацию красителя определяли по оптической плотности раствора в максимуме поглощения $\lambda = 592$ нм, $l = 1$ см, используя значение $\epsilon_{592} = 3,4 \cdot 10^4$ л/моль·см.

Для проведения исследований при повышенных температурах использовали лабораторный термостат суховоздушный ТС-1/20 СПУ.

Результаты и их обсуждение

Для оценки вклада возможных сорбционных процессов в обесцвечивание раствора красителя процесс осуществляли в присутствии только растительных материалов без участия пероксида водорода. Через 2 ч процесса в присутствии отходов корнеплодов репы степень обесцвечивания БФС составила 10%, хрена и капусты – 7%, дайкона

и редьки черной – 4%, редиса, редьки зеленой – 1%, эти значения соответствуют максимальной адсорбции красителя на поверхности кожуры овощей, которая впоследствии не изменялась в течение трех суток.

В присутствии пероксида водорода и фермента, содержащегося в кожуре корня хрена, наблюдалось значительное уменьшение интенсивности поглощения раствора БФС при длине волны 592 нм, как показано на рис. 1. Это соответствует снижению концентрации красителя в его водном растворе.

На рис. 2 показано снижение интенсивности поглощения раствора БФС в присутствии пероксида водорода и отходов капусты. Эффективность обесцвечивания красителя в присутствии отходов всех изученных овощей представлена в табл. 1.

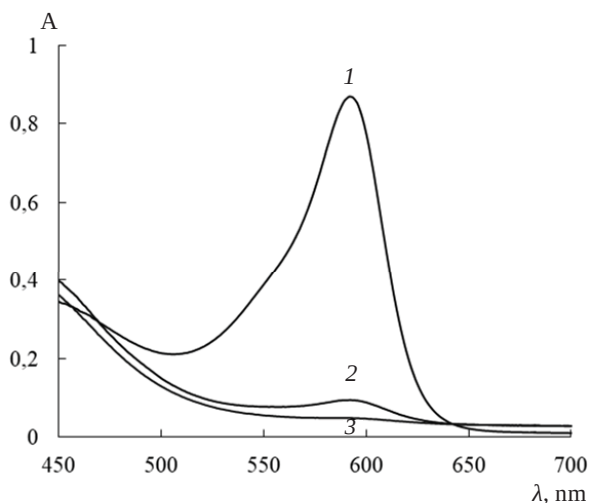


Рис. 1. Спектры поглощения раствора БФС 25,1 мкМ в присутствии отходов хрена, m (отходов) = 0,5 г, $C(H_2O_2) = 0,4$ мМ, $t = 24$ °С, pH 4,01 за различное время реакции, мин: 1 – исходный; 2 – 1; 3 – 10

Fig. 1. UV-vis spectra of aqueous Bromophenol blue dye solution 25,1 μ M in the presence of horseradish waste, $m(\text{waste}) = 0,5$ g, $C(H_2O_2) = 0,4$ mM, $t = 24$ °C, pH 4,01 for different reaction times, min: 1 – original; 2 – 1; 3 – 10

Из табл. 1 видно, что фермент, содержащийся в кожуре корнеплодов разных овощей, в сочетании с пероксидом водорода катализирует обесцвечивание водного раствора БФС с различной эффективностью. При использовании пероксидазы хрена окисление протекает наиболее эффективно, примерно 95% красителя обесцвечивается в течение 10 мин. В присутствии кожуры редьки черной обесцвечивание раствора красителя также протекало достаточно быстро, тогда как

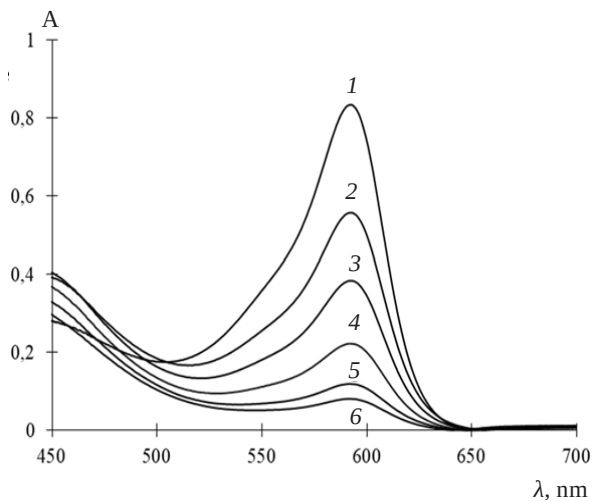


Рис. 2. Спектры поглощения раствора БФС 25,1 мкМ в присутствии отходов капусты, m (отходов) = 0,5 г, $C(H_2O_2) = 0,4$ мМ, $t = 24$ °С, pH 4,01 за различное время реакции, мин: 1 – исходный; 2 – 5; 3 – 10; 4 – 30; 5 – 60; 6 – 180

Fig. 2. UV-vis spectra of aqueous Bromophenol blue dye solution 25,1 μ M in the presence of cabbage waste, $m(\text{waste}) = 0,5$ g, $C(H_2O_2) = 0,4$ mM, $t = 24$ °C, pH 4,01 for different reaction times, min: 1 – original; 2 – 5; 3 – 10; 4 – 30; 5 – 60; 6 – 180

отходы дайкона и редиса позволяли достигнуть сопоставимого эффекта лишь через трое суток.

Для характеристики ферментативных реакций обычно применяют максимальную скорость V_m и константу Михаэлиса K_M . Для расчета данных величин определяли зависимость начальной скорости реакции от концентрации субстрата, при этом концентрацию бромфенолового синего в растворе варьировали от 10,2 до 53,2 мкМ при постоянных значениях кон-



Таблица 1 / Table 1

Степень обесцвечивания БФС в присутствии растительных отходов:
 $C(\text{БФС}) = 25,1 \text{ мкМ}$, $C(\text{H}_2\text{O}_2) = 0,4 \text{ мМ}$, $m(\text{отходов}) = 0,5 \text{ г}$, $\text{pH } 4,01$, $t = 24^\circ\text{C}$
The degree of decolorization of Bromophenol blue dye in the presence of plant waste:
 $C(\text{BPB}) = 25,1 \text{ }\mu\text{M}$, $C(\text{H}_2\text{O}_2) = 0,4 \text{ mM}$, $m(\text{waste}) = 0,5 \text{ g}$, $\text{pH } 4,1$, $t = 24^\circ\text{C}$

Овощная культура Vegetable culture	Время, t Time, t	Степень удаления, % Degree of removal, %
Хрен <i>Armoracia rusticana</i>	10 мин / min	95
Черная редька <i>Raphanus sativus 'Niger'</i>	1 ч / h	88
Редис <i>Brassica napobrassica</i>	3 ч / h	73
Капуста <i>Brassica capitata</i>	3 ч / h	76
Зеленая редька <i>Raphanus</i>	1 сутки / day	50
Дайкон <i>Raphanus sativus</i>	3 суток / days	68
Редис <i>Raphanus sativus var. radicola</i>	3 суток / days	73

центрации пероксида водорода, массы отходов овощей и pH. Параметры ферментативной реакции определялись методом линеаризации уравнения Михаэлиса – Ментен в координатах Лайнуивера – Берка. Для учета возможных раз-

личий, связанных со степенью зрелости, особенностями хранения, сортовыми различиями овощных культур определяли параметры процесса деструкции с использованием трех различных образцов овощей. Результаты приведены в табл. 2.

Таблица 2 / Table 2

Кинетические параметры ферментативной деколоризации раствора БФС в присутствии растительных отходов: $C(\text{H}_2\text{O}_2) = 0,4 \text{ мМ}$, $m(\text{отходов}) = 0,5 \text{ г}$, $\text{pH } 4,01$, $t = 24^\circ\text{C}$
Kinetic parameters of enzymatic decolorization of Bromophenol blue dye in the presence of plant waste:
 $C(\text{H}_2\text{O}_2) = 0,4 \text{ mM}$, $m(\text{waste}) = 0,5 \text{ g}$, $\text{pH } 4,01$, $t = 24^\circ\text{C}$

Параметры Parameters	$V_m, \text{ мМ}\cdot\text{мин}^{-1} / V_m, \text{ mM}\cdot\text{min}^{-1}$			$K_M, \text{ мМ} / K_m, \text{ mM}$		
	№ образца / Sample number					
	1	2	3	1	2	3
Хрен / <i>Armoracia rusticana</i>	0,345	0,073	0,021	0,346	0,094	0,097
Черная редька / <i>Raphanus sativus 'Niger'</i>	0,068	0,044	0,105	0,38	0,051	0,183
Капуста / <i>Brassica capitata</i>	0,005	0,031	0,002	0,039	0,709	0,008
Редис / <i>Brassica napobrassica</i>	0,033	0,167	0,046	0,128	0,204	0,086
Зеленая редька / <i>Raphanus</i>	0,001	0,013	0,006	0,04	0,115	0,022
Редис / <i>Raphanus sativus var. radicola</i>	0,009	0,014	0,019	0,281	0,034	0,409
Дайкон / <i>Raphanus sativus</i>	0,011	0,009	0,107	1,68	0,031	0,168



По данным табл. 2 видно, что для хрена максимальная скорость составляет наибольшее значение, для зеленой редьки – наименьшее, что свидетельствует о высокой активности пероксидазы в кожуре корня хрена. Однако следует иметь в виду, что наблюдаемое различие вполне могло возникнуть из-за различного содержания фермента в изученных овощных культурах. Анализ данных табл. 2 показывает, что для каждого овоща параметры процесса деколоризации меняются при применении различных образцов, что, вероятно, объясняется различием условий и времени хранения овощей, а также циклом развития овощных культур [18]. Однако сохраняется закономерность, выявленная ранее: в среднем эффективность использования корня хрена в изучаемом процессе выше эффективности применения растительного материала корнеплодов других овощей. Следовательно, отходы корнеплодов хрена, а также репы и редьки черной могут служить потенциальными источниками пероксидаз, которые способствуют эффективному обесцвечиванию сточных вод.

Известно, что температура – это существенный фактор, оказывающий влияние на скорость ферментативных реакций. Пероксидаза относится к достаточно термоустойчивым ферментам, даже при нагревании до 85°C активность пероксидазы хрена сохраняется на 50% [19]. Изучение зависимости активности пероксидазы, выделенной из топинамбура, от температуры показывает, что максимальная активность фермента проявляется при 30°C [20].

В настоящей работе проводили реакцию ферментативного обесцвечивания красителя в присутствии кожуры редьки черной при различных температурах. Кинетические кривые изменения концентрации бромфенолового синего, полученные при различных температурах, показаны на рис. 3. Следует отметить, что влияние температуры изучали при более высокой концентрации субстрата, чем сопоставление активности различного растительного материала, с целью минимизации влияния концентрационных изменений. Указанная концентрация отвечала выходу графика Михаэлиса – Ментен на плато, параллельное оси абсцисс.

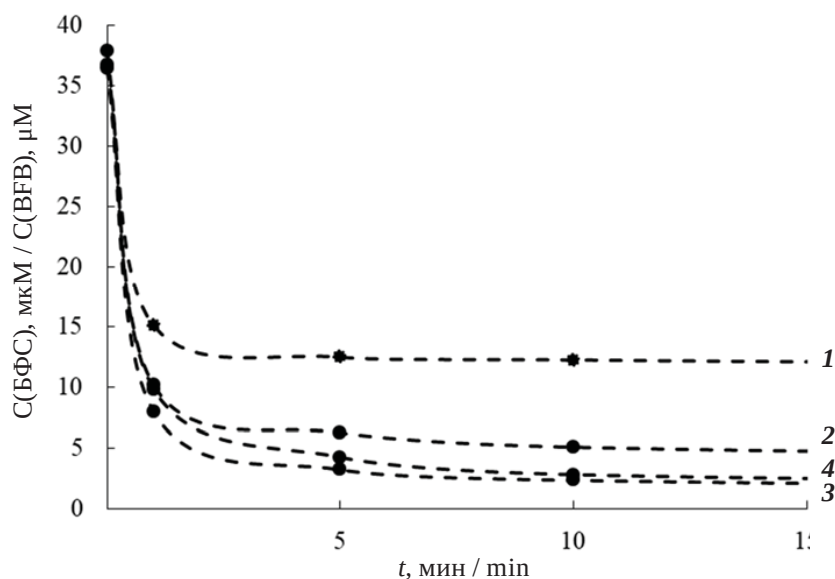


Рис. 3. Кинетические кривые обесцвечивания БФС 37,2 мкМ в присутствии редьки черной, $C(H_2O_2) = 0,4$ мМ, m (отходов) = 0,5 г, pH 4,01 при различных температурах: 1 – 50°C; 2 – 40°C; 3 – 30°C; 4 – 24°C

Fig. 3. Kinetic curves of decolorization of aqueous Bromophenol blue dye solutions 37,2 μ M in the presence of black radish, $C(H_2O_2) = 0,4$ mM, m (waste) = 0,5 g, pH 4,01, at different temperatures: 1 – 50°C; 2 – 40°C; 3 – 30°C; 4 – 24°C

Полученные результаты показывают, что при повышении температуры до 40°C ферментативная реакция протекает с высокой эффективностью, при этом степень обесцвечивания красителя

составляет около 95%. При повышении температуры до 50°C степень обесцвечивания БФС уменьшается до 68%, что, по-видимому, связано с разрушением активных центров фермента.



Выводы

Изучена возможность использования отходов различных овощей (кожуры корня хрена, редиса, черной редьки, дайкона, зеленой редьки и кочерыжки капусты) как источника пероксидазы в ферментативной реакции обесцвечивания бромфенолового синего. Окисление протекает с высокой эффективностью при использовании кожуры хрена и редьки черной, в этих случаях удается достигнуть деколоризации водного раствора красителя более чем на 88%, что может стать альтернативой биodeградации.

Определены кинетические параметры изучаемой реакции. Показано, что функционирование ферментного комплекса, содержащегося в кожуре редьки черной, сохраняется при повышении температуры от 23 до 40°C, причем степень удаления красителя достигает 96%.

Список литературы

1. Selvaraj V., Karthika T. S., Mansiya C., Alagar M. An overview of recently developed techniques, mechanisms, and intermediate involved in the advanced azo dye degradation for industrial applications // *J. Mol. Struct.* 2021. Vol. 1224. P. 129–195. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.129195>
2. Routoula E., Patwardhan S. V. Degradation of anthraquinone dyes from effluents: A review focusing on enzymatic dye degradation with industrial potential // *Environ. Sci. Technol.* 2019. Vol. 54, № 2. P. 647–664. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b03737>
3. Singh R. L., Singh P. K., Singh R. P. Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes. A review // *Int. Biodeterior. Biodegradation.* 2015. Vol. 104. P. 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.04.027>
4. Imran M., Crowley D. E., Khalid A. Microbial biotechnology for decolorization of textile wastewaters // *Environ. Sci. Biotechnol.* 2015. Vol. 14. P. 73–92. <https://doi.org/10.1007/s11157-014-9344-4>
5. Baumer J. D., Valerio A., Guelli Ulson de Souza S. M., Erzinger G. S., Furigo Jr A., Ulsonde Souza A. A. Toxicity of enzymatically decolorized textile dyes solution by horseradish peroxidase // *J. Hazard. Mater.* 2018. Vol. 360. P. 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.07.102>
6. Sekuljica N. Z., Prlainovic N. Z., Jakovetic S. M., Grbavcic S. Z., Ognjanovic N. D., Knezevic-Jugovic Z. D., Mijin D. Z. Removal of anthraquinone dye by cross-linked enzyme aggregates from fresh horseradish extract // *Clean: Soil, Air, Water.* 2016. Vol. 44. P. 1–10. <https://doi.org/10.1002/clen.201500766>
7. Terres J., Battisti R., Andreus J., Cesar de Jesus P. Decolorization and degradation of Indigo Carmine dye from aqueous solution catalyzed by horseradish peroxidase // *Biocatal. Biotransform.* 2014. Vol. 32, № 1. P. 64–73. <https://doi.org/10.3109/10242422.2013.873416>
8. Farias S., de Oliveira D., Ulson de Souza A. A., Guelli U. de Souza S. M., Morgado F. Removal of reactive blue 21 and reactive red 195 dyes using horseradish peroxidase as catalyst // *Brazil. J. Chem. Eng.* 2017. Vol. 34, № 3. P. 701–707. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20170343s20160091>
9. Вяткина О. В. Проблемы выделения и очистки растительных пероксидаз // Ученые записки Крымского федерального университета им. В. И. Вернадского. Биология. Химия. 2012. Т. 25 (64), № 3. С. 271–276.
10. Ahmedi A., Abouseoud M., Couvert A., Amrane A. Enzymatic degradation of Congo Red by turnip (*Brassica rapa*) peroxidase // *Zeitschrift für Naturforschung.* 2012. Vol. 67, № 7-8. P. 429–436. <https://doi.org/10.5560/ZNC.2012.67c0429>
11. Bania I., Mahanta R. Evaluation of peroxidases from various plant sources // *International Journal of Scientific and Research Publications.* 2012. Vol. 2, iss. 5. P. 1–5.
12. Poloznikov A. A., Zakharova G. S., Chubar T. A., Tishkov V. I., Gazaryan I. G. Site-directed mutagenesis of tobacco anionic peroxidase: Effect of additional aromatic acids on stability and activity // *Biochimie.* 2015. Vol. 115, № 1. P. 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.04.021>
13. Gaspar S., Popescu I. C., Gazaryan I. G., Csöregi E. Biosensors based on novel plant peroxidases: A comparative study // *Electrochimica Acta.* 2000. Vol. 46, № 2-3. P. 255–264. [https://doi.org/10.1016/S0013-4686\(00\)00580-6](https://doi.org/10.1016/S0013-4686(00)00580-6)
14. Thongsook T., Barrett D. Purification and partial characterization of broccoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*) peroxidases // *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2005. Vol. 53, № 8. P. 3206–3214. <https://doi.org/10.1021/jf048162s>
15. Somtürk B., Kalın R., Özdemir N. Purification of Peroxidase from Red Cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*) by Affinity Chromatography // *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 2014. Vol. 173, № 7. P. 1815–1828. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0968-1>
16. Riaz A., Kalsoom U., Bhatti H. N., Jesionowski T., Bilal M. Citrus limon peroxidase-assisted biocatalytic approach for biodegradation of reactive 1847 colfax blue P3R and 621 colfax blue R dyes // *Bioprocess and Biosystems Engineering.* 2023. Vol. 46. P. 443–452. <https://doi.org/10.1007/s00449-022-02802-z>
17. Соловьева А. А., Фам Т. Ч., Лебедева О. Е., Устинова М. Н. Деструкция бромфенолового синего с участием пероксидазы хрена // Известия высших учебных заведений. Серия: Химия и химическая технология. 2021. Т. 64, № 1. С. 93–98. <https://doi.org/10.6060/ivkkt.20216401.6267>
18. Никитенко А. Н., Егорова З. Е. Изменение активности полифенолоксидазы, аскорбиноксидазы и пероксидазы в процессе хранения яблок // Труды БГТУ. Химия, технология органических веществ и биотехнология. 2011. № 4. С. 216–219.
19. Щербаков В. Г., Лобанов В. Г., Прудникова Т. Н. Биохимия / под ред. В. Г. Щербакова. 2-е изд. СПб. : ГИОРД, 2003. 440 с.



20. Стенуро М. В., Квитайло И. В., Шутова К. С. Влияние температуры и pH среды на активность пероксидазы, выделенной из топинамбура // Известия вузов. Пищевая технология. 2010. № 1. С. 120–121.

References

- Selvaraj V., Karthika T. S., Mansiya C., Alagar M. An overview of recently developed techniques, mechanisms, and intermediate involved in the advanced azo dye degradation for industrial applications. *J. Mol. Struct.*, 2021, vol. 1224, pp. 129–195. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.129195>
- Routoula E., Patwardhan S. V. Degradation of anthraquinone dyes from effluents: A review focusing on enzymatic dye degradation with industrial potential. *Environ. Sci. Technol.*, 2019, vol. 54, no. 2, pp. 647–664. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b03737>
- Singh R. L., Singh P. K., Singh R. P. Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes. A review. *Int. Biodeterior. Biodegradation*, 2015, vol. 104, pp. 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.04.027>
- Imran M., Crowley D. E., Khalid A. Microbial biotechnology for decolorization of textile wastewaters. *Environ. Sci. Biotechnol.*, 2015, vol. 14, pp. 73–92. <https://doi.org/10.1007/s11157-014-9344-4>
- Baumer J. D., Valerio A., Guelli Ulson de Souza S. M., Erzinger G. S., Furigo Jr A., Ulsonde Souza A. A. Toxicity of enzymatically decolorized textile dyes solution by horseradish peroxidase. *J. Hazard. Mater.*, 2018, vol. 360, pp. 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.07.102>
- Sekuljica N. Z., Prlainovic N. Z., Jakovetic S. M., Grbavcic S. Z., Ognjanovic N. D., Knezevic-Jugovic Z. D., Mijin D. Z. Removal of anthraquinone dye by cross-linked enzyme aggregates from fresh horseradish extract. *Clean: Soil, Air, Water*, 2016, vol. 44, pp. 1–10. <https://doi.org/10.1002/clen.201500766>
- Terres J., Battisti R., Andreus J., Cesar de Jesus P. Decolorization and degradation of Indigo Carmine dye from aqueous solution catalyzed by horseradish peroxidase. *Biocatal. Biotransform.*, 2014, vol. 32, no. 1, pp. 64–73. <https://doi.org/10.3109/10242422.2013.873416>
- Farias S., de Oliveira D., Ulson de Souza A. A., Guelli U. de Souza S. M., Morgado F. Removal of reactive blue 21 and reactive red 195 dyes using horseradish peroxidase as catalyst. *Brazil. J. Chem. Eng.*, 2017, vol. 34, no. 3, pp. 701–707. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20170343s20160091>
- Viatkina O. V. Problems of isolation and purification of plant peroxidases. *Scientific Notes of V. I. Vernadsky Crimean Federal University. Biology. Chemistry*, 2012, vol. 25 (64), no. 3, pp. 271–276 (in Russian).
- Ahmedi A., Abouseoud M., Couvert A., Amrane A. Enzymatic degradation of Congo Red by turnip (*Brassica rapa*) peroxidase. *Zeitschrift für Naturforschung*, 2012, vol. 67, no. 7-8, pp. 429–436. <https://doi.org/10.5560/ZNC.2012.67c0429>
- Bania I., Mahanta R. Evaluation of peroxidases from various plant sources. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 2012, vol. 2, iss. 5, pp. 1–5.
- Poloznikov A. A., Zakharova G. S., Chubar T. A., Tishkov V. I., Gazaryan I. G. Site-directed mutagenesis of tobacco anionic peroxidase: Effect of additional aromatic acids on stability and activity. *Biochimie*, 2015, vol. 115, no. 1, pp. 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.04.021>
- Gaspar S., Popescu I. C., Gazaryan I. G., Csöregi E. Biosensors based on novel plant peroxidases: A comparative study. *Electrochimica Acta*, 2000, vol. 46, no. 2-3, pp. 255–264. [https://doi.org/10.1016/S0013-4686\(00\)00580-6](https://doi.org/10.1016/S0013-4686(00)00580-6)
- Thongsook T., Barrett D. Purification and partial characterization of broccoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*) peroxidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, vol. 53, no. 8, pp. 3206–3214. <https://doi.org/10.1021/jf048162s>
- Somtürk B., Kalın R., Özdemir N. Purification of Peroxidase from Red Cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata f. rubra*) by Affinity Chromatography. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2014, vol. 173, no. 7, pp. 1815–1828. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0968-1>
- Riaz A., Kalsoom U., Bhatti H. N., Jesionowski T., Bilal M. Citrus limon peroxidase-assisted biocatalytic approach for biodegradation of reactive 1847 colfax blue P3R and 621 colfax blue R dyes. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2023, vol. 46, pp. 443–452. <https://doi.org/10.1007/s00449-022-02802-z>
- Solovyeva A. A., Pham T. T., Lebedeva O. E., Ustinova M. N. Horseradish peroxidase catalyzed degradation of bromophenol blue dye. *The Journal ChemChemTech*, 2021, vol. 64, no. 1, pp. 93–98. <https://doi.org/10.6060/ivkkt.20216401.6267>
- Nikitenko A. N., Egorova Z. E. Changes in the activity of polyphenol oxidase, ascorbate oxidase and peroxidase during apple storage. *Trudy BGTU. Chemistry, Technology of Organic Compounds and Biotechnology*, 2011, no. 4, pp. 216–219 (in Russian).
- Shcherbakov V. G., Lobanov V. G., Prudnikova T. N. *Biokhimiia. Pod red. V. G. Shcherbakova* [Shcherbakov V. G., ed. Biochemistry. 2nd ed.]. St. Petersburg, GIORD, 2003. 440 p. (in Russian).
- Stepuro M. V., Kvitailo I. V., Shutova K. S. Influence of temperature and pH of the medium on the activity of peroxidase isolated from Jerusalem artichoke. *Izvestiya vuzov. Food Technology*, 2010, no. 1, pp. 120–121 (in Russian).

Поступила в редакцию 12.05.2023; одобрена после рецензирования 24.07.2023; принята к публикации 07.08.2023
The article was submitted 12.05.2023; approved after reviewing 24.07.2023; accepted for publication 07.08.2023

ЭКОЛОГИЯ

Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 4. С. 479–490

Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology, 2023, vol. 23, iss. 4, pp. 479–490
<https://ichbe.sgu.ru> <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-4-479-490>
EDN: SAKWZP

Научная статья
УДК 598.293.1:591.52

Городская популяция кряквы (*Anas platyrhynchos*) в Саратове: зимовка, гнездование, степень синантропизации

А. Е. Пушкова ✉, Е. Ю. Мосолова

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

Пушкова Алина Евгеньевна, студент 1-го курса магистратуры направления 06.04.01 «Биология», z89271017046@yandex.ru, <https://orcid.org/0009-0003-4874-5597>

Мосолова Екатерина Юрьевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры морфологии и экологии животных, ekmosolova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5555-2070>

Аннотация. Отражены данные по круглогодичным исследованиям городской популяции кряквы в Саратове, позволяющие оценить состояние и изучить факторы, влияющие на ее формирование. Представлена оценка численности популяции кряквы в зимние периоды 2020–2023 гг. Показано, что численность отрицательно коррелирует с морозами и осадками, а между количеством людей, подкармливающих уток, и численностью крякв имеется статистически значимая положительная связь. Оценивается состояние зимующей и гнездящейся популяции по индексу синантропизации, скорости и пути проникновения вида в урбанизированные ландшафты, определена стадия формирования городской популяции в Саратове. Выделяются адаптации кряквы к жизни в городских условиях и их влияние на экологию вида в целом. Подчеркивается необходимость дальнейших исследований влияния урбанизации на экологию кряквы и пользу этого вида для городской экосистемы. Отмечается важность мониторинга динамики численности для его адаптации к городской среде и поддержания устойчивости всей популяции. Кроме того, статья предоставляет основу для дальнейших исследований городской популяции кряквы и может являться ценным источником информации для разработки местных программ по управлению имеющимися ресурсами уток, обитающих в парковой зоне города.

Ключевые слова: *Anas platyrhynchos*, зимовка, гнездование, динамика, синантропизация, Саратов

Для цитирования: Пушкова А. Е., Мосолова Е. Ю. Городская популяция кряквы (*Anas platyrhynchos*) в Саратове: зимовка, гнездование, степень синантропизации // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 4. С. 479–490. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-4-479-490>, EDN: SAKWZP

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

Article

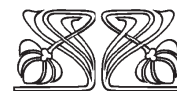
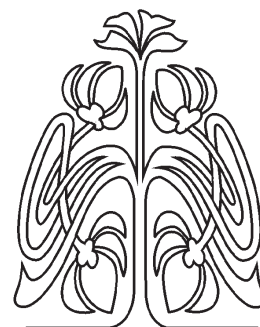
Urban mallard population (*Anas platyrhynchos*) in Saratov: Wintering, nesting, degree of synanthropization

А. Е. Pushkova ✉, Е. Yu. Mosolova

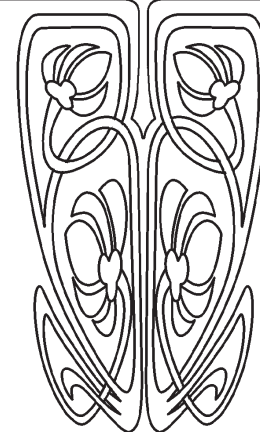
Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia

Alina E. Pushkova, z89271017046@yandex.ru, <https://orcid.org/0009-0003-4874-5597>

Ekaterina Yu. Mosolova, ekmosolova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5555-2070>



**НАУЧНЫЙ
ОТДЕЛ**





Abstract. The article reflects data on year-round studies of the urban mallard population in Saratov, allowing the assessment of the condition and the study of the factors influencing its formation. An estimate of the mallard population in the winter periods of 2020–2023 is presented. It is shown that the number negatively correlates with frosts and precipitation, and there is a statistically significant positive relationship between the number of people feeding ducks and the number of mallards. The state of the wintering and nesting population is assessed according to the index of synanthropization, the rate and path of penetration of the species into urbanized landscapes, and the stage of formation of the urban population in Saratov is determined. Adaptations of mallards to life in urban conditions and their impact on the ecology of the species as a whole are highlighted. The article emphasizes the need for further research on the impact of urbanization on mallard ecology and the benefits of this species for the urban ecosystem. The importance of monitoring population dynamics for its adaptation to the urban environment and maintaining the stability of the entire population is noted. In addition, the article provides a basis for further studies of the urban mallard population and can be a valuable source of information for the development of local programs for managing the available resources of ducks living in the park area of the city.

Keywords: *Anas platyrhynchos*, wintering, nesting, dynamics, synanthropization, Saratov

For citation: Pushkova A. E., Mosolova E. Yu. Urban mallard population (*Anas platyrhynchos*) in Saratov: Wintering, nesting, degree of synanthropization. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2023, vol. 23, iss. 4, pp. 479–490 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-4-479-490>, EDN: SAKWZP

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

Введение

Кряква (*Anas platyrhynchos* Linnaeus, 1758) является одним из самых распространенных и многочисленных видов водоплавающих птиц в мире. Её популяция в Европе оценивается в 2,8–4,6 млн пар, в европейской части России, по последним оценкам, гнездится 70–1400 тыс. пар [1, 2]. Благодаря своей пластичности вид проявляет значительную тенденцию к синантропизации, так как в городах создаются хорошие условия для зимовки благодаря большому количеству антропогенной пищи, более высоким зимним температурам и меньшему давлению хищников [3]. В начале XX в. этот вид зимовал во многих городах Центральной Европы [4, 5], однако в то время наблюдались только небольшие стаи или одиночные птицы. В настоящее время тысячи особей ежегодно зимуют в различных европейских городах [6–8]. Формирование городских популяций этого вида в европейской части России происходило во второй половине XX в. и сопровождалось образованием устойчивых оседлых гнездовых и зимовочных популяций на незамерзающих участках естественных и искусственных водоёмов [9–12 и др.]. Самые многочисленные зимние скопления кряквы находятся в г. Москве. Здесь постоянные зимовки вида сформировались в конце 1970-х гг. по мере развития города с образованием не замерзающих зимой водоёмов. Учёты, проведенные в 1981 г., выявили в г. Москве 12 тыс. зимующих крякв [13]. В 2015 г. в этом городе зимовало около 30 тыс. уток [14]. Появление и увеличение в зимний период крякв наблюдается во всех крупных городах европейской части России. За восемь лет проведения среднезимних учётов водоплавающих птиц в рамках акции «Серая шейка» (с 2015 г.) суммарная численность кряквы в тридцати городах России выросла с 49,3 до 75,6 тыс. птиц [15].

В Саратове постоянные зимовки кряквы наблюдаются с 2011 г., за 11 лет её численность стремительно увеличилась. В первые годы формирования зимовочных скоплений в Городском парке им. М. А. Горького насчитывалось от 10 до 20 особей. В зимние периоды 2020–2023 гг. зарегистрировано более тысячи особей. При этом максимальные показатели отмечались с наступлением холодов и постепенным замерзанием водоёмов.

Увеличение численности зимующих уток вследствие перехода части особей к оседлому образу жизни является одним из факторов смены естественных условий обитания на городские. Кроме того, появление оседлых популяций кряквы ведет к возрастанию количества размножающихся особей на городских водоёмах, а полное отсутствие охотничьего пресса в разы увеличивает успешность размножения данного вида [16, 17].

В целом формирование городских популяций птиц в каждом регионе зависит от особенностей местного урбанизационного процесса, соотношения темпов роста основы агломерации и степени развитости сети более мелких населённых пунктов за пределами крупных городов [18]. Это определило цель нашего исследования: изучить факторы, определяющие формирование и состояние городской популяции кряквы в Саратове в различные сезоны года.

Материалы и методы

Изучение городской популяции кряквы в Саратове осуществлялось нами круглогодично в 2020–2023 гг. В ходе проведения зимних исследований производился маршрутный и точечный учет зимующих крякв в Городском парке культуры и отдыха им. М. А. Горького



г. Саратова, на незамерзающих участках акватории Волгоградского водохранилища. При учете в городском парке отмечались места скопления уток, производилась фотосъемка для дальнейшего точного подсчета особей и изучения половой структуры в стаях. Наблюдения за численностью проводились раз в пентаду, а также выполнялись внеплановые посещения в дни резкой смены температурного режима и выпадения осадков с фиксацией погодных условий. Оценивалась интенсивность питания, выраженная в количестве людей, кормящих птиц в час [19].

Во время летних учетов, которые велись на территории городского парка и прудов Кировского и Ленинского районов города, фиксировались гнездящиеся самки, количество птенцов в выводках, возраст которых определяли по шкале, разработанной американскими орнитологами и модифицированной Ю. А. Исаковым [20]. Сроки вылупления птенцов и откладки первого яйца самками определяли методом обратного отсчета, исходя из возраста птенцов и принимая средний срок насиживания за 28 дней. Успешность размножения оценивали по числу утят в выводке с момента появления выводка и до подъема на крыло [9].

Для оценки степени приспособления птиц к соседству с человеком для гнездящихся и зимующих крякв был рассчитан простейший индекс синантропизации по формуле, предложенной А. Г. Резановым [21], при помощи которого может быть определена степень синантропности той или иной популяции вида, а также внутрипопуляционной группировки и отдельной гнездовой пары:

$$I_s = \Sigma r / \Sigma \max \leq 1,$$

где Σr – общая сумма полученных баллов по критериям; $\Sigma \max$ – сумма максимально возможных (потенциальных) баллов.

Кроме этого, для выяснения скорости и путей проникновения кряквы в городские местообитания г. Саратова использована шкала синантропизации, стадии от нулевой до четвертой (с некоторыми модификациями), разработанная польским орнитологом Л. Томялойч [22] при изучении городской популяции вяхиря (*Columba palumbus*):

стадия 0. Исходное состояние – гнездование на водоемах, отдаленных от человеческих поселений;

стадия 1. Фаза начальной синантропизации. Гнездование малого количества птиц на периферийных водоемах городов. Появление единичных пар на обширных слабоурбанизированных водоемах крупных городов;

стадия 2. Гнездование на городских прудах и в парках выше, чем на водоемах за пределами населенных пунктов;

стадия 3. Частое гнездование на водоемах с постоянным посещением человеком, довольно частое в городских парках;

стадия 4. Повсеместное и довольно многочисленное гнездование на городских водоемах и очень многочисленное в городских парках.

Проверку гипотез о нормальности распределения выборок проводили с использованием критерия Шапиро – Уилка (W). Все выборки по местам скопления уток не имели значимого отклонения от нормального распределения ($P > 0.08$). Поэтому для характеристики выборок применяли методы описательной статистики (средняя арифметическая, стандартная ошибка (SE), размах варьирования (min – max). Перечисленные показатели устанавливали для интегральных выборок, стратифицированных по типу дня недели («рабочий»: понедельник – пятница; «выходной»: суббота и воскресенье). Значимость различия между средними для этих интегральных выборок устанавливали методом одномерного дисперсионного анализа (one-way ANOVA) по F -критерию Фишера (дисперсии были гомогенны: тест Ливена, $P > 0.08$).

Согласованность варьирования переменных устанавливали методом корреляционного анализа (коэффициент регрессии Пирсона, r). Линейность связи между ними проверяли по F -критерию Фишера. При наличии статистически значимого линейного тренда строили модели методом простой линейной регрессии. Статистическую значимость коэффициентов модели (угловой коэффициент и свободный член) оценивали по t -критерию Стьюдента. Гипотезу о значимости различий между линейными моделями при стратификации выборок по типу дня недели проверяли методом ковариационного анализа (ANCOVA). Гомогенность угла наклона линий регрессии оценивали по F -критерию Фишера. Статистическую обработку материала проводили в пакетах программ PAST 4.09 [19].

Результаты и их обсуждение

Встречи кряквы в черте г. Саратова в зимний период известны с начала 1980-х гг. Так, С. Н. Варшавский с соавторами [23] указывает на встречи в феврале 1981 г. на р. Волге у г. Саратова стаи из 400 крякв, преимущественно селезней. В 1990-е гг. известны случаи зимовки небольших групп уток на водоемах, образованных теплыми промышленными водами в Ленинском и Заводском районах, а также в месте сброса сточных вод



В марте большинство уток покидает парк, направляясь к местам размножения, однако с понижением температуры до -15°C 11.03.2020

г. численность уток резко возросла, составив 1066 особей, а затем вновь стабилизировалась (рис. 3).

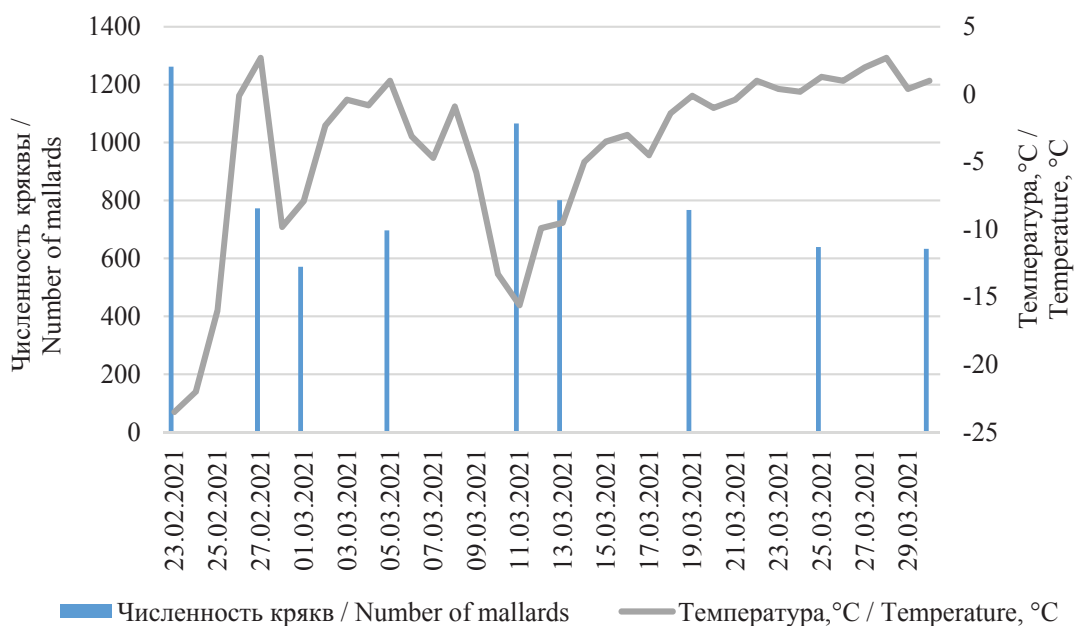


Рис. 3. Изменение численности кряквы в городском парке в феврале – марте 2021 г. (цвет онлайн)
 Fig. 3. The change in the number of mallards in the city park in February – March 2021 (color online)

В осеннее-зимний период 2021–2022 гг. численность кряквы в городском парке Саратова возросла по сравнению с сезоном предыдущего года. Отметку в 1000 особей удалось зафиксиро-

вать уже в октябре (рис. 4), а к февралю максимальное число уток составило около 1300 особей, при этом ощутимого понижения температуры воздуха (ниже -10°C) не наблюдалось (рис. 5).

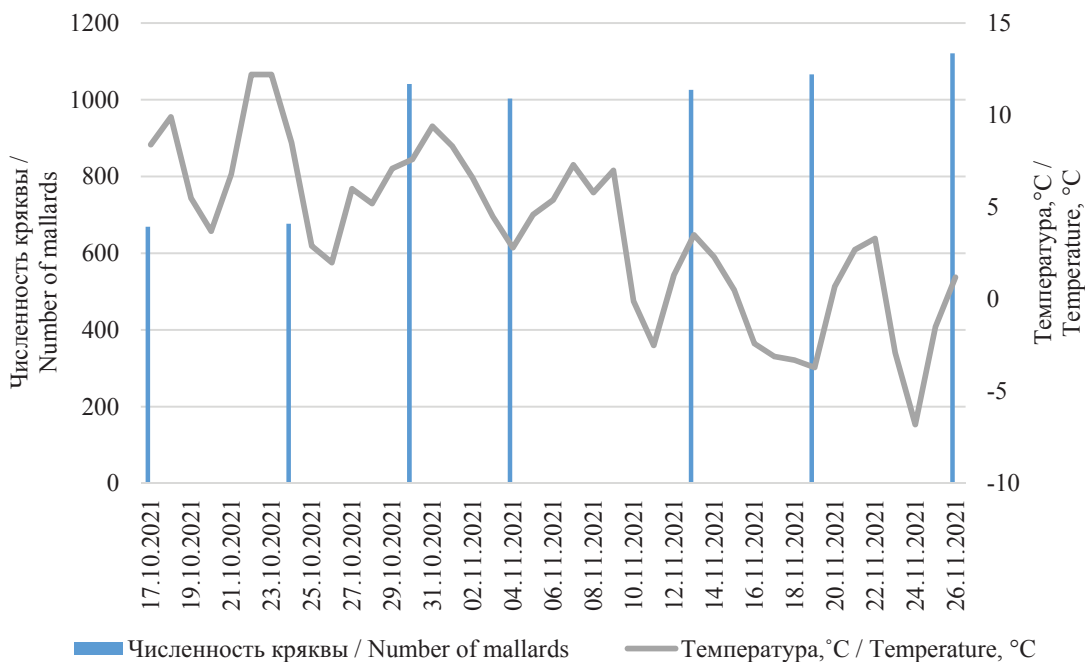


Рис. 4. Формирование зимовки кряквы в городском парке в октябре–ноябре 2021 г. (цвет онлайн)
 Fig. 4. Formation of mallard wintering in the city park in October–November 2021 (color online)

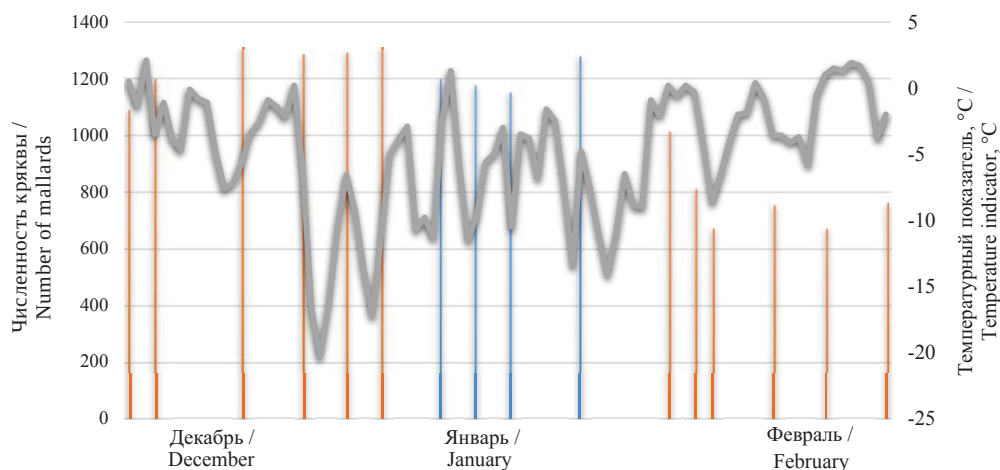


Рис. 5. Изменение численности кряквы в зависимости от температурных показателей в декабре 2021 г. – феврале 2022 г. (цвет онлайн)

Fig. 5. The change in the number of mallards depending on temperature indicators in December 2021 – February 2022 (color online)

В январе 2022 г. численность уток менялась в пределах не более 30 особей, в феврале количество крякв постепенно сокращалось, вероятно, с более частым появлением положительных температур (см. рис. 5).

В зимний период 2022–2023 гг. произошло незначительное снижение численности уток в парке: максимальное число особей было за-

фиксировано 14 января, составив 1069 уток (рис. 6). Однако в последующий период (вторая половина января – февраль) количество уток в парке постепенно уменьшалось до 749–687 особей. В начале марта в парке оставалось 590–450 крякв. Данное явление может быть связано с относительно теплой и малоснежной зимой.

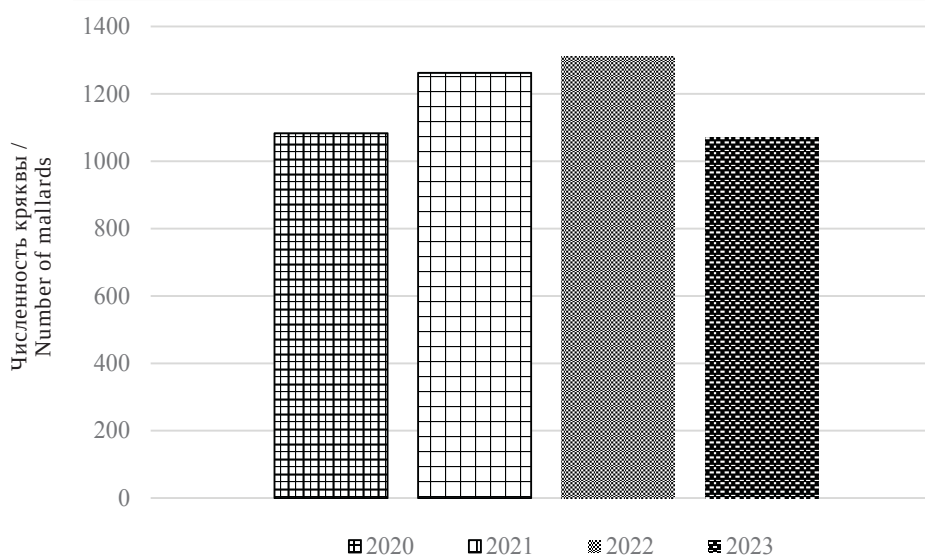


Рис. 6. Динамика максимальной численности кряквы в городском парке в 2020–2023 гг.

Fig. 6. Dynamics of the maximum number of mallards in the city park in 2020–2023

Распределение уток по водоемам городского парка в зимний период носит неравномерный характер. Основными факторами являются наличие и стабильность подкормки, а также присутствие открытой воды.

Наличие постоянной подкормки со стороны человека оказывает влияние как на распределение уток по территории парка, так и на их количество в целом (табл. 1). Так, в будние дни утки преимущественно концентрируются



в местах с наибольшей проходимостью человека: у входов в городской парк и по постоянным маршрутам людей, в то время как в выходные дни распределение кряквы больше зависит от наличия открытой воды, что связано с тем, что в это время посещаемость парка выше, и люди не просто следуют через городской парк, а приходят сюда специально, в том числе кормить птиц.

Таблица 1 / Table 1

Численность уток (среднее значение) и количество людей, осуществляющих подкормку в выходные и рабочие дни
The number of ducks (average value) and the number of people feeding on weekends and working days

Тип дня недели Type of day of the week	MN, чел. MN, hum.	DN, ос. DN, sp.
Рабочий Workday	8 ± 1 3 – 16	169 ± 16 53 – 389
Выходной Weekend	8 ± 1 2 – 18	150 ± 18 58 – 296
\bar{F} P	0.001 0.97	0.62 0.43

Примечание. В числителе – средняя арифметическая и стандартная ошибка (SE), в знаменателе – размах варьирования (min – max).

Note. In the numerator – the arithmetic mean and standard error (SE), in the denominator – the range of variation (min – max).

При этом отсутствуют статистически значимые различия при парном сравнении количества людей, участвовавших в кормлении уток в рабочие и выходные дни, а также между количеством уток в эти дни (см. табл. 1). Поэтому вполне естественным представляется отсутствие различий между регрессионными моделями, связывающими эти параметры, полученными отдельно для двух категорий дней недели (ANCOVA: углы наклона линий регрессии гомогенны, $F = 0.11$, $P = 0.74$). Результаты ковариационного анализа позволяют перейти к построению интегральной модели без стратификации выборок по типу дня недели.

Применение корреляционного анализа показало согласованное варьирование между количеством людей, принимавших участие в кормлении уток, и численностью кряквы ($r = 0.87$, $t = 13.22$, $P < 0.0001$). При реализации регрессионного анализа установлен линейный характер связи между переменными и значимость модели в целом ($F_{1,54} = 174.66$, $P < 0.0001$), а также статистическая значимость коэффициента регрессии (табл. 2).

Таблица 2 / Table 2

Коэффициенты регрессионной модели, связывающей количество людей, принимающих участие в кормлении уток, и численностью крякв на участках подкормки
Coefficients of a regression model linking the number of people taking part in feeding ducks and the number of mallards at feeding sites

Коэффициенты Coefficients	$B \pm SE$	t_{54}	P
Intersept	18.82 ± 10.91	1.72	0.09
b	18.44 ± 1.40	13.22	<0.0001

Стандартизированные остатки модели распределены нормально (в их распределении отсутствуют выраженный паттерн, а также отсутствуют значения, отклоняющиеся от предсказанных более, чем на 3 стандартных отклонения), а влиятельных наблюдений не обнаружено (дистанция Кука намного меньше 1). На основании вышеуказанного есть основания признать параметры модели валидными.

Анализ коэффициентов модели указывает, что между количеством людей, подкармливающих уток, и численностью крякв имеется статистически значимая положительная связь: с увеличением значения предиктора на единицу, численность крякв возрастает на 18 особей. Полученная модель объясняет более 75% дисперсии фактических данных ($R^2 = 0.76$) (рис. 7).

При установлении постоянных минусовых температур полыньи на акваториях Волгоградского водохранилища замерзали, лишая уток естественного корма, в результате птицы в дневное время перемещались на пруды городского парка, где оказывалась подкормка со стороны людей.

Расчет коэффициента корреляции (рис. 8) показал, что численность отрицательно коррелирует с морозами и осадками, вероятно, это связано с уменьшением площадей открытой воды и количеством посетителей парка, оказывающих подкормку птицам. Места концентрации уток при низких температурах (-15 – -20°C) располагаются на участках, прилегающих к выходам и местам с наибольшей подкормкой от населения. Птицы размещаются небольшими группами, в которых преобладают самцы, или парами, некоторые из которых переходят к оседлому образу жизни.

Смягчение зимних условий в результате урбанизации позволило успешно зимовать сначала отдельным особям, а затем группам разной численности, поскольку кряквы, остающиеся

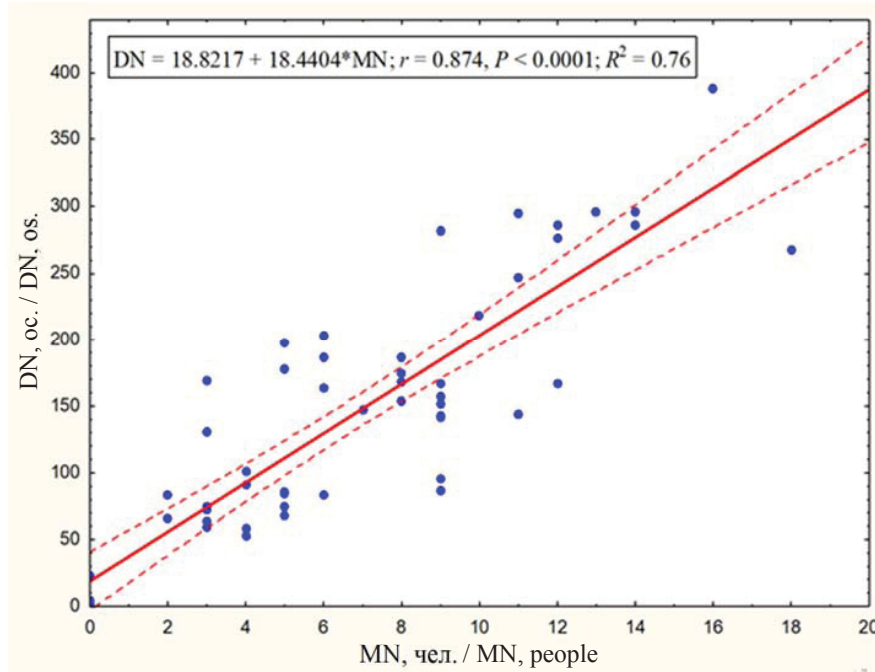


Рис. 7. Влияние количества людей, осуществляющих подкормку кряквы (MN, чел.), на количество уток (DN, ос.) в местах их скопления

Fig. 7. The influence of the number of people feeding mallards (MN, people) on the number of ducks (DN, os.) in the places of their accumulation

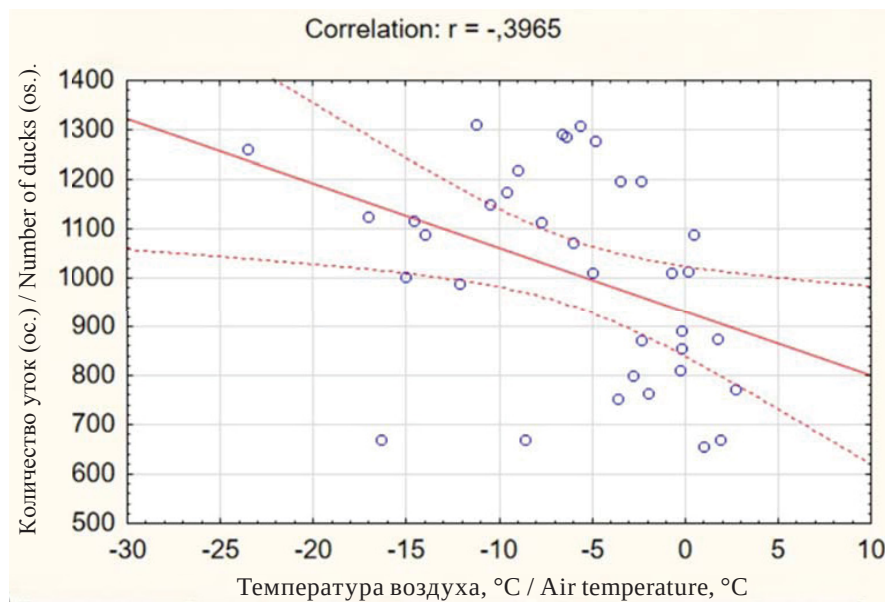


Рис. 8. Влияние температуры воздуха (°C) на количество уток (ос.) в местах их скопления

Fig. 8. The effect of air temperature (°C) on the number of ducks (os.) in places of their accumulation

зимой на незамерзающих участках водоемов средних широт, привлекают перелётных птиц, за счет чего количество зимующих особей быстро увеличивается [9]. Увеличение числен-

ности зимующих уток вследствие перехода части особей к оседлому образу жизни является одним из факторов смены естественных условий обитания на городские. Кроме того,



появление оседлых популяций кряквы ведет к возрастанию количества размножающихся особей на городских водоемах, а полное отсутствие охотничьего пресса в разы увеличивает успешность размножения данного вида.

В гнездовой период 2021 г. на водоемах городского парка, прудах Кировского и Ленинского районов г. Саратова (Зеркальный, Монахов, Семхоз, Андреевские пруды) нами было зафиксировано 21 выводок, с общим количеством птенцов 74 особи, в 2022 г. – 24 выводка с 86 птенцами. Количество птенцов в одном выводке колебалось от 1 до 12 шт., в среднем 5 особей. При этом выживаемость птенцов (количество выживших до момента поднятия на крыло) составила более 70% ежегодно.

Городская популяция г. Саратова находится на третьей стадии формирования, когда заметно частое гнездование на водоемах с постоянным посещением человеком, довольно частое в городских парках. Индекс синантропизации для гнездящейся в г. Саратове популяции крякв составляет 0.50, в зимний период – 0.94.

При урбанизации изменяется не только численность птиц, но и их поведение и экология. Адаптации кряквы к жизни в городе, рядом с человеком, разнообразны. Прежде всего к ним относятся изменение типа питания и способы добычи пищи, сезонные и суточные перелеты, переход к дневному образу жизни, смещение и растянутость сроков размножения, а также толерантность к человеку. На территории городских водоемов дистанция вспугивания зимой составляет 0.5–3 метра, в то время как летом расстояние увеличивается до 10 метров. В естественной среде дистанция вспугивания составляет 100–150 м.

Заключение

Урбанизация кряквы (за последнее десятилетие) на территории Саратовской области происходит достаточно быстро. Обилие и доступность кормов антропогенного происхождения – важнейший фактор увеличения зимующих и гнездящихся крякв в населенных пунктах, хорошая защищенность от неблагоприятных факторов (ветра, низких температур, большого числа хищников) объясняет существование крупных зимовок кряквы в европейской части России, в том числе и в Саратовской области, а отсутствие охотничьего пресса – хорошую вероятность выживаемости выводков.

Численность уток в городском парке Саратова отрицательно коррелирует с морозами и осадками, вероятно, это связано с уменьше-

нием площадей открытой воды и количеством посетителей парка, оказывающих подкормку птицам. Между количеством людей, подкармливающих уток, и численностью крякв имеется статистически значимая положительная связь: с увеличением значения предиктора на единицу, численность крякв возрастает на 18 особей.

Согласно рассчитанным индексам синантропизации наиболее приспособленным к антропогенному ландшафту является зимующая популяция кряквы, наименее приспособленным – гнездящаяся, которая с опаской приближается к человеку, особенно самки с птенцами.

Список литературы

1. European breeding bird atlas 2 : 2 : Distribution, Abundance and Change. Barcelona European Bird Census Council & Lynx Edicions, 2020. 960 p.
2. Атлас гнездящихся птиц европейской части России. 2020 / ред.-сост. М. В. Калякин, О. В. Волцит. М. : Фитон XXI, 2020. 908 с.
3. Luniak M. Synurbization – adaptation of animal wildlife to urban development // Proceedings of the 4th International Symposium on Urban Wildlife Conservation. Tucson, Arizona, 1999. P. 50–55.
4. Zimmer C. Die Vögel der Stadt Breslau // Berichte des Vereins Schlesischer Ornithologen. 1908. № 1. P. 11–15.
5. Pulliainen E. On the history, ecology and ethology of the Mallards (*Anas platyrhynchos* L.) overwintering in Finland // Ornis Fennica. 1963. № 40. P. 45–66.
6. Dyrzc A. The passages and wintering of water birds on the Odra near Wroclaw // Acta Zoologica Cracoviensa. 1971. № 16. P. 291–308.
7. Berliner Ornithologische Arbeitsgemeinschaft. Ergebnisse der Wasservogelzählung in Berlin für die Zählperiode Oktober 1995 bis März 1996 // Berliner Ornithologische Berichte. 1966. № 6. P. 80–92.
8. Kupczyk M. *Anas platyrhynchos* (Linnaeus, 1758) – Mallard // Birds of Greater Poland. Faunistic monograph. Poznań : Bogucki Wydawnictwo Naukowe, 2000. P. 92–97.
9. Авилова И. В., Корбут В. В., Фокин С. Ю. Урбанизированная популяция водоплавающих (*Anas platyrhynchos*) г. Москвы. М. : МГУ – ЦНИЛ Главохоты РФ, 1994. 176 с.
10. Храбрый В. М. Многолетняя динамика численности зимующей кряквы (*Anas platyrhynchos*) в Санкт-Петербурге // Актуальные проблемы изучения и охраны птиц Восточной Европы и Северной Азии : материалы междунар. конф. Казань : Изд-во «Матбугат йорты», 2001. С. 624–625.
11. Авилова К. В. История формирования городской группировки кряквы в Москве // Казарка. 2005. № 7. С. 240–255.



12. Соловьев А. Н. Зимовки кряквы *Anas platyrhynchos* (Anatidae, Aves) в естественных и антропогенных условиях востока Русской равнины // Поволжский экологический журнал. 2014. № 2. С. 271–283.
13. Благосклонов К. Н. Дикие утки в Москве // Наука и жизнь. 1982. № 7. С. 146–147.
14. Авилова К. В. Структура и долговременная динамика зимнего населения кряквы (*Anas platyrhynchos*) в Москве // Зоологический журнал. 2018. Т. 297, № 3. С. 309–320. <https://doi.org/10.7868/S0044513418030054>
15. Авилова К. В., Полежанкина П. Г. Всероссийская акция союза охраны птиц России «Серая шейка»: результаты зимнего учёта водоплавающих и околоводных птиц в 2015–2022 гг. // Актуальные проблемы охраны птиц России: материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвящённой 30-летию Союза охраны птиц России / отв. ред. В. Н. Мельников. Махачкала : Изд-во ИП Овчинников Михаил Артурович, 2023. С. 143–145.
16. Исаков Ю. А. Процесс синантропизации животных, его следствия и перспективы // Синантропизация и domestикация животного населения. М. : Изд-во Московского ун-та, 1969. С. 3–69.
17. Авилова К. В., Зубакин В. А., Ерёмкин Г. С., Лыков Е. Л., Панфилова И. М. Пути освоения водоплавающими птицами городской среды обитания // Русский орнитологический журнал. 2019. Т. 28. Экспресс-выпуск 1764. С. 1982–1989.
18. Фридман В. С. Модели урбанизации «диких» видов птиц. URL: <https://www.academia.edu/12003243/> (дата обращения: 22.02.2023).
19. Hammer O. D., Harper A. T., Ryan P. D. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis // Paleontologia Electronica. 2001. Vol. 4, № 1. P. 1–9.
20. Исаков Ю. А. Учет и прогнозирование численности водоплавающих птиц // Организация и методы учета птиц и вредных грызунов. М. : Изд-во АН СССР, 1953. С. 57–63.
21. Резанов А. А., Резанов А. Г. Индекс оценки степени синантропизации у птиц на основе их антрополегантности: эколого-поведенческое обоснование // Вестник МГПУ. Сер. Естественные науки. 2014. № 1 (13). С. 16–22.
22. Tomialojc L. The urban population of the Woodpigeon *Columba palumbus* Linnaeus, 1758, in Europe – its origin, increase and distribution // Acta Zoologica Cracoviensia. 1976. Vol. 21, № 18. P. 585–632.
23. Варшавский С. Н., Тучин А. В., Щепотьев Н. В. Птицы Саратовской области // Орнитофауна Саратовской области (в помощь учителям биологии). Саратов : Изд-во гос. пед. ин-та, 1994. С. 14–62.
24. Завьялов Е. В., Шляхтин Г. В., Табачишин В. Г., Якушев Н. Н., Хрустов И. А. Птицы севера Нижнего Поволжья. Книга I. История изучения, общая характеристика и состав орнитофауны. Саратов : Изд-во Сарат. ун-та, 2005. 296 с.

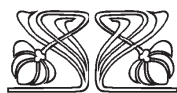
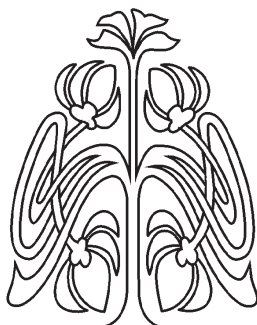
References

1. *European breeding bird atlas 2 : 2 : Distribution, Abundance and Change*. Barcelona European Bird Census Council & Lynx Edicions, 2020. 960 p.
2. *Atlas gnezdyashchikhysya ptits evropeyskoy chasti Rossii. 2020. Red.-sost. M. V. Kalyakin, O. V. Volcit* [Kalyakin M. V., Volcit O. V., comp. eds. Atlas of nesting birds of the European part of Russia]. Moscow, Phytion XXI, 2020. 908 p. (in Russian).
3. Luniak M. Synurbization – adaptation of animal wildlife to urban development. *Proceedings of the 4th International Symposium on Urban Wildlife Conservation*. Tucson, Arizona, 1999, pp. 50–55.
4. Zimmer C. Die Vögel der Stadt Breslau. *Berichte des Vereins Schlesischer Ornithologen*, 1908, no. 1, pp. 11–15.
5. Pulliainen E. On the history, ecology and ethology of the Mallards (*Anas platyrhynchos* L.) overwintering in Finland. *Ornis Fennica*, 1963, no. 40, pp. 45–66.
6. Dyrz A. The passages and wintering of water birds on the Odra near Wrocław. *Acta Zoologica Cracoviensia*, 1971, no. 16, pp. 291–308.
7. Berliner Ornithologische Arbeitsgemeinschaft. Ergebnisse der Wasservogelzählung in Berlin für die Zählperiode Oktober 1995 bis März 1996. *Berliner Ornithologische Berichte*, 1966, no. 6, pp. 80–92.
8. Kupczyk M. *Anas platyrhynchos* (Linnaeus, 1758) – Mallard. In: *Birds of Greater Poland. Faunistic monograph*. Poznań, Bogucki Wydawnictwo Naukowe, 2000, pp. 92–97 (in Polish).
9. Avilova I. V., Korbut V. V., Fokin S. Yu. *Urbanizirovannaya populyatsiya vodoplavayushchikh (Anas platyrhynchos) g. Moskvy* [Urbanized waterfowl population (*Anas platyrhynchos*) of Moscow]. Moscow, MSU – TSNIL Glavokhoty RF, 1994. 176 p. (in Russian).
10. Khrabry V. M. Long-term dynamics of the number of wintering mallards (*Anas platyrhynchos*) in St. Petersburg. In: *Actual problems of studying and protecting birds of Eastern Europe and Northern Asia. Materials of the International Conference*. Kazan, Izd-vo «Matbugat yorty», 2001, pp. 624–625 (in Russian).
11. Avilova K. V. The history of the formation of the mallard urban grouping in Moscow. *Kazarka*, 2005, no. 7, pp. 240–255 (in Russian).
12. Soloviev A. N. Wintering mallards *Anas platyrhynchos* (Anatidae, Aves) in natural and anthropogenic conditions of the East of the Russian plain. *Povolzhskiy Journal of Ecology*, 2014, no. 2, pp. 271–283 (in Russian).
13. Blagosklonov K. N. Wild ducks in Moscow. *Nauka i zhizn*, 1982, no. 7, pp. 146–147 (in Russian).
14. Avilova K. V. Structure and long-term dynamics of the winter population of mallards (*Anas platyrhynchos*) in Moscow. *Zoological Journal*, 2018, vol. 297, no. 3, pp. 309–320 (in Russian). <https://doi.org/10.7868/S0044513418030054>
15. Avilova K. V., Polezhankina P. G. All-Russian action of the Union for the Protection of Birds of Russia «Gray



- neck»: results of winter accounting of waterfowl and near-water birds in 2015–2022. In: Melnikov V. N., ed. *Actual problems of bird protection in Russia. Materials of the All-Russian scientific and practical conference dedicated to the 30th anniversary of the Union for the Protection of Birds of Russia*. Makhachkala, Izd-vo IP Ovchinnikov Mikhail Arturivich, 2023, pp. 143–145 (in Russian).
16. Isakov Yu. A. The process of synanthropization of animals, its consequences and prospects. In: *Sinanthropizatsiya i domestikatsiya zhivotnogo naseleniya* [Synanthropization and domestication of the animal population]. Moscow, Moscow University Press, 1969, pp. 3–69 (in Russian).
 17. Avilova K. V., Zubakin V. A., Eremkin G. S., Lykov E. L., Panfilova I. M. Ways of waterfowl development of urban habitat. *Russian Ornithological Journal*, 2019, vol. 28, express iss. 1764, pp. 1982–1989 (in Russian).
 18. Friedman V. S. *Models of urbanization of «wild» bird species*. Available at: <https://www.academia.edu/12003243/> (accessed February 22, 2023).
 19. Hammer O. D., Harper A. T., Ryan P. D. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica*, 2001, vol. 4, no. 1, pp. 1–9.
 20. Isakov Yu. A. Accounting and forecasting of the number of waterfowl. In: *Organizatsiya i metody ucheta ptits i vrednykh gryzunov* [Organization and methods of accounting for birds and harmful rodents]. Moscow, Izd-vo AN USSR, 1953, pp. 57–63 (in Russian).
 21. Rezanov A. A., Rezanov A. G. Index of assessment of the degree of synanthropization in birds based on their anthropotolerance: Ecological-behavioral justification. *Bulletin of the Moscow State Pedagogical University. Ser. Natural Sciences*, 2014, no. 1 (13), pp. 16–22 (in Russian).
 22. Tomialojc L. The urban population of the Woodpigeon *Columba palumbus* Linnaeus, 1758, in Europe – its origin, increase and distribution. *Acta Zoologica Cracoviensia*, 1976, vol. 21, no. 18, pp. 585–632.
 23. Varshavsky S. N., Tuchin A. V., Shchepotuyev N. V. Birds of the Saratov region. In: *Ornitofauna Saratovskoy oblasti (v pomoshch' uchitelyam biologii)* [Ornithofauna of the Saratov region (to help biology teachers)]. Saratov, Izd-vo gos. ped. in-ta, 1994, pp. 14–62 (in Russian).
 24. Zavyalov E. V., Shlyakhtin G. V., Tabachishin V. G., Yakushev N. N., Krustov I. A. *Ptitsy severa Nizhnego Povolzh'ya: v 5 kn. Kniga I. Istoriya izucheniya, obshchaya kharakteristika i sostav ornitofauny* [Birds of the North of the Lower Volga region: in 5 books. Book I. History of study, general characteristics and composition of avifauna]. Saratov, Saratov State University Publ., 2005. 296 p. (in Russian).

Поступила в редакцию 01.07.2023; одобрена после рецензирования 16.07.2023; принята к публикации 17.07.2023
The article was submitted 01.07.2023; approved after reviewing 16.07.2023; accepted for publication 17.07.2023



ПОДПИСКА

Подписка на печатную версию

Подписной индекс издания 36013

Оформить подписку на печатную версию

можно в интернет-каталоге

ГК «Урал-Пресс» (ural-press.ru)

Журнал выходит 4 раза в год

Цена свободная

Электронная версия журнала находится

в открытом доступе (ichbe.sgu.ru)

Адрес Издательства

Саратовского университета (редакции):

410012, Саратов, Астраханская, 83

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

Факс: +7 (845-2) 27-85-29

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

Адрес редколлегии серии:

410012, Саратов, Астраханская, 83,

СГУ имени Н. Г. Чернышевского,

биологический факультет

Тел./факс: +7 (845-2) 22-51-38

E-mail: ichbe-sgu@yandex.ru

Website: <https://ichbe.sgu.ru>

ISSN 1816-9775

23004



9 771816 977503

ISSN 1816-9775 (Print). ISSN 2541-8971 (Online)
Известия Саратовского университета. Новая серия.
Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Том 23, выпуск 4

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

