

**Министерство образования и науки Российской Федерации**  
**Федеральное государственное бюджетное образовательное**  
**учреждение высшего образования**  
**«Тульский государственный университет»**

**16+**

**ISSN 2071-6176**

**ИЗВЕСТИЯ**  
**ТУЛЬСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО**  
**УНИВЕРСИТЕТА**

**ЕСТЕСТВЕННЫЕ НАУКИ**

**Выпуск 1**

**Тула**  
**Издательство ТулГУ**  
**2016**

УДК 54, 57-61, 63

Известия ТулГУ. Естественные науки. Вып. 1. Тула: Изд-во ТулГУ, 2016. 127 с.

Публикуются результаты научных исследований в области химии, биологии, биотехнологии. Материалы предназначены для научных работников, преподавателей вузов, студентов и аспирантов, специализирующихся в проблематике технических наук.

*Редакционный совет*

**М.В. ГРЯЗЕВ** – председатель, **В.Д. КУХАРЬ** – зам. председателя, **В.В. ПРЕЙС** – главный редактор, **А.А. МАЛИКОВ** – отв. секретарь, **И.А. БАТАНИНА**, **О.И. БОРИСКИН**, **А.Ю. ГОЛОВИН**, **В.Н. ЕГОРОВ**, **В.И. ИВАНОВ**, **Н.М. КАЧУРИН**, **В.М. ПЕТРОВИЧЕВ**

*Редакционная коллегия*

О.Н. Понаморева (отв. редактор), А.А. Горячева (отв. секретарь), В.А. Алфёров, О.В. Александрович, Ю.М. Атрощенко, И.В. Блохин, В.В. Иванищев, М.Б. Каримов, Н.Ф. Кизим, Ю.А. Ким, А.А. Короткова, Н.П. Матвейко, Е.Н. Музафаров, А.Н. Решетилов, И.В. Шахкельдян.

***Подписной индекс 27845  
по Объединённому каталогу «Пресса России»***

Сборник зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор) ПИ № ФС77-61106 от 19 марта 2015 г.

## ХИМИЧЕСКИЕ НАУКИ

УДК: 543.9:663

### КЛЕТКИ МИКРООРГАНИЗМОВ КАК СТРУКТУРООБРАЗУЮЩИЕ АГЕНТЫ В СИНТЕЗЕ ГИБРИДНЫХ КРЕМНИЙОРГАНИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ ЗОЛЬ-ГЕЛЬ ТЕХНОЛОГИЙ

Т.В. Бурмистрова, Д.Г. Лаврова, О.А. Каманина, А.В. Мачулин,  
О.Н. Понаморева

*Показано, что в ходе иммобилизации микроорганизмов в условиях золь-гель синтеза кремнийорганических полимеров клетки являются центрами формирования архитектуры гибридного биоматериала, причем в зависимости от типа микроорганизмов формируются специфические структуры: клетки метилотрофных дрожжей *Ogataea polytricha* инкапсулированы, а уксуснокислые бактерии *Glucobacteroxydans* участвуют в образовании сферических структур геля. Таким образом, используя различные микроорганизмы, можно регулировать архитектуру кремнеземных материалов, т.е. использовать клетки микроорганизмов в роли темплатов.*

*Ключевые слова: золь-гель, кремнийорганические соединения, биомиметические структуры, инкапсулированные микроорганизмы, гетерогенный биокатализатор.*

#### Введение

Многие инновационные достижения, в том числе в области новых материалов с биомиметическими структурами, инициированы живой природой. Живые организмы в процессе эволюции природных систем выстраивают различные минерализованные структуры, которые представляют собой сложные иерархические архитектуры на основе композитных биоматериалов [1]. Важнейшая функция таких систем — защита организмов и генетического материала своего вида от неблагоприятных условий. Клетки диатомовых водорослей снаружи окружены твердой силикатной оболочкой, обеспечивающей клеткам механическую защиту [2]. Неорганическая оболочка не препятствует поступлению питательных веществ в клетку. Это послужило примером для получения гибридных бионеорганических структур путем иммобилизации живых клеток в силикатные капсулы [3]. Такой подход является относительно новым направлением исследований в нанобиотехнологии и представляет собой один из путей создания биомиметических структур, так называемых «искусственных спор» («artificial spore»), на основе инкапсулированных клеток микроорганизмов [4]. Клетки, покрытые защитной оболочкой или встроенные в неорганический матрикс, являются идеальными стабильными «живыми материалами» [5] и могут использоваться как перспективные биокатализаторы, на их основе можно

создавать биореакторы [6], биосенсоры [7, 8], биопрепараты для деградации токсичных соединений [9], имплантаты [10] и др. [11, 12]. Матрицы на основе оксида кремния имеют преимущества перед органическими гидрогелями, которые наиболее часто используют для иммобилизации живых клеток, так как они способны удерживать воду без значительного набухания, химически и биологически инертны, механически прочны и обеспечивают жизнеспособность клеток в течение длительного времени [13].

Наиболее эффективным способом, обеспечивающим направленное регулирование текстурных характеристик кремнеземных материалов, является золь-гель метод с использованием структурообразующих агентов [14]. В качестве структурообразующих агентов могут выступать клетки микроорганизмов. Они обеспечивают формирование определенных 3D-структур и могут выступать в роли темплатов [15] или гетерогенных биокатализаторов. Использование бактериальных клеток в роли структурообразующего агента позволяет синтезировать неорганические материалы с полыми частицами, различной формы [16]. Например, кремнеземный материал, полученный с использованием кишечной палочки, имеет удельную поверхность  $68 \text{ м}^2/\text{г}$ , средний размер пор  $2,5 \text{ нм}$  и состоит из полых частиц, повторяющих морфологию бактерий [17]. Данное направление в материаловедении пористых материалов является достаточно новым и перспективным. Ранее нами было показано, что в условиях катализа фторидом натрия в нейтральной среде формируются оболочки вокруг каждой клетки дрожжей [18, 19]. В работе исследовали влияние типа микроорганизмов – метилотрофных дрожжей *Ogataea polymorpha* и уксуснокислых бактерий *Gluconobacter oxydans* – на структуру формирующегося кремнийорганического биоматрикса.

### Материалы и методы

**Штаммы микроорганизмов.** В работе использовали метилотрофные бактерии *Ogataea polymorpha* ВКМ У-2559 и уксуснокислые бактерии *Gluconobacter oxydans* ВКМ В-1280 (ИБФМ им. Г.К. Скрябина РАН).

**Культивирование метилотрофных дрожжей.** Дрожжевой штамм *Ogataea polymorpha* ВКМ У-2559 (далее *Og. polymorpha*) был получен во Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов РАН (Пушино). Культивирование дрожжей проводили на питательной среде следующего состава:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  –  $2,5 \text{ г}/\text{дм}^3$ ,  $\text{MgSO}_4$  —  $0,2 \text{ г}/\text{дм}^3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  —  $0,7 \text{ г}/\text{дм}^3$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  –  $3,0 \text{ г}/\text{дм}^3$ , дрожжевой экстракт –  $0,5 \text{ г}/\text{дм}^3$ , глицерин —  $8,3 \text{ см}^3$  и микроэлементы —  $\text{MnSO}_4$  –  $0,0012 \text{ г}/\text{дм}^3$ ;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  –  $0,0003 \text{ г}/\text{дм}^3$ ;  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  –  $0,0002 \text{ г}/\text{дм}^3$ ;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  –  $0,0015 \text{ г}/\text{дм}^3$ ;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  –  $0,01 \text{ г}/\text{дм}^3$ ; ЭДТА –  $0,001 \text{ г}/\text{дм}^3$ . Культуру микроорганизмов выращивали

в колбах объемом 750 см<sup>3</sup> (объем среды 150 см<sup>3</sup>) при 28°C и аэрации в шейкере при 190 об/мин. Инокулят вносили в количестве 1,5 % по объему среды до конечной концентрации ~10<sup>6</sup> КОЕ/см<sup>3</sup>. Биомассу помещали в колбу, содержащую 200 см<sup>3</sup> бесфосфатной среды и индуцировали метанолом (2 см<sup>3</sup>). Индуцированную биомассу центрифугировали при 2000g в течение 15 мин, осадок промывали фосфатным буферным раствором (30 ммоль/дм<sup>3</sup>, pH 7,6). Биомассу дрожжей хранили в микропробирках при +4°C.

**Культивирование уксуснокислых бактерий.** Бактериальный штамм *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius* ВКМ В-1280 (далее *G. oxydans*) был получен во Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов РАН (Пушино). Клетки выращивали в жидкой среде аэробно 18-20 часов в качалочных колбах объемом 750 мл при температуре 28°C в среде следующего состава: сорбит – 200 г/дм<sup>3</sup>, дрожжевой экстракт – 20 г/дм<sup>3</sup>, дистиллированная вода – 100 см<sup>3</sup>. Среду для выращивания бактериальных клеток стерилизовали автоклавированием при давлении 1,1 атмосфера в течение 30 мин. Посевной материал выращивали аналогично 24 часа. Объем инокулята составлял 10 % об. Биомассу собирали центрифугированием при комнатной температуре на центрифуге MiniSpin (Eppendorf AG, Германия) при 8000 об/мин (4270g) 10 минут и отмывали от культуральной среды двукратно 20 mM фосфатным буфером pH 6,0 (соли Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> и KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Диа-М, Россия). Осевшие клетки рассуспандировали в свежей порции буфера, распределяли по порциям и осаждали центрифугированием 10 при 4000g. Промытую биомассу взвешивали и хранили в микропробирках при +4°C.

**Золь-гель иммобилизация биоматериала.** К 0,1 см<sup>3</sup> 20 % раствора полиэтиленгликоля 3000 (ПЭГ) («Ferak Berlin», Германия) в фосфатном буферном растворе прибавляли 0,25 см<sup>3</sup> суспензии клеток ((1,3±0,1)·10<sup>9</sup> КОЕ/см<sup>3</sup>) в фосфатном буферном растворе (20 ммоль/дм<sup>3</sup>, pH 7,6) и перемешивали в течение 3 минут (Elmi SM-70M07, Польша), добавляли 0,5 см<sup>3</sup> смеси тетраэтоксисилана (ТЭОС) («Sigma», США) и метилтриэтоксисилана (МТЭС) («Sigma», США) и вновь перемешивали в течение 3 минут. Затем добавляли 0,025 см<sup>3</sup> 0,2 моль/дм<sup>3</sup> раствора катализатора NaF, перемешивали 15 минут. Дыхательную активность иммобилизованных клеток оценивали с помощью биосенсорной установки [19].

**Влияние УФ на дыхательную активность иммобилизованных микроорганизмов.** Инкапсулированные в золь-гель матрицу микроорганизмы облучали УФ (254 нм) в течение 5 часов. Интенсивность облучения составляла 680 мкВт/см<sup>2</sup>. После облучения фрагмент гетерогенный биокатализатор с иммобилизованными клетками помещали на поверхность кислородного электрода Кларка и фиксировали с помощью

нейлоновой сетки, дыхательную активность иммобилизованных клеток оценивали с помощью биосенсорной установки [19].

**Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ).** Образцы органосиликатной золь-гель матрицы наносили на поверхность токопроводящего скотча, который закрепляли на металлическом диске – объектодержателе. Затем на поверхность образца напыляли тонкий слой платиново-углеродной смеси. Напыление осуществляли в вакуумно-напылительной установке JEE-4X ("JEOL", Япония). Электронно-микроскопический анализ образцов проводили с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM-6510 LV ("JEOL", Япония) в режиме низкого вакуума (30 Па) при регистрации обратно-отраженных электронов (BSE). Для приготовления образцов клеток *Og.polymorpha* и *G. oxydans* клеточную суспензию ( $(2,0 \pm 0,2) \times 10^8$  КОЕ/см<sup>3</sup>) наносили на поверхность токопроводящего скотча, после 5 минут инкубации каплю удаляли с помощью фильтровальной бумаги, поверхность промывали несколько раз водой, для удаления не связанных с поверхностью клеток. После этого скотч с образцом монтировали на поверхность объектодержателя и проводили напыление платиново-углеродной смеси. СЭМ анализ проводили в режиме низкого вакуума (30 Па) при регистрации BSE, а также в режиме высокого вакуума при регистрации вторичных электронов (SE).

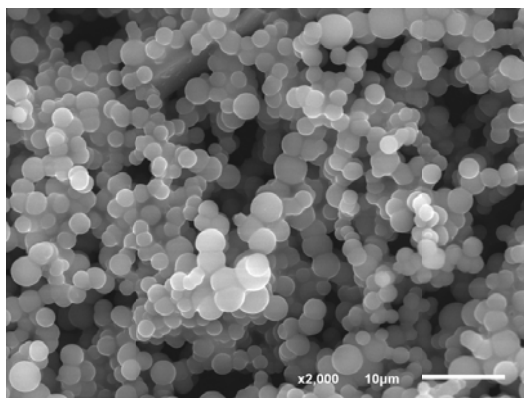
### Результаты и их обсуждение

**Иммобилизация бактерий *Gluconobacter oxydans* в органосиликатную матрицу.** Уксуснокислые бактерии.

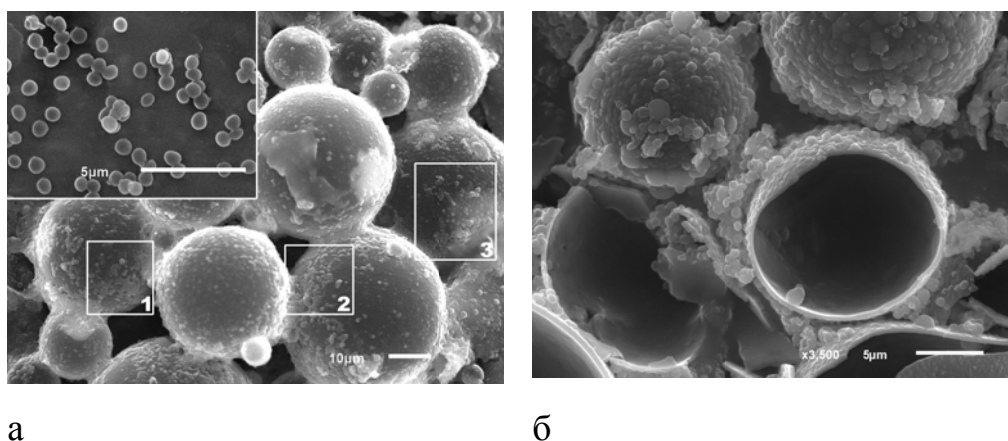
Изучение структуры получаемых матриц проводили методом сканирующей электронной микроскопии. На рис. 1 представлена золь-гель матрица без иммобилизованного биоматериала, которая представляет собой сферы размером от 1 до 5 мкм, плотно упакованные в цепочки. Однако при использовании биоматериала наблюдается образование в фронтальной структуре шаров до 50 мкм (рис. 2).

При использовании 50 % об. МТЭС в составе матрицы (рис. 2А) наблюдается образование сфер, на поверхности которых находятся клетки *Gluconobacteroxydans*. При разрушении сфер (рис. 2Б) видно, что они полые внутри. Такие структуры при использовании в качестве биокон компонента уксуснокислых бактерий *Gluconobacteroxydans* в условиях основного катализа были получены впервые. Выявление механизма образования таких структур требует дополнительных исследований.

**Иммобилизация дрожжей *Ogataea polymorpha* в органосиликатную матрицу.** При иммобилизации дрожжей в органосиликатные матрицы наблюдается картина, отличная от ранее полученной при иммобилизации бактерий (рис. 3).



**Рис. 1.** Изображение золь-гель матрицы, полученное с помощью сканирующей электронной микроскопии (соотношение силикатных прекурсоров: 50 % об. МТЭС и 50 % об. ТЭОС)



а

б

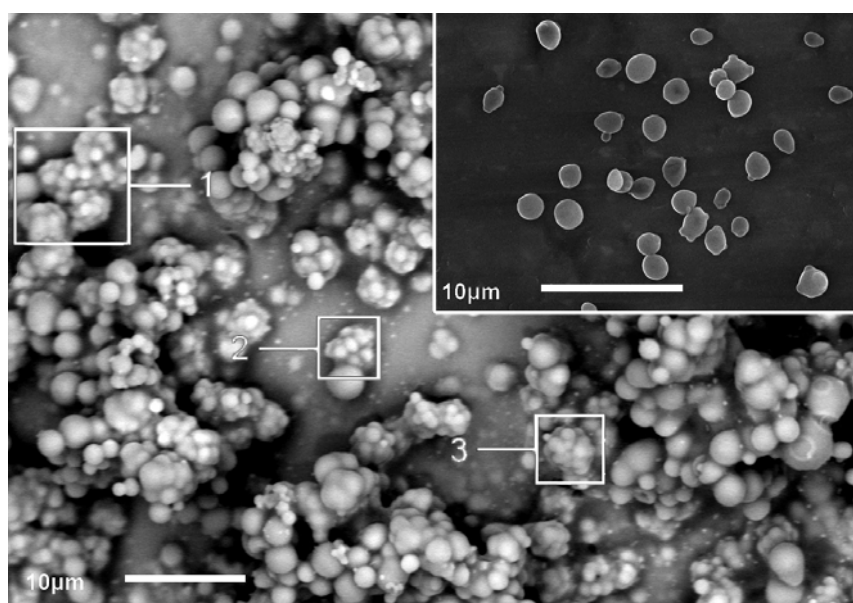
**Рис. 2.** Изображение золь-гель матрицы с иммобилизованными бактериями *Gluconobacteroxydans*, полученное с помощью СЭМ с содержанием МТЭС 50 % об. Рамками 1,2,3 отмечены иммобилизованные бактерии. Вставка бактерии *Gluconobacteroxydans* в чистой культуре (а), изображение разрушенных сфер золь-гель матрицы с иммобилизованными бактериями *Gluconobacter oxydans* (СЭМ) (б)

При иммобилизации дрожжевых клеток вокруг каждой клетки формируется капсула, при этом инкапсулированные клетки образуют единую архитектуру гибридного биоматериала (рис. 3).

**Воздействие ультрафиолетового излучения на иммобилизованные микроорганизмы.**

Дополнительным доказательством формирования разных структур гибридных материалов можно считать результат воздействия ультрафиолетового излучения на иммобилизованные дрожжи и бактерии. Известно, что силикатные материалы, в частности стекла, непроницаемы для коротковолнового и средневолнового диапазона УФ излучения. УФ излучение часто используют в микробиологии, биотехнологии, медицине

для стерилизации оборудования, поэтому важно понимать насколько эффективно кремнийорганические капсулы защищают живые клетки при облучении. Имобилизованные микроорганизмы облучали УФ в коротковолновой области ( $\lambda = 254$  нм), после чего определяли дыхательную активность микроорганизмов, как свидетельство их жизнеспособности. Оказалось, что дыхательная активность дрожжей практически не изменилась по сравнению с активностью необлученных дрожжевых клеток. Однако дыхания бактериальных клеток после облучения гибридного материала практически не наблюдалось.



**Рис. 3. Изображение золь-гель матрицы (15 %ТЭОС и 85 %МТЭС) с инкапсулированными метилотрофными дрожжами *Ogataeapolymorpha* ВКМ Y-2559 (рамками 1,2,3 на рисунке выделены капсулы, содержащие дрожжи *Og. polymorpha*) (СЭМ). Вставка: изображение клеток метилотрофных дрожжей *Ogataeapolymorpha* ВКМ Y-2559 в чистой культуре (СЭМ)**

Эти результаты подтверждают образование капсул вокруг дрожжевых, но не бактериальных клеток, и указывают на беспрецедентные защитные функции кремнийорганического матрикса, что следует учитывать при разработке различных биотехнологий. Так, при использовании инкапсулированных дрожжей в качестве биокатализатора УФ-облучение можно использовать для периодической стерилизации биореактора, что позволит избежать микробной контаминации.

Таким образом, тип микроорганизмов играет важную роль в формировании 3D-структуры органомодифицированных золь-гель матрицы. Используя различные микроорганизмы можно регулировать



архитектуру золь-гель матрицы и использовать микроорганизмы в роли темплатов.

### Заключение

В ходе работы метилотрофные дрожжи *Ogataea polymorpha* и уксуснокислые бактерии *Glucanobacter oxydans* были иммобилизованы в кремнийорганические золь-гель матрицы. Показано, что в условиях основного катализа микроорганизмы играют важную роль при фотмировании архитектуры гибридного биоматериала. Причем в зависимости от типа микроорганизмов формируются специфические структуры: клетки дрожжей *Ogataea polymorpha* инкапсулированы, а бактерии *Glucanobacter oxydans* участвуют в образовании сферических структур геля.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант 16-43-710183-р\_центр\_а)

### Список литературы

1. Wang S., Guo Z. Bio-inspired encapsulation and functionalization of living cells with artificial shells // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2014. V. 113, I. 1. P. 483–500.
2. Meunier P.F., Dandoy P., Su B.L. Encapsulation of cells within silica matrixes: Towards a new advance in the conception of living hybrid materials // *Journal of Colloid and Interface Science*. 2010. V. 342. P. 211-224.
3. Living bacteria in silica gels/N.Nassif, O.Bouvet, M.Noelle Rager et al. // *Nat Mater*. 2002. V. 1, I. 1. P. 42-44.
4. Artificial spores: cytocompatible encapsulation of individual living cells within Thin, Tough Artificial Shells / S.H.Yang, D.Hong, J.Lee et al. // *Small*. 2013. V. 9, I. 2. P. 178-186.
5. Meunier P.F., Dandoy P., Su B.-L. Encapsulation of cells within silica matrixes: Towards a new advance in the conception of living hybrid materials // *Journal of Colloid and Interface Science*. 2010. V. 342. P. 211-224.
6. Dickson D. J., Ely R. L. Silica sol-gel encapsulation of cyanobacteria: lessons for academic and applied research // *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013. V. 97, I. 5. P. 1809-1819.
7. Co-immobilized microbial biosensor for BOD estimation based on sol-gel derived composite material / J.Jia, M.Tang, X.Chen et al. // *Biosensors and Bioelectronics*. 2003. V. 18, I. 8. P. 1023-1029.
8. Depagne P., Roux P., Coradin V. How to design cell-based biosensors using the sol-gel process // *Anal Bioanal Chem*. 2011. V. 400, I. 4. P. 965-976.
9. Use of silica-encapsulated *Pseudomonas* sp. strain NCIB 9816-4 in biodegradation of novel hydrocarbon ring structures found in hydraulic

fracturing waters / K.G.Aukema, L.Kasinkas, A.Aksan et al. // *Organic Geochemistry* 2014 Vol.75 P. 1-27.

10. Fibroblast encapsulation in hybrid silica–collagen hydrogels / M.F.Desimone, P.Hélary, G.Mosser et al. // *Journal of Materials Chemistry*. 2010. V. 20, I. 4. P. 666.

11. Blondeau M., Coradin V. Living materials from sol-gel chemistry: current challenges and perspectives // *Journal of Materials Chemistry*. 2012. V. 22, I. 42. P. 22335-22343.

12. Encapsulation of cells within silica matrixes: Towards a new advance in the conception of living hybrid materials / J.Van Wijk, P.F.Meunier, P.Dandoy et al. // *Journal of Colloid and Interface Science*. 2010. V. 342. P. 211-224.

13. Evaluation of sol-gel silica matrices as inoculant carriers for *Mesorhizobium* spp. cells / G.S.Alvarez, F.L.Pieckenstain, M.F.Desimone et al. // *Current Reseach, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbioal Biotechnology* / Mendez-Vilas A.FORMATEX, 2010. P. 160-166.

14. Collinson M. M. Recent trends in analytical applications of organically modified silicate materials // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2002. V. 21, I. 1. P. 31-39.

15. Zhou H. Hydrothermal synthesis of ZnO hollow spheres using spherobacterium as biotemplates // *Microporous and Mesoporous Materials*. 2007. V. 100. P. 322-327.

16. Nomura T. Fabrication of silica hollow particles using *Escherichia coli* as a template // *Materials Letters*. 2008. V. 62. P. 3727-3729.

17. Nomura T. Synthesis of hollow silica microparticles from bacterial templates // *Advanced Powder Technology*. 2010. V. 21. P. 218–222.

18. Synthesis of organosilicon sol-gel matrices and preparation of heterogeneous biocatalysts based on them / O.A.Kamanina, D.G.Fedoseeva, T.V. Rogova et al. // *Russ. J. Appl. Chem*. 2014. P. 761–766.

19. Yeast-based self-organized hybrid bio-silica sol–gels for the design of biosensors / O.N.Ponamoreva, O.A.Kamanina, V.A.Alferov et al. // *Biosens. Bioelectron*. 2015. P. 321–326.

*Бурмистрова Татьяна Вячеславовна, магистрант, [tatyana.burmistrova.94@mail.ru](mailto:tatyana.burmistrova.94@mail.ru), Россия, Тула, Тульский государственный университет.*

*Лаврова Дарья Геннадьевна, магистрант, [d.g.fedoseeva@gmail.com](mailto:d.g.fedoseeva@gmail.com), Россия, Тула, Тульский государственный университет,*

*Каманина Ольга Александровна, к.х.н, ассистент, [o.a.kamanina@gmail.com](mailto:o.a.kamanina@gmail.com), Россия, Тула, Тульский государственный университет,*

*Мачулин Андрей Валериевич, к.б.н., научный сотрудник, [and.machul@gmail.com](mailto:and.machul@gmail.com), Россия, Пуцзино, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН,*

*Понаморева Ольга Николаевна, д.х.н., зав. кафедрой биотехнологии, [olgarponamoreva@mail.ru](mailto:olgarponamoreva@mail.ru), Тульский государственный университет*

## THE STUDY OF THE STRUCTURE OF SILICONE MATRIX SCANNING ELECTRON MICROSCOPE

*Burmistrova T., Lavrova D., Kamanina O., Machulin A., Ponamoreva O.*

*In this work it was shown that cells become the centers of formation of hybrid biomaterial architecture during the immobilization of microorganisms in the conditions of the sol-gel synthesis of silicone polymer. Formation of specific structures depends on the type of microorganisms: cells of methylotrophic yeast *Ogataea polymorpha* are encapsulated and acetic acid bacteria *Gluconobacter oxydans* involved in formation of spherical gel structures. Thus, by using different microorganisms, it is possible to adjust the silica material architecture, i.e. to use microbial cells as templates.*

*Keywords. sol-gel, a heterogeneous biocatalyst, hybrid materials, biomaterials, encapsulated microorganisms.*

*Burmistrova Tatyana Vyacheslavovna, graduate student, [tatyana.burmistrova.94@mail.ru](mailto:tatyana.burmistrova.94@mail.ru), Russia, Tula, Tula State University,*

*Lavrova Daria Gennadievna, graduate student, [d.g.fedoseeva@gmail.com](mailto:d.g.fedoseeva@gmail.com), Russia, Tula, Tula State University,*

*Kamanina Olga Aleksandrovna, candidate of chemical sciences, assistant professor, [o.a.kamanina@gmail.com](mailto:o.a.kamanina@gmail.com), Russia, Tula, Tula State University,*

*Machulin Andrey Valerievich, candidate of biology sciences, research associate, [and.machul@gmail.com](mailto:and.machul@gmail.com), Russia, Pushchino, Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences,*

*Ponamoreva Olga Nikolaevna, doctor of chemical sciences, department of biotechnology, [olgaponamoreva@mail.ru](mailto:olgaponamoreva@mail.ru), Russia, Tula, Tula State University*

УДК 504.4.054: 543.55.054.1

## **ЭКОЛОГИЧЕСКИЙ АСПЕКТ ПРИМЕНЕНИЯ МЫЛА**

Н.П. Матвейко, В.В. Садовский, Н.М. Носова

*Методом инверсионной вольтамперометрии определено содержание тяжелых токсичных металлов в образцах твердого хозяйственного и туалетного мыла, а также в образцах жидкого туалетного мыла. Выявлено присутствие цинка, свинца, меди и ртути во всех изученных образцах мыла. Во всех образцах твердого хозяйственного мыла обнаружен также кадмий. Лишь в двух из восьми изученных образцах твердого туалетного мыла в незначительных количествах присутствует кадмий. В образцах всех изученных наименований жидкого туалетного мыла присутствие кадмия не установлено.*

*Ключевые слова: мыло, инверсионная вольтамперометрия, тяжелые металлы, содержание.*

Проблема загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами занимает одно из первых мест среди ряда других экологических проблем [1,2]. Это связано с высокой токсичностью таких металлов и увеличением их поступления в водоемы и почву вследствие активной деятельности человека. Одним из источников поступления тяжелых металлов в окружающую среду могут быть мыльные растворы, образующиеся в результате применения мыла для стирки, а также в гигиенических целях – для поддержания чистоты тела человека и домашних животных.

Мыло изготовляли ещё в древних Шумере и Вавилоне (около 2800 г. до н. э.). На глиняных табличках, найденных в Месопотамии и относящихся примерно к 2200 г. до н. э., приведена технология изготовления мыла. Египетский папирус середины второго тысячелетия до нашей эры свидетельствует о том, что египтяне регулярно употребляли мыло в омовениях. Широко применяли подобные моющие средства и в Древнем Риме. [3, 4].

В 1808 году французский химик Мишель Эжен Шеврёль установил, что мыло – это натриевая соль высшей жирной (карбоновой) кислоты [3].

Непрерывный процесс мыловарения вместе с процессом гидролиза жиров водой и паром был отработан в конце 1930-х годов в Европе и США [3, 4].

В настоящее время мыло – одно из самых распространенных средств гигиены, оно занимает значительную часть рынка моющих средств [5–7]. Исследования показали, что мылом пользуются 98 % россиян. По данным компании «Академия Сервис», в 2009 году ёмкость российского рынка мыла составила 198,5 тысяч тонн. Существенную долю на российском рынке мыла занимает импортная продукция. По объемам лидируют жидкие мыла, гели и другие средства для мытья кожи (43,5 млн.

тонн). Хозяйственного мыла поставляют в Россию 5,3 млн. тонн [7]. Очевидно, что столь значительное потребление различных видов мыла приводит к образованию большого объема сточных вод, поступающих в окружающую среду.

Согласно техническим нормативным правовым актам (ТНПА) мыла должны соответствовать показателям гигиенической безопасности, важнейшим из которых является содержание тяжелых металлов [8–11]. Содержание токсичных элементов в твердом туалетном мыле общего применения не должно превышать, мг/кг: мышьяк – 5,0; ртуть – 1,0; свинец – 5,0, а в детском мыле – мышьяк – 2,0; ртуть – 0,5; свинец – 2,0 [10]. По данным СанПиН 1.2.681–97 РФ мышьяк, ртуть, свинец в твердом туалетном мыле вообще должны отсутствовать [11]. Содержание токсичных элементов в жидком туалетном мыле также не должно превышать (мг/кг): мышьяк – 5,0; ртуть – 1,0; свинец – 5,0 [8,10,11]. Что касается твердого хозяйственного мыла, то содержание токсичных элементов в этом виде мыла не нормируется.

Хотя содержание меди, цинка и кадмия в мылах не регламентируется, однако при их производстве используют различное сырье природного и синтетического происхождения, которое может содержать соединения этих металлов.

Учитывая изложенное выше, представляет интерес изучить содержание тяжелых металлов (Zn, Cd, Pb, Cu и Hg) в различных видах мыла.

Цель работы – методом инверсионной вольтамперометрии определить содержание Zn, Cd, Pb, Cu и Hg в образцах твердого хозяйственного, твердого туалетного и жидкого туалетного мыла разных производителей.

### **Методика эксперимента**

Все растворы для проведения исследований готовили из реактивов марки «ХЧ» на бидистилляте (дважды перегнанной дистиллированной воде).

Значения электродных потенциалов в тексте и рисунках приведены по отношению к хлорсеребряному электроду сравнения в 1М растворе хлорида калия.

В качестве объектов исследования случайным образом отобраны по восемь образцов твердого хозяйственного, твердого туалетного и жидкого туалетного мыла различных производителей, представленные в торговых организациях г. Минска. Основные сведения об изученных образцах мыла и важнейшие ингредиенты их состава, установленные по информации на упаковке мыла, приведены в табл. 1–3.

**Таблица 1**

**Сведения об образцах твердого хозяйственного мыла**

№ образцымыла	Сведения об образцах мыла	Основные ингредиенты мыла
1	2	3
1х	Хозяйственное мыло, 72 %.ГОСТ 30286. Торговая сеть. Республика Казахстан	Натриевые соли жирных кислот растительных масел, продуктов переработки растительных масел, технических животных жиров, NaOH, NaCl – менее 5 %
2х	Хозяйственное мыло, 65 %. ГОСТ 30266. Гомельский жировой комбинат. Республика Беларусь	Натриевые соли жирных кислот растительных масел, продуктов переработки растительных масел, технических животных жиров, NaOH, NaCl – менее 5 %
3х	«Хозяюшка», заботливая мама, 65 %. Для стирки детского белья. ТУ ВУ. Гомельский жировой комбинат. Республика Беларусь	Натриевые соли жирных кислот растительных масел, пищевых технических и животных жиров, пластификатор, TiO <sub>2</sub> , NaOH, NaCl – менее 5 %
4х	«Блестер», для стирки белого белья, 72 %. ГОСТ 30266. Гомельский жировой комбинат. Республика Беларусь	Натриевые соли жирных кислот растительных масел, пищевых животных жиров, антал П-2, оптический отбеливатель, TiO <sub>2</sub> , NaOH, NaCl
5х	«Хуторское», натуральное, 65 %. ГОСТ 28546. Иностранное частное предприятие. Несвиж. Республика Беларусь	Натриевые соли жирных кислот натуральных жиров и масел, глицерин

## Окончание табл. 1

1	2	3
6х	«Блестер», с энзимами, для стирки и удаления пятен, 72 %. ГОСТ 30266. Гомельский жировой комбинат. Республика Беларусь	Натриевые соли жирных кислот растительных масел, пищевых животных жиров, глицерин, тетраборат натрия, лимонная кислота, энзимы, антал П-2, оптический отбеливатель, TiO <sub>2</sub> , NaOH, NaCl
7х	«Helen», отбеливающее, для стирки в жесткой воде, 72 %. ГОСТ 30266. Иностранное частное предприятие. Несвиж. Республика Беларусь	Натриевые соли жирных кислот натуральных жиров и масел, глицерин, TiO <sub>2</sub> , трилон Б, антал П- 2, оптический отбеливатель
8х	Хозяйственное мыло, 72 %. ГОСТ 30286. Гомельский жировой комбинат. Республика Беларусь	Натриевые соли жирных кислот растительных масел, продуктов переработки растительных масел, технических животных жиров, TiO <sub>2</sub> , NaOH, NaCl – менее 5 %

Таблица 2

## Сведения об образцах твердого туалетного мыла

№ образца мыла	Наименование мыла	Основные компоненты мыла
1	2	3
1т	Липовый цвет. Марка «Ординарное», ГОСТ 28546	Натриевые соли жирных кислот пищевых животных жиров и растительных масел, NaCl, TiO <sub>2</sub>
2т	Жасмин. Марка «Ординарное». ГОСТ 28546	Натриевые соли жирных кислот животных жиров и растительных масел, оливковое масло, глицерин, TiO <sub>2</sub>
3т	Ваш малыш. Марка «Экстра». ГОСТ 28546	Натриевые соли жирных кислот пищевых животных жиров и растительных масел, глицерин, норковый жир, NaCl, TiO <sub>2</sub>

Окончание табл.2

1	2	3
4т	Земляничное. Марка «Ординарное». ГОСТ 28546	Натриевые соли жирных кислот пищевых животных жиров и растительных масел, NaCl, TiO <sub>2</sub>
5т	NIVEA, крем-мыло	Натриевые соли жирных кислот животных жиров и кокосового масла, глицерин, NaCl, Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , метилбензоат, бензиловый спирт, органически модифицированный силикат магния
6т	PALMOLIVE, крем-мыло	Натриевые соли жирных кислот животных жиров и пальмового масла, глицерин, NaCl, линалоол, метилпропанол, бутилфенил, органические кислоты тетранатриевая соль ЭДТА
7т	FAX HAPPY HOME, крем-мыло	Натриевые соли жирных кислот животных жиров, пальмового и кокосового масел, глицерин, NaCl, токоферил ацетат, пропилен гликоль, α-изометил ионол, этидроновая кислота тетранатриевая соль ЭДТА
8т	SAMAY, ТУ У 24.5 32509841-004	Натриевые соли жирных кислот животных жиров, пальмового масла и красного пальмового масла, жирные кислоты красного пальмового масла, натриевая соль лимонной кислоты, лимонная кислота, тетранатриевая соль ЭДТА, натриевая соль диэтилентриаминпентауксусной кислоты, линалоол



Таблица 3

## Сведения об образцах жидкого туалетного мыла

№ образца мыла	Наименование образца, страна производитель	Основные компоненты жидкого мыла
1	2	3
1ж	Жидкое мыло Help «Зеленый чай». ГОСТ Р 52345-2005. Россия	Вода, сульфэтоксилат натрия, кокамидопропилдиметилбетаин, диэтаноламид кислот кокосового масла, NaCl, замутнитель, консервант, краситель
2ж	Крем-мыло с маслом макадамии FreshJuice. Украина	Вода, натрия лаурет сульфат, кокамидодиэтиланилин, NaCl, экстракт цветов плюмерии, лимонная кислота, бензиловый спирт, метилхлороизотиазолинон, гексил циннамаль, бутилфенилметилпропиональ лимонен, красители
3ж	Крем-мыло «Олива» Dulgon Германия	Вода, натрия лаурет сульфат, кокамидопропилдиметилбетаин, NaCl, глицерин, бензоат натрия, молочная кислота, олеат глицерина, кокаглюкозид, сорбат натрия, лимонная кислота, бутилфенилметилпропиональ, линалоол, цитронеллол, бензил салицилат, лауреат сульфат натрия, феноксиэтанол
4ж	Жидкое мыло Palmolive «Черная орхидея». Турция	Вода, натрия лаурет сульфат, кокамидопропилдиметилбетаин, NaCl, бензоат натрия, кокамид моноэтаноламин, кокамидмоноэтаноламин, стирол, салицитат натрия, лимонная кислота, гликоль дистеарат, ЭДТА тетранатрия, экстракты орхидеи фаленопсис и алоэ барбаденсис, бензил салицилат, бензилсалицитат, бутилфенилметилпропиональ, гексилциннамаль, линалоол, красители

Окончание табл.3

1	2	3
5ж	Жидкое мыло «Ландыш». Польша	Вода, натрия лаурет сульфат, NaCl, кокамидопропилдиметилбетаин, кокамид диэтиланилин, глицерин, лимонная кислота, метилхлороизотиазолинон, метилтиазолинон
6ж	Жидкое мыло для рук «Клюква» Ultrasoap. Турция.	Деионизированная вода, этоксилированный лаурилсульфат натрия, NaCl, кокоамидопропилбетаин, кокамид диэтиланилин, глицерин, триэтиленгликоль, пропиленгликоль, лимонная кислота, красители
7ж	Жидкое мыло для рук «Арбуз и бамбук» Dalan. Турция	Вода, натрия лаурет сульфат, кокамидопропилдиметилбетаин, глицерин, NaCl, лимонная кислота, ЭДТА тетранатрия, бензотриазолил бутилфенол сульфонат натрия, гидрогенизированное касторовое масло, экстракт гамамелиса виргинского, пантенол, экстракт горной арники, ниацинамид, тиамин, токоферол, ретинол пальмитат, ретинол ацетат, биотин, пропиленгликоль, бутиленгликоль, экстракт бамбука, красители
8ж	Жидкое мыло «Семейное». Республика Беларусь. СТБ 1675– 2006	Вода, натрия лаурет сульфат, диэтаноламид кокосового масла, перламутровый концентрат, NaCl, лимонная кислота, консервант, отдушка

Из табл. 1 видно, что состав образцов хозяйственного мыла мало отличается друг от друга. Все образцы мыла содержат натриевые соли жирных кислот растительных масел, а также натриевые соли других видов жиров. Практически во всех образцах мыла присутствуют гидроксид и хлорид натрия. В пяти образцах мыла (№ 3ж, 4ж, 6ж, 7ж, 8ж) содержится оксид титана (IV). В трех образцах мыла (№ 5ж, 6ж, 7ж) содержится глицерин.

Следует отметить, что наибольшая численность ингредиентов наблюдается в образце мыла №6х «Блестер», содержащем энзимы, которое рекомендуется для стирки и удаления пятен, а наименьшее – в образце мыла № 5х «Хуторское», натуральное.

В образцах твердого туалетного мыла, как видно из табл. 2, перечень содержащихся компонентов больше, чем в хозяйственном мыле, причем в образцах мыла белорусского производства (№ 1т–4т) их меньше, чем в образцах мыла зарубежного производства (№ 5т–8т).

Перечень компонентов в жидком туалетном мыле наиболее разнообразен (табл. 3). Можно, однако, отметить, что наиболее значительное число компонентов характерно для образцов жидкого мыла № 3ж, 4ж, 7ж, производителями которых являются Германия, и Турция.

Анализируя данные табл. 1–3 можно, предположить, что образцы изученных в работе видов мыл могут содержать весьма разное количество тяжелых металлов.

Для подготовки проб мыла применяли двухкамерную программируемую печь марки ПДП – 18М. Поскольку основными компонентами мыла являются соли жирных кислот животных жиров и растительных масел, подготовку проб мыла проводили на основе методики подготовки проб пищевых жиров и масел, описанной в работе [12], следующим образом. Навеску образца мыла массой 0,2–0,4 г (в зависимости от вида мыла) помещали в кварцевый стакан объемом 10 см<sup>3</sup>, добавляли 3,0 см<sup>3</sup> 10 % спиртового раствора Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. После растворения мыла проводили выпаривание раствора в течение 80 минут, повышая температуру от 100<sup>0</sup> до 300<sup>0</sup>С. Образовавшийся осадок обугливали при температуре 350<sup>0</sup>С в течение 30 минут. После этого пробы озоляли при температуре 470<sup>0</sup>С в течение 30 минут. Охлажденную до комнатной температуры золу всех проб растворяли в смеси 2,0 см<sup>3</sup> концентрированной азотной кислоты и 0,5 см<sup>3</sup> 30 % – ного раствора пероксида водорода. Образовавшийся раствор выпаривали в течение 70 минут, повышая его температуру от 150<sup>0</sup> до 350<sup>0</sup>С. Затем повторно проводили озоление при температуре 470<sup>0</sup>С в течение 180 минут. Операции растворения золы в смеси 2,0 см<sup>3</sup> азотной кислоты и 0,5 см<sup>3</sup> 30 % – ного раствора пероксида водорода, выпаривания и последующего озоления при температуре 470<sup>0</sup>С повторяли до получения однородной золы белого цвета. После этого золу растворяли в 1,0 см<sup>3</sup> концентрированной хлороводородной кислоты. Раствор выпаривали при температуре 150<sup>0</sup>С до получения влажного осадка. Осадок растворяли в 10 см<sup>3</sup> бидистиллята и индикаторной бумагой определяли рН раствора. Если рН составляло 3 и более единиц, то проводили анализ, если рН было меньше 3, повторяли выпаривание и растворение осадка в 10 см<sup>3</sup> бидистиллята.

После подготовки проб для анализа отбирали аликвоту каждой из них объемом 0,2 см<sup>3</sup>, помещали в кварцевую электрохимическую ячейку,

добавляли фоновый электролит, доведя объем раствора до 10 см<sup>3</sup>. Определение Zn, Cd, Pb и Cu выполняли на фоне водного раствора муравьиной кислоты, концентрацией 0,35 моль/дм<sup>3</sup>. Фоновым электролитом при анализе проб на содержание ртути служил водный раствор, содержащий 0,0175 моль/дм<sup>3</sup> серной кислоты и 0,002 моль/дм<sup>3</sup> хлорида калия.

Содержание тяжелых металлов в пробах мыла изучали методом инверсионной вольтамперометрии, применяя вольтамперометрический анализатор марки ТА-4. Индикаторным электродом при анализе мыла на содержание Zn, Cd, Pb и Cu была амальгамированная серебряная проволока. Условия проведения анализа и состав фонового электролита определяли отдельными исследованиями. Оказалось, что электрохимическую очистку индикаторного электрода целесообразно осуществлять в течение 20 с попеременной анодной и катодной поляризацией при потенциале +100 и -1120 мВ соответственно. Накопление металлов на поверхности индикаторного электрода при потенциале -1350 мВ в течение 20–40 с (время зависит от концентрации металлов в растворе). Успокоение раствора при потенциале -1150 мВ в течение 10 с, а развертку потенциала со скоростью 80 мВ/с на фоне 0,35 М водного раствора муравьиной кислоты в интервале потенциалов от -1150 до +100 мВ.

Ртуть определяли, применяя индикаторный электрод из модифицированного золотом сплава золота 583 пробы. Оптимальные условия анализа проб мыла на содержание Hg, как показали предварительные исследования, оказались следующие. Электрохимическая очистка индикаторного электрода при потенциале +700 мВ в течение 15 с. Накопление ртути при потенциале -650 мВ в течение 150 с. Успокоение раствора при потенциале +375 мВ в течение 20 с. Регистрация вольтамперной кривой при скорости изменения потенциала 5 мВ/с от +370 мВ до +650 мВ.

Электродом сравнения и вспомогательным электродом во всех исследованиях служил хлорсеребряный электрод в 1 М растворе хлорида калия.

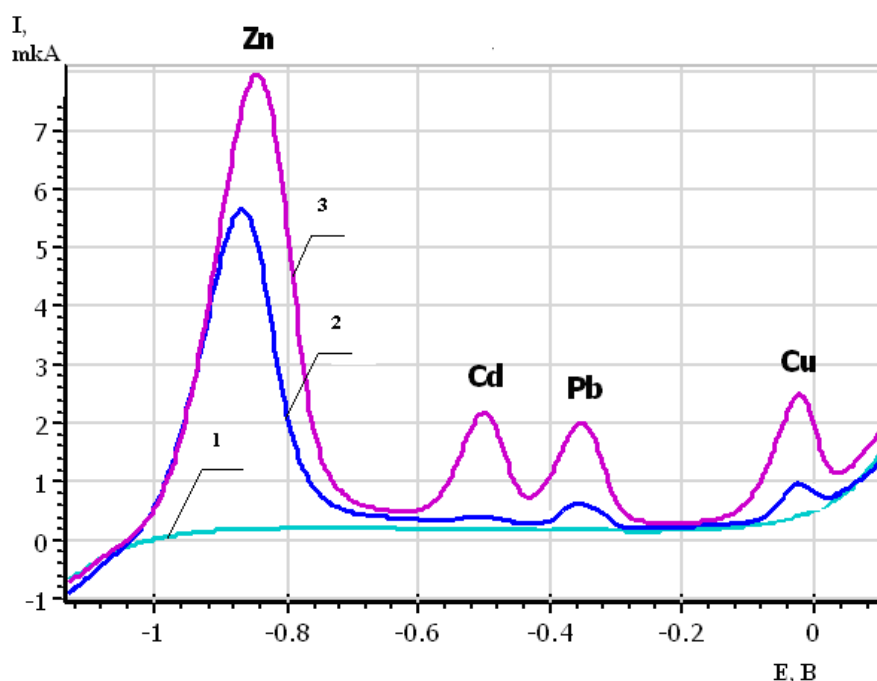
Содержание Zn, Cd, Pb, Cu и Hg в образцах мыла изучали, применяя метод добавок стандартных растворов, содержащих по 2 мг/дм<sup>3</sup> Cd, Pb, Cu и Hg и 3 мг/дм<sup>3</sup> Zn. Растворы готовили на основе государственных стандартных образцов (ГСО) и бидистиллята. Расчет содержания тяжелых металлов выполняли по разности вольтамперных кривых пробы и фона, а также пробы с добавкой стандартного раствора и фона, с помощью специализированной компьютерной программы "VALabTx".

Каждую пробу на содержание Zn, Cd, Pb, Cu и Hg анализировали не менее 4 раз.

Результаты обрабатывали методом математической статистики, при этом рассчитывали относительные стандартные отклонения ( $S_r$ ) и интервальные значения ( $\pm\Delta x$ ) содержания Zn, Cd, Pb, Cu и Hg в мыле с доверительной вероятностью 95 % [13].

### Результаты и их обсуждение

На рис. 1 и 2 приведены примеры вольтамперных кривых, зарегистрированные при определении Zn, Cd, Pb и Cu в пробе образца хозяйственного мыла № 3х и Hg в пробе образца хозяйственного мыла № 4х соответственно.

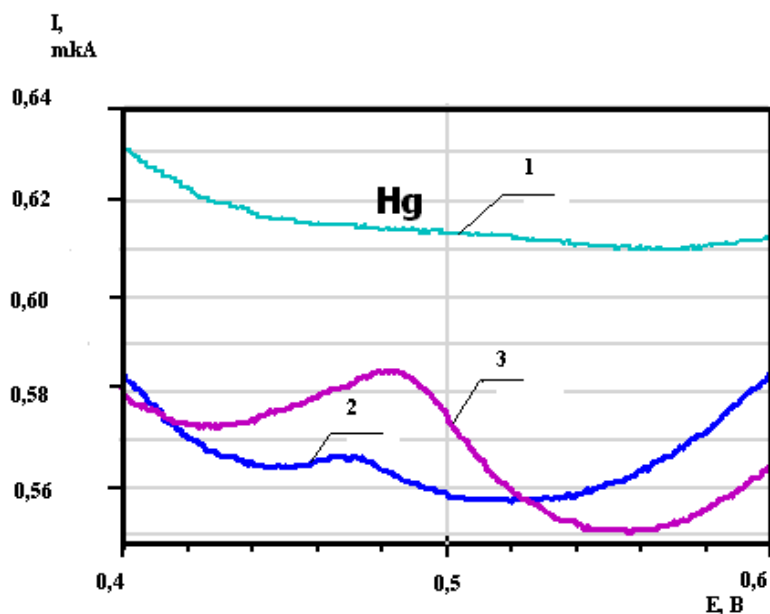


**Рис. 1. Анодные вольтамперные кривые: 1 – фонового электролита (0,35 М водный раствор муравьиной кислоты); 2 – пробы образца хозяйственного мыла №3х; 3 – пробы образца хозяйственного мыла №3х с добавкой 0,05 см<sup>3</sup> стандартного раствора, содержащего по 2 мг/дм<sup>3</sup> Cd, Pb, Cu и 3 мг/дм<sup>3</sup> Zn**

Из рис. 1 видно, что на вольтамперной кривой фонового электролита (кривая 1) отсутствуют максимумы тока, обусловленные анодным окислением каких-либо веществ. Это свидетельствует о чистоте фонового электролита – отсутствии в нем, прежде всего Zn, Cd, Pb и Cu. На вольтамперной кривой раствора пробы хозяйственного мыла № 3 (кривая 2) при потенциале –500 мВ имеется небольшой максимум тока окисления, связанный с анодным растворением Cd, и три достаточно хорошо выраженные максимумы тока окисления при потенциалах (мВ): –880; –340; 20, которые обусловлены анодным растворением Zn, Pb и

Сисоответственно. Введение в исследуемый раствор добавки стандартного раствора, содержащего Zn, Cd, Pb и Cu приводит к увеличению максимумов тока окисления (кривая 3).

Анализ данных, представленных на рис. 2 показывает, что водный раствор фонового электролита не содержит ртуть – на вольтамперной кривой отсутствуют какие-либо пики (кривая 1). На вольтамперной кривой, полученной в растворе пробы образца мыла № 4х имеется максимум тока при потенциале 470 мВ, который указывает на анодное окисление накопленной на индикаторном электроде ртути (кривая 2). Введение в раствор пробы мыла № 4х добавки стандартного раствора ртути приводит к возрастанию максимума тока (кривая 3), что обусловлено увеличением массы накопленной на индикаторном электроде ртути из-за более высокой ее концентрации в растворе.



**Рис. 2. Анодные вольтамперные кривые: 1 – фонового электролита ( $0,0175$  моль/дм<sup>3</sup>  $H_2SO_4$  +  $0,002$  моль/дм<sup>3</sup>  $KCl$ ); 2 – пробы образца хозяйственного мыла № 4х; 3 – пробы образца хозяйственного мыла № 4х с добавкой  $0,01$  см<sup>3</sup> стандартного раствора, содержащего  $2$  мг/дм<sup>3</sup>  $Hg$**

Схожий характер анодных вольтамперных кривых наблюдается при исследовании содержания Zn, Cd, Pb, Cu и Hg во всех других изученных образцах мыла.

На основании выполненных исследований по разности вольтамперных кривых пробы и фона, пробы с добавкой стандартного раствора и фона с помощью специализированной компьютерной программы “VALabTx” рассчитано содержание каждого металла во всех изученных образцах мыла. В таблицах 4–6 представлены интервальные

значения содержания Zn, Cd, Pb, Cu и Hg и относительные стандартные отклонения полученных результатов.

Из табл. 4 видно, что во всех изученных образцах твердого хозяйственного мыла содержатся Zn, Cd, Pb, Cu и Hg. Больше всего в хозяйственном мыле содержится Zn: от 76 мг/кг (образец № 7х) до 95 мг/кг (образец № 4х и № 6х). Меньше всего – Cd (изменяется от 0,02 мг/кг для образца № 8х до 0,10 мг/кг для образца № 5х). Содержание Cu в образцах хозяйственного мыла также невелико, хотя и в 5-38 раз больше чем Cd. Несколько больше, чем Cd и Cu содержится в хозяйственном мыле Pb: от 1,9 мг/кг в образце № 4х до 3,8 мг/кг в образцах мыла № 1х,8х.

Содержание Hg по сравнению с другими металлами изменяется от образца к образцу хозяйственного мыла наиболее значительно: наибольшее содержание Hg отмечается для образца № 4х (4,93 мг/кг), а наименьшее – для образца № 3х (0,12 мг/кг), т.е. меньше в 40 и более раз.

В отличие от хозяйственного мыла в изученных образцах твердого туалетного мыла содержание всех тяжелых металлов меньше, что видно из таблицы 5.

Больше всего в твердом туалетном мыле, как и в случае хозяйственного мыла, содержится цинка (от  $21 \pm 0,4$  мг/кг для образца № 8т САМАУ до  $67 \pm 0,8$  мг/кг для образца № 5т NIVEA). По сравнению с цинком содержание Pb, Cu и Hg значительно меньше: в 40–160; в 16–72; в 24–390 раз соответственно. При этом наибольшее содержание Pb характерно для образца № 6т (крем-мыло PALMOLIVE) ( $1,6 \pm 0,06$  мг/кг). В образце мыла № 8т САМАУ содержание Pb наименьшее:  $0,3 \pm 0,01$  мг/кг. Следует отметить, что количество свинца в исследованных образцах мыла в 3–16 раз меньше регламентируемой величины [10].

Содержание меди в исследованных образцах твердого туалетного мыла невелико. Больше всего меди содержится в образце мыла № 1т «Липовый цвет» ( $3,42 \pm 0,095$  мг/кг) а меньше всего – в образце мыла № 6т PALMOLIVE ( $0,47 \pm 0,023$  мг/кг).

Достаточно большое количество ртути содержится в образцах мыла № 2т «Жасмин», № 5т NIVEA и № 7т FAXHAPPYHOME (мг/кг):  $1,82 \pm 0,061$ ;  $1,24 \pm 0,038$ ;  $1,52 \pm 0,055$  соответственно. Причем содержание ртути в этих образцах мыла в 1,8 – 1,2 раза больше регламентируемого СанПиН № 130-А РБ [10].

Что касается Cd, то этот металл в незначительных количествах обнаружен лишь в образцах твердого туалетного мыла № 5т NIVEA и № 8т САМАУ:  $0,0110 \pm 0,0007$  и  $0,0170 \pm 0,0008$  мг/кг соответственно.

Таблица 4

Содержание Zn, Cd, Pb, Cu и Hg в образцах хозяйственного мыла

№ образца мыла	Содержание металлов, мг/кг										
	Zn	S <sub>г</sub> , %	Cd	S <sub>г</sub> , %	Pb	S <sub>г</sub> , %	Cu	S <sub>г</sub> , %	Hg	S <sub>г</sub> , %	
1х	89±1	0,8	0,08±0,005	4,5	3,8±0,10	1,9	0,77±0,03	2,8	0,49±0,02	2,9	
2х	93±2	1,5	0,07±0,004	4,1	3,3±0,09	2,0	0,52±0,02	2,8	2,35±0,09	2,8	
3х	83±1	0,9	0,09±0,005	4,0	3,0±0,07	1,7	0,60±0,02	2,9	0,12±0,01	5,9	
4х	95±2	1,5	0,06±0,004	4,8	1,9±0,05	1,9	0,73±0,03	2,9	4,93±0,11	1,6	
5х	68±1	1,1	0,10±0,006	4,3	2,1±0,06	2,1	0,52±0,02	2,8	2,10±0,09	3,1	
6х	95±2	1,5	0,04±0,002	3,6	2,7±0,06	1,6	0,70±0,03	3,1	0,28±0,01	2,6	
7х	76±1	0,9	0,04±0,002	3,6	3,0±0,08	1,9	0,62±0,02	2,3	0,23±0,01	3,1	
8х	87±1	0,8	0,02±0,001	3,6	3,8±0,09	1,7	0,46±0,02	3,1	0,73±0,03	3,0	



Таблица 5

## Содержание Zn, Cd, Pb, Cu и Hg в образцах твердого туалетного мыла

№ образца мыла	Содержание металла, мг/кг									
	Zn	Sr, %	Cd	Sr, %	Pb	Sr, %	Cu	Sr, %	Hg	Sr, %
1Г	55±0,8	1,1	не обнаружен	-	1,4±0,05	2,7	3,42±0,095	2,0	1,06±0,038	2,6
2Г	45±0,7	1,2	не обнаружен	-	1,2±0,05	2,8	1,82±0,061	2,4	1,82±0,061	2,4
3Г	40±0,7	1,3	не обнаружен	-	0,9±0,04	3,1	0,73±0,033	3,3	0,77±0,042	3,2
4Г	63±0,9	1,0	не обнаружен	-	0,7±0,03	3,3	0,87±0,037	3,1	0,16±0,006	2,8
5Г	67±0,8	0,9	0,0110±0,0007	4,9	0,4±0,02	3,6	1,39±0,052	2,7	1,24±0,038	2,3
6Г	39±0,7	1,3	не обнаружен	-	1,6±0,06	2,5	0,47±0,023	3,5	0,27±0,014	3,0
7Г	38±0,7	1,3	не обнаружен	-	1,2±0,05	2,8	1,84±0,061	2,4	1,52±0,055	2,6
8Г	21±0,4	1,4	0,0170±0,0008	4,7	0,3±0,01	3,6	0,67±0,031	3,3	0,98±0,038	2,8

Таблица 6

## Содержание Zn, Cd, Pb, Cu и Hg в образцах жидкого туалетного мыла

№ образца мыла	Содержание металла, мг/кг									
	Zn	Sr, %	Cd	Sr, %	Pb	Sr, %	Cu	Sr, %	Hg	Sr, %
1Ж	26,9±0,4	1,0	-	-	1,27±0,05	2,9	0,14±0,008	4,0	0,32±0,013	2,9
2Ж	23,4±0,3	0,9	-	-	1,54±0,06	2,8	0,28±0,013	3,4	0,18±0,009	3,8
3Ж	34,0±0,6	1,2	-	-	2,05±0,07	2,7	0,31±0,012	2,9	0,14±0,008	4,1
4Ж	16,0±0,2	0,7	-	-	1,24±0,05	3,0	0,23±0,011	3,6	0,15±0,008	4,0
5Ж	49,8±0,9	1,3	-	-	1,24±0,05	3,1	0,15±0,008	3,9	0,15±0,009	4,1
6Ж	20,1±0,2	0,8	-	-	1,61±0,06	2,8	0,08±0,005	4,8	0,11±0,007	4,3
7Ж	21,9±0,2	0,8	-	-	1,12±0,05	3,2	0,06±0,004	5,0	0,44±0,016	2,6
8Ж	25,1±0,3	1,0	-	-	1,17±0,05	3,2	0,29±0,013	3,3	0,29±0,013	3,2

Из табл. 6 видно, что во всех изученных образцах жидкого туалетного мыла содержатся Zn, Pb, Cu и Hg и отсутствует Cd. Как и в случае хозяйственного и твердого туалетного мыла, в жидком туалетном мыле содержание цинка превышает содержание других тяжелых металлов, и меняется от 16 мг/кг для образца № 4ж Palmolive «Черная орхидея» до 49 мг/кг для образца № 5ж «Клюква» Ultracompact.

Содержание Pb, Cu и Hg в жидком туалетном мыле существенно меньше, чем цинка: в 8–40; в 50–800; в 36–400 раз соответственно. Больше всего Pb содержится в образце № 3ж «Олива» Dulgon и составляет 2,05 мг/кг, меньше всего – в образце № 7ж «Арбуз и бамбук» Dalan (1,12 мг/кг).

Аналогично Pb, больше всего Cu содержится в образце жидкого туалетного мыла № 3ж «Олива» Dulgon (0,31 мг/кг) и меньше всего – в образце № 7ж «Арбуз и бамбук» Dalan (0,06 мг/кг).

Содержание Hg в жидком туалетном мыле в 3 раза меньше требований, регламентируемых ТНПА [8,9,11]. При этом наибольшее содержание Hg характерно для образца мыла № 1ж Help «Зеленый чай» и составляет 0,32 мг/кг, а наименьшее – для образца мыла № 6ж «Клюква» Ultracompact (0,11 мг/кг).

Сравнивая содержание тяжелых металлов в твердом и жидком туалетном мыле (табл. 5, 6), можно отметить следующее. В образцах твердого туалетного мыла цинка и меди содержится 1,5 и 10 раз больше соответственно, чем в образцах жидкого туалетного мыла. Содержание свинца в образцах твердого и жидкого туалетного мыла приблизительно одинаково. Что касается ртути, то содержание этого металла в образцах твердого туалетного мыла приблизительно в 8-10 больше, чем в образцах жидкого туалетного мыла.

Следует отметить, что во всех изученных образцах жидкого туалетного мыла содержание тяжелых металлов не превышает требований ТНПА [8,9,11].

Таким образом, все изученные виды мыла содержат цинк, свинец, медь и ртуть. Помимо этих металлов твердое хозяйственное мыло содержит также кадмий. Образование больших объемов сточных вод, обусловленное широким применением мыла, неизбежно приведет к попаданию тяжелых металлов в окружающую среду и загрязнению ими почвы и водоемов.

### **Выводы**

1. Во всех изученных образцах мыла содержатся Zn, Pb, Cu, Hg, а в образцах хозяйственного мыла – также и Cd.
2. В образцах жидкого туалетного мыла присутствие Cd не обнаружено.
3. Содержание цинка во всех видах мыла больше содержания других тяжелых металлов.

4. Содержание токсичных элементов (Pb, Hg) в изученных образцах твердого и жидкого туалетного мыла не превышает требований ТНПА.

5. Образование сточных вод, обусловленное использованием мыла, может привести к загрязнению почвы и водоемов Zn, Pb, Cu, Hg.

### Список литературы

1. Тиво П.Ф. Тяжелые металлы и экология. Минск: Юнипол, 1996. 230 с.

2. Водяницкий Ю.Н. Тяжелые металлы и металлоиды в почвах. М.: Почвенный институт им. В.В. Докучаева РАСХН, 2008. 164 с.

3. Происхождение натурального мыла и химия современного [Электронный ресурс] // Крымская натуральная коллекция: [сайт]. [2016]. URL: <http://crimea-nature.com/post/143-proishozhdenie-naturalnogo-myla-i-himiya-sovremennogo.html> (дата обращения: 12.05.2016)

4. История мыла и мыловарения. [Электронный ресурс] // Мыльные фантазии: [сайт]. [2016]. URL: <http://www.soapdream.ru/Informatsiya/Statiro-mylovareniyu/Istoriya-myla-i-mylovareniya.html> (дата обращения: 12.05.2016)

5. Российский рынок твердого мыла. М.: Подготовлено экспертами НКО «АППП», 2010. 26 с.

6. Рынок мыла. М.: Intesco Research Group, 2015. 226 с.

7. Обзор российского рынка растительного масла. [Электронный режим] // ILIGENT: ежедневный обзор публикаций по маркетингу[сайт]. URL: [http://www.marketcenter.ru/content/document\\_r\\_57ed7a16-4028-4c82-a9b4-c7fbfc517db0.html](http://www.marketcenter.ru/content/document_r_57ed7a16-4028-4c82-a9b4-c7fbfc517db0.html) (дата обращения: 29.03.2016)

8. О безопасности парфюмерно-косметической продукции: ТР ТС 009/2011 от 23 сентября 2011 г. № 799. Утвержден решением Комиссии таможенного союза.

9. Изделия косметические гигиенические моющие. Общие технические условия. СТБ 1675–2006 введен 01.08.2007 // Госстандарт. Минск: 2011

10. Гигиенические требования к безопасности парфюмерно-косметической продукции, ее производству и реализации: СанПиН № 130-А РБ. введ. 16.09.2008 // ГУРНПЦ РБ. Минск: 2008.

11. Гигиенические требования к производству и безопасности парфюмерно-косметической продукции: СанПиН 1.2.681–97 РФ. введ. 02.01.1998. М.: 1998

12. Носкова Г.Н., Заичко А.В., Иванова Е.Е. Минерализация пищевых продуктов. Методические пособие по подготовке проб для определения содержания токсичных элементов: Практическое руководство. Томск: Изд-во ТПУ, 2007. 30 с.

13. Характеристики погрешности результатов количественного химического анализа. Алгоритмы оценивания: МИ 2336-95. введ. 09.12.1997. Екатеринбург: 1995

*Матвейко Николай Петрович, д-р хим. наук, проф., зав. кафедрой, [Nata2780@yandex.ru](mailto:Nata2780@yandex.ru), Беларусь, Минск, Белорусский государственный экономический университет,*

*Садовский Виктор Васильевич, д-р техн. наук, проф., первый проректор университета, [Nata2780@yandex.ru](mailto:Nata2780@yandex.ru), Беларусь, Минск, Белорусский государственный экономический университет,*

*Носова Наталия Михайловна, канд. хим. наук, доц., [Nata2780@yandex.ru](mailto:Nata2780@yandex.ru) Россия, Тула, Тульский государственный университет*

## ENVIRONMENTAL ASPECT OF SOAP APPLICATIONS

*N.P. Matveiko, V.V. Sadovsky, N.M. Nosova*

*The content of heavy metals in samples of solid laundry soap, of solid and liquid toilet soaphave been studied by stripping voltammetry. It is found, that all investigated samples of soaps contain Zn, Pb, Cu, Hg, and samples of laundry soap – also Cd. Formation of wastewaters, resulting from the use of soap can lead to over-contamination of water and soils by heavy metals.*

*Keywords: soap, inversion voltammetry, heavy metals, concentration*

*Matvejko Nikolaj Petrovich, doctor of technical science, professor, head of the department, [Nata2780@yandex.ru](mailto:Nata2780@yandex.ru), Belarus, Minsk, Belarusian State Economic University,*

*Sadovskiy Viktor Vasil'evich, doctor of technical science, professor, first vice rector of university, [Nata2780@yandex.ru](mailto:Nata2780@yandex.ru), Belarus, Minsk, Belarusian State Economic University,*

*Nosova Nataliya Mikhaylovna, candidate of chemical sciences, docent, [Nata2780@yandex.ru](mailto:Nata2780@yandex.ru), Russia, Tula, Tula State University*

УДК 547.831.7 + 547.183

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ЭЛЕКТРОННАЯ СТРУКТУРА ГИДРИДНОГО $\sigma$ -АДДУКТА 5,7-ДИНИТРО-8-ОКСИХИНОЛИНА ПО РАСЧЕТАМ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ТЕОРИИ ФУНКЦИОНАЛА ПЛОТНОСТИ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ДАННЫМ

И.И. Устинов, И.В. Блохин, Ю.М. Атрощенко, И.В. Шахкельдян,  
В.А. Арляпов, О.И. Бойкова, М.А. Рябов

*Аннотация:* Проведено квантово-химическое моделирование молекулярной и электронной структуры гидридного  $\sigma$ -аддукта 5,7-динитро-8-оксихинолина в рамках приближения теории функционала плотности. Сравнение экспериментальных и вычисленных спектров  $\sigma$ -аддукта показало хорошую сходимость, что говорит об объективности выбранного метода расчета. Установлено, что наибольший отрицательный заряд в исследуемом анионе сосредоточен на атоме углерода C-7 по сравнению с C-5.

*Ключевые слова:* метод DFT, гидридный аддукт 5,7-динитро-8-оксихинолина

### Введение

Исследования в области химии азотсодержащих гетероциклов являются одними из наиболее интенсивно развивающихся направлений современной органической химии, что связано со своеобразием их свойств и большой практической ценностью. Одним из путей функционализации полинитрогетероциклов является восстановительная активация путем образования анионных  $\sigma$ -аддуктов и последующее взаимодействие с электрофильными агентами. Так, реакция Манниха  $\sigma$ -аддукта 5,7-динитро-8-оксихинолина идет по атомам углерода, связанным с нитрогруппами [1, 2]. В связи с этим представляло интерес квантово-химическое моделирование молекулярной и электронной структуры указанного аниона и сравнение расчетных и экспериментальных данных. Для этого необходимо было решить следующие задачи:

1. Оптимизация молекулярной и электронной структуры гидридного  $\sigma$ -аддукта 5,7-динитро-8-оксихинолина методом DFT.
2. Вычисление электронного и ИК спектров изучаемого  $\sigma$ -аддукта и сравнение их с экспериментальными данными с целью оценки объективности выбранного метода расчета.
3. Определение зарядовых факторов, благоприятствующих протеканию реакции  $\sigma$ -аддукта с электрофильными агентами в положениях 5 и 7.

### Материалы и методы

Синтез двухзарядного анионного гидридного  $\sigma$ -аддукта 5,7-динитро-8-оксихинолина (**2**) осуществляли по следующей методике: 0,470

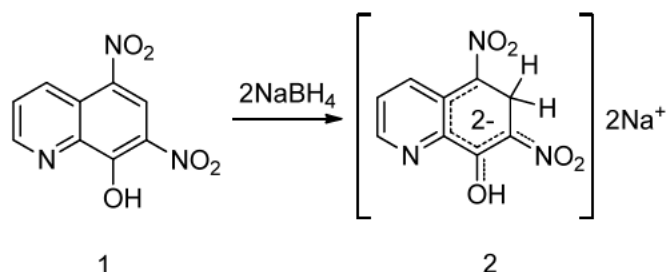
г (2 ммоль) 5,7-динитро-8-оксихинолина суспензировали в 15 мл диметилацетамида и охлаждали до 0-5<sup>0</sup>С в бане со льдом. К полученной смеси порциями добавляли раствор 0,304 г (8 ммоль) NaBH<sub>4</sub> в 2 мл 5 % раствора карбоната натрия при перемешивании. После чего реакционную массу выдерживали 30 мин. Выпавший осадок гидридного аддукта отфильтровывали, промывали холодным диметилацетамидом, затем холодным спиртом и сушили под вакуумом.

Спектры ЯМР <sup>1</sup>Н регистрировали на спектрометре BrukerAC-300 (300.13 МГц) в ДМСО-d<sub>6</sub>. Химические сдвиги приведены в миллионных долях (м. д.) в шкале δ относительно гексаметилдисилоксана. ИК-спектры были получены на Фурье-спектрометре ФСМ 1201 в таблетках KBr (1.5:300) с разрешением 4 см<sup>-1</sup>. Электронные спектры регистрировали на УВИ – спектрофотометре СФ-2000 в воде.

Квантово-химическое моделирование электронной структуры молекул проводили в рамках приближения теории функционала плотности с использованием гибридного трехпараметрического обменного функционала Беке [3] с корреляционным функционалом Ли-Янга-Парра [4] (B3LYP) [5] и базисного набора def2-SV(P) [6]. Проводили полную оптимизацию геометрии без ограничений по типу симметрии. Характер стационарных точек на поверхности потенциальной энергии контролировали расчетом гессiana. Для анализа электронной структуры исследуемого соединения применяли подход естественных связывающих орбиталей (NBO) [7]. Все вычисления проводились средствами программного комплекса Firefly 7.1.G [8].

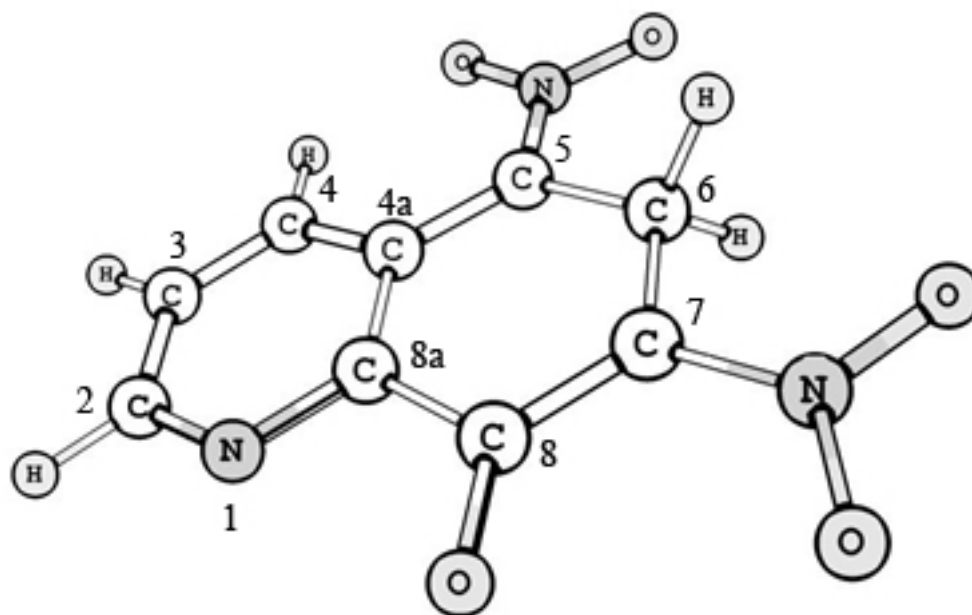
### Обсуждение результатов

При обработке 5,7-динитро-8-оксихинолина (1) избытком тетрагидридобората натрия образуется двухзарядный гидридный σ-аддукт (2), который может быть использован как синтон в реакции Манниха, а также с другими электрофильными агентами. Строение указанного соединения было доказано методами ЯМР <sup>1</sup>Н, ИК и электронной спектроскопии.



Так в спектре ЯМР <sup>1</sup>Н динатриевой соли 5,7-бис(аци-нитро)-5,6,7,8-тетрагидрохинолин-8-она (2) сигнал двух протонов при атоме С-6 наблюдается в сильном поле при δ3,85 м.д., что свидетельствует о sp<sup>3</sup>-гибридизации данного атома углерода.

На первом этапе квантово-химических расчетов была проведена оптимизация молекулярного и электронного строения аддукта (2) в рамках приближения теории функционала плотности. Как было показано, полученная геометрическая структура соответствует теоретическим представлениям о строении подобных интермедиатов, в которых атом углерода C-6 находится в состоянии  $sp^3$ -гибридизации, о чем также свидетельствуют данные ЯМР спектроскопии. На рис. 1. представлена оптимизированная структура исследуемого соединения (2).



**Рис. 1. Структура гидридного аддукта (2), оптимизированная методом DFT**

Для оценки объективности проведенных расчетов нами было произведено сравнение вычисленных и экспериментальных электронных и ИК спектров гидридного  $\sigma$ -аддукта(2). На рис. 2 и 3, а также в табл. 1, представлены рассчитанный и экспериментальный электронные спектры изучаемого соединения.

Как видно из табл. 1, указанный аддукт имеет три основных максимума поглощения, причем наблюдается хорошая сходимость рассчитанных и экспериментальных данных в УФ-спектре.

В табл. 2 представлены основные полосы поглощения в рассчитанном и экспериментальном ИК спектре гидридного  $\sigma$ -аддукта 5,7-динитро-8-оксихинолина (2).

Как видно из табл. 2, хорошая сходимость в полосах поглощения экспериментального и расчетного ИК спектров гидридного  $\sigma$ -аддукта 5,7-динитро-8-оксихинолина (2) наблюдается в случае валентных колебаний

C-Связей ароматического кольца, симметричных колебаний нитрогрупп, а также деформационных колебаний метиленой группы (атом C-6). Удовлетворительные результаты были получены для валентных колебаний алифатических C-H связей, а также для асимметричных колебаний нитрогрупп.

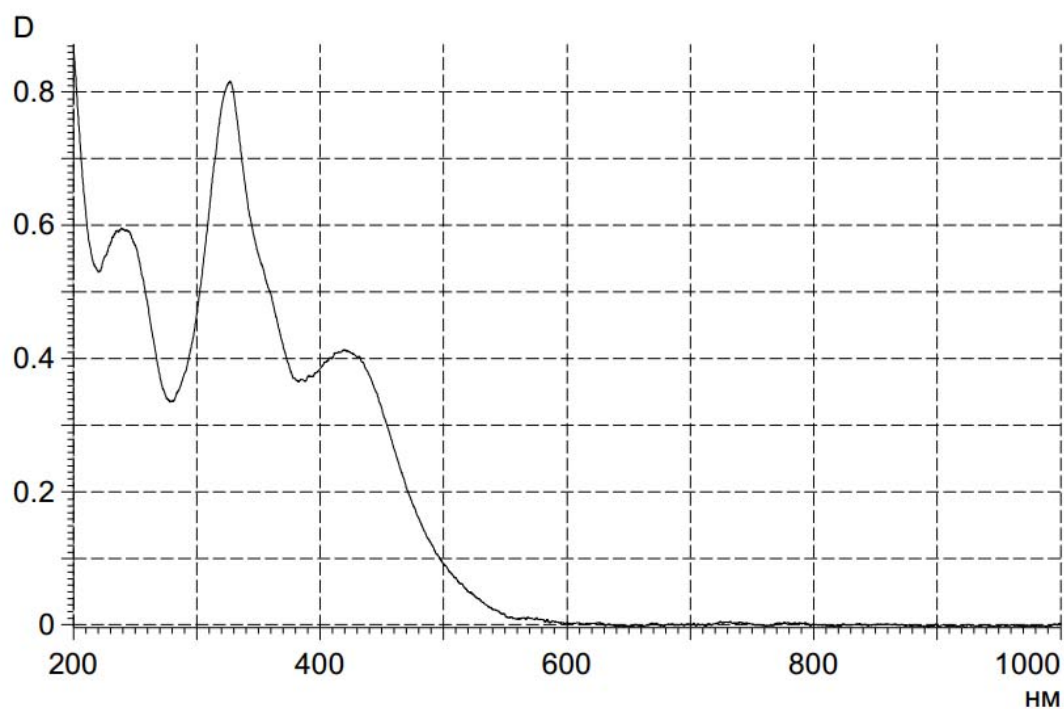


Рис. 2. Экспериментальный УФ спектр гидридного  $\sigma$ -аддукта 5,7-динитро-8-оксихинолина (2) в воде

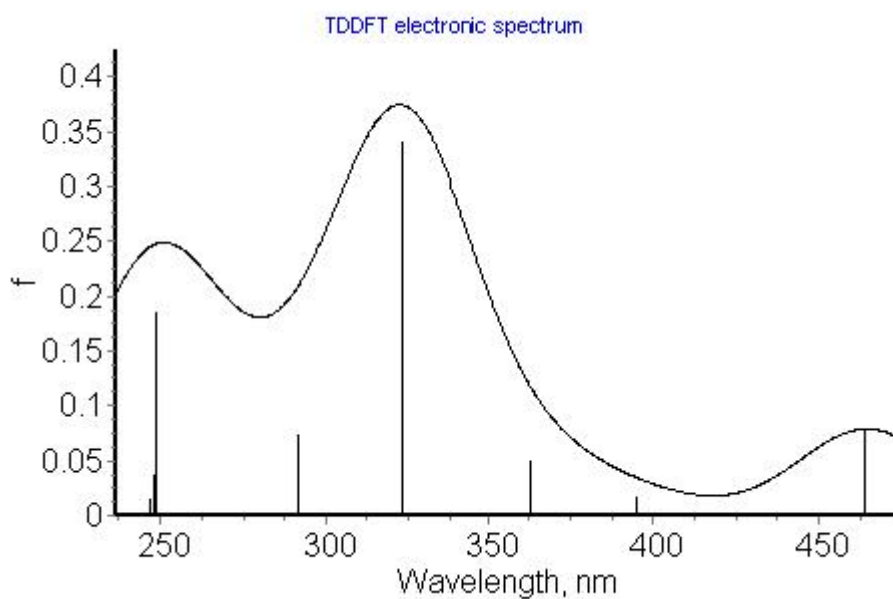


Рис. 3. УФ спектр гидридного  $\sigma$ -аддукта 5,7-динитро-8-оксихинолина (2), рассчитанный методом DFT



Таблица 1

**Основные максимумы поглощения в рассчитанном и экспериментальном УФ спектрах гидридного  $\sigma$ -аддукта 5,7-динитро-8-оксихинолина (2)**

Максимумы поглощения в экспериментальном спектре, $\lambda$ , нм	Максимумы поглощения в рассчитанном спектре, $\lambda$ , нм
419,2	464,7
327,2	324,0
239,2	348,9

Таблица 2

**Основные полосы поглощения в рассчитанном и экспериментальном ИК спектрах гидридного  $\sigma$ -аддукта 5,7-динитро-8-оксихинолина (2)**

Тип колебаний	Полоса поглощения в экспериментальном спектре, $1/\lambda$ , $\text{см}^{-1}$	Полоса поглощения в рассчитанном спектре, $1/\lambda$ , $\text{см}^{-1}$
$\nu$ (C-H <sub>алиф</sub> )	2921, 2850	2952, 2948
$\nu$ (C-C <sub>аром</sub> )	1605, 1553	1615, 1571
$\delta$ (CH <sub>2</sub> )	1469	1469
$\nu_{\text{as}}$ (NO <sub>2</sub> )	1568	1495
$\nu_{\text{s}}$ (NO <sub>2</sub> )	1346	1355

Таблица 3

**Заряды на атомах гидридного  $\sigma$ -аддукта 5,7-динитро-8-оксихинолина (2)**

Атом	Заряд на атоме по Малликену	Заряд на атоме по Лёвдину	Заряды NBO
N-1	-0,179	-0,195	-0,597
C-2	-0,035	-0,119	0,078
C-3	-0,215	-0,370	-0,478
C-4	-0,196	-0,231	-0,252
C-4a	0,079	-0,053	-0,150
C-5	0,180	0,120	0,372
C-6	0,068	-0,224	-0,501
C-7	-0,094	-0,123	0,048
C-8	0,017	-0,064	0,333
C-8a	-0,354	-0,161	0,021

Таким образом, хорошая сходимость рассчитанных и экспериментальных электронных и ИК спектров исследуемого соединения (2) свидетельствует об объективности выбранного квантово-химического метода.

С целью определения наиболее вероятного направления атаки электрофила нами были определены заряды на атомах в исследуемом анионе (2) (табл. 3). При анализе зарядов на атомах, полученных с помощью NBO-анализа орбитальных заселенностей, видно, что на атоме углерода C-5 сосредоточен больший положительный заряд, чем на атоме углерода C-7. Еще более иллюстративными в этом плане оказались результаты расчетов зарядов по Малликену и Лёвдину. Из таблицы 3 видно, что атом углерода в положении 7 имеет отрицательный заряд, в отличие от атома углерода C-5. Таким образом зарядовый контроль показывает, что атака электрофила наиболее вероятна по атому углерода C-7 исследуемого гидридного  $\sigma$ -аддукта 5,7-динитро-8-оксихинолина (2).

### **Выводы**

1. Проведено квантово-химическое моделирование молекулярной и электронной структуры гидридного  $\sigma$ -аддукта на основе 5,7-динитро-8-оксихинолина в рамках приближения теории функционала плотности. Показано, что рассчитанная структура соответствует теоретическим представлениям о строении подобных аддуктов.

2. Сравнение экспериментальных и вычисленных электронных и ИК спектров  $\sigma$ -аддукта показало хорошую сходимость, что говорит об объективности выбранного метода расчета.

3. Определение зарядов на атомах показало, что из двух атомов углерода C-5 и C-7, связанными с аци-нитрогруппами, наибольший отрицательный заряд сосредоточен на атоме углерода C-7.

### **Список литературы**

1. Синтез структурных аналогов цитизина конденсацией по Манниху анионного аддукта 5,7-динитро-8-гидроксинолина / И.Е. Якунина, И.В. Шахкельдян, Ю.М. Атрощенко и др. // Журнал органической химии. 2005. Т. 41. № 8. С. 1259-1260.

2. Гидридные аддукты динитрохинолинов в мультикомпонентной реакции Манниха / А.Ю. Медведева, И.Е. Якунина, Ю.М. Атрощенко и др. // Журнал органической химии. 2011. Т. 47. № 11. С. 1696-1699.

3. Becke A.D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange // J. Chem. Phys. 1993. V.98. pp. 5648-5652.

4. Lee C., Yang W., and Parr R.G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density // Phys. Rev. 1988. B37. pp. 785-789.

5. Ab initio calculation of vibrational absorption and circular dichroism spectra using density functional force fields / P.J. Stephens, F.J. Devlin, C.F. Chabalowski et al//J. Phys. Chem. 1994. V. 98. pp. 11623-11627.

6. Schaefer, C. Huber, R. Ahlrichs. Fully optimized contracted Gaussian-basis sets of triple zeta valence quality for atoms Li to Kr// J. Chem. Phys., 1994. V. 100. pp. 5829-5835.

7. NBO 5.G. E.D. Glendening, J.K. Badenhoop, A.E. Reed, J.E. Carpenter, J.A. Bohmann, C.M. Morales, F. Weinhold. Theoretical Chemistry Institute, University of Wisconsin, Madison, WI. 2004. <http://www.chem.wisc.edu/~nbo5>

8. Alex A. Granovsky, Firefly version 7.1.G, [www http://classic.chem.msu.su/gran/firefly/index.html](http://classic.chem.msu.su/gran/firefly/index.html)

Устинов Илья Игоревич, аспирант, [bai2688@yandex.ru](mailto:bai2688@yandex.ru), Россия, Тула, Тульский государственный педагогический университет им. Л.Н. Толстого,

Блохин Игорь Васильевич, канд.хим.наук, доц., [blokhiniv@mail.ru](mailto:blokhiniv@mail.ru), Россия, Тула, Тульский государственный педагогический университет им. Л.Н. Толстого,

Атрощенко Юрий Михайлович, д-р.хим.наук, проф., зав. кафедрой, [reaktiv@tspu.tula.ru](mailto:reaktiv@tspu.tula.ru), Россия, Тула, Тульский государственный педагогический университет им. Л.Н. Толстого,

Шахкельдян Ирина Владимировна, д-р.хим.наук, проф., [reaktiv@tspu.tula.ru](mailto:reaktiv@tspu.tula.ru), Россия, Тула, Тульский государственный педагогический университет им. Л.Н. Толстого,

Арляпов Вячеслав Алексеевич, канд.хим.наук, доц., [v.a.arlyapov@gmail.com](mailto:v.a.arlyapov@gmail.com), Россия, Тула, Тульский государственный университет,

Бойкова Ольга Ивановна, канд.хим.наук, доц., [benosi@mail.ru](mailto:benosi@mail.ru), Россия, Тула, Тульский государственный педагогический университет им. Л.Н. Толстого,

Рябов Михаил Алексеевич, канд.хим.наук, доц., [maryabov@mail.ru](mailto:maryabov@mail.ru), Россия, Москва, Российский университет дружбы народов

## THE MOLECULAR AND ELECTRONIC STRUCTURE OF THE HYDRIDE $\sigma$ -ADDUCT OF 5,7-DINITRO-8-HYDROXYQUINOLINE ACCORDING TO CALCULATIONS BY THE METHOD OF DENSITY FUNCTIONAL THEORY AND THE EXPERIMENTAL DATA

*I.I. Ustinov, I.V. Blokhin, Yu.M. Atroshchenko, I.V. Shakhkel'dyan,  
V.A. Arlyapov, O.I. Boykova, M.A. Ryabov*

*Abstract. Quantum-chemical modeling of the molecular and electronic structure of the hydride  $\sigma$ -adduct based on 5,7-dinitro-8-hydroxyquinoline in the approximation of the density functional theory were carried out. Comparison of experimental and calculated electronic and IR spectra  $\sigma$ -adduct showed good agreement, indicating that the objectivity of the chosen calculation method. It has been established that the greatest negative charge in the anion studied is concentrated on the carbon atom C-7 compared to C-5.*

*Keywords: DFT method, hydride adduct of 5,7-dinitro-8-hydroxyquinoline*

*Ustinov Il'ya Igorevich, postgraduate student, [bai2688@yandex.ru](mailto:bai2688@yandex.ru), Russia, Tula, Tolstoy Tula State Pedagogical University,*

*Blokhin Igor' Vasil'evich, candidate of chemical sciences, docent, [blokhiniv@mail.ru](mailto:blokhiniv@mail.ru), Russia, Tula, Tolstoy Tula State Pedagogical University,*

*Atroshchenko Yuriy Mikhaylovich, doctor of chemical sciences, professor, manager of katedra, [reaktiv@tspu.tula.ru](mailto:reaktiv@tspu.tula.ru), Russia, Tula, Tolstoy Tula State Pedagogical University,*

*Shakhkel'dyan Irina Vladimirovna, doctor of chemical sciences, professor, [reaktiv@tspu.tula.ru](mailto:reaktiv@tspu.tula.ru), Russia, Tula, Tolstoy Tula State Pedagogical University,*

*Arlyapov Vyacheslav Alekseevich, candidate of chemical sciences, docent, [v.a.arlyapov@gmail.com](mailto:v.a.arlyapov@gmail.com), Russia, Tula, Tula State University,*

*Boykova Ol'ga Ivanovna, candidate of chemical sciences, docent,, [benosi@mail.ru](mailto:benosi@mail.ru), Russia, Tula, Tolstoy Tula State Pedagogical University,*

*Ryabov Mikhail Alekseevich, candidate of chemical sciences, docent, [maryabov@mail.ru](mailto:maryabov@mail.ru), Russia, Moscow, Peoples' Friendship University of Russia*

УДК 543.9 + 543.38

## ПОЛУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНЫХ РЕЦЕПТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ НА ОСНОВЕ ГИДРОГЕЛЯ ПОЛИВИНИЛОВОГО СПИРТА ДЛЯ СОЗДАНИЯ БПК-БИОСЕНСОРА

Л.Д. Асулян, О.А. Камаева, В.А. Арляпов, В.А. Алферов

*Проведена модификация поливинилового спирта (ПВС) окислительной сшивкой полимерных цепей нитратом церия (IV) - аммония, приводящая к образованию сетчатой структуры. Получены основные характеристики рецепторного элемента на основе дрожжевых клеток *Debaryomyces hansenii*, иммобилизованных в сшитый ПВС.*

*Ключевые слова: поливиниловый спирт, церий-аммоний нитрат, иммобилизация, дрожжи *Debaryomyces hansenii*, биорецепторный элемент, биосенсор, индекс биохимического потребления кислорода (БПК)*

### Введение

Экспресс-оценка степени загрязнения объектов окружающей среды органическими соединениями является необходимым компонентом экологического контроля. В частности, в настоящее время важны разработки методов и аппаратуры для экспресс-анализа проб воды. Одним из наиболее важных параметров, определяющим загрязненность проб воды, является индекс биохимического потребления кислорода (БПК). БПК отражает количество кислорода в мг/дм<sup>3</sup>, потребленное при окислении биоразлагаемых органических соединений. В соответствии с мировой практикой наиболее современным и эффективным подходом для оценки БПК является биосенсорный метод определения [1].

БПК-биосенсоры - устройства, использующие биологические материалы для определения биоразлагаемых органических веществ и выдающие информацию об их присутствии и количестве в виде электрического сигнала. К преимуществам БПК-биосенсоров можно отнести короткое время ответа, портативность, удобство в работе, а также отсутствие специальных требований к приготовлению исследуемого образца [2].

Ключевым этапом в создании стабильного рецепторного элемента биосенсора является иммобилизация биологического материала, от успеха которой зависит возможность измерения сигнала, операционные характеристики сенсора, чувствительность и селективность определения органических компонентов в смесях сложного состава. Перспективными носителями для иммобилизации клеток микроорганизмов являются органические полимерные материалы, как природные, так и синтетические [3]. Природные полимеры, как правило, механически непрочные и биodeградируемые. Использование синтетических полимеров позволяет получать пленки и гели, длительное время удерживающие биологический

материал. Среди синтетических полимеров широкое распространение получил поливиниловый спирт (ПВС) как химически и микробиологически стабильный, нетоксичный и биосовместимый носитель. С целью получения нерастворимых в воде гидрогелей макромолекулы ПВС сшивают поперечными связями[4].

Целью данной работы является получение полимерного гидрогеля на основе ПВС для иммобилизации микроорганизмов окислительной сшивкой под действием нитрата церия (IV) – аммония.

### **Экспериментальная часть**

Модификация ПВС окислительной сшивкой. Для получения сшитого полимера к 20 мл 5 % водного раствора ПВС (M = 78000, марка 16/1) прибавляли 0,8 мл водного раствора нитрата церия-аммония  $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$  (T = 0,1 г/мл) при постоянном перемешивании. Перемешивание проводили при 55°C в атмосфере инертного газа в течение 3-х часов.

Определение вязкости раствора поливинилового спирта. Анализ проводили методом капиллярной вискозиметрии. Измерения вязкости проводились на вискозиметре ВПЖ-2. Экспериментально определяли относительную вязкость как отношение времени истечения раствора полимера ко времени истечения растворителя по известной методике. [5].

$$\eta_{\text{отн}} = t/t_0$$

$\eta_{\text{отн}}$  – относительная вязкость;

t и  $t_0$  – время истечения раствора полимера и растворителя

Определение доли сшитого полимера в пленке модифицированного поливинилового спирта. Определение доли сшитого полимера проводили методом экстракции. Образец пленки взвешивали, заливали водой и перемешивали в течение 4-6 часов при t = 50-60°C, затем воду сливали, а набухшую пленку сушили до постоянной массы. [5]. Опыт повторяли несколько раз до постоянной массы образца.

Культивирование клеток микроорганизмов. Клетки штамма *D. hansenii* ВКМ Y-2482 были получены из Всероссийской коллекции микроорганизмов ИБФМ РАН (г. Пущино). Дрожжи выращивали на богатой минеральной среде следующего состава: глюкоза – 10 г/дм<sup>3</sup>, пептон – 5 г/дм<sup>3</sup>, дрожжевой экстракт – 0,5 г/дм<sup>3</sup> (Sigma, США). Среду для выращивания клеток стерилизовали автоклавированием при давлении 101,325 кПа и температуре 121 °C в течение 45 минут. Клетки выращивали аэробно 18-20 часов в качалочных колбах объемом 750 см<sup>3</sup> при температуре 29 °C. Затем полученную биомассу центрифугировали при комнатной температуре 10 минут (10000 об/мин) и промывали центрифугат 20 мМ фосфатным буфером, рН 6,8. Осевшие клетки переносили в свежий буфер, распределяли по порциям и осаждали на

центрифуге «Eppendorf» 5 минут при 10000 об/мин. Промытую биомассу взвешивали и хранили в микропробирках при температуре 25 °С.

Иммобилизация дрожжевых клеток в пленку из ПВС. Микропипеткой отбирали необходимое количество раствора модифицированного ПВС и добавляли в него дрожжевые клетки *D. hansenii* (20 мг биомассы на 100 мкл ПВС). Для равномерного распределения клеток в полимере проводили встряхивание в течение 5 минут на центрифуге «Sky Line». 200 мкл полученной смеси переносили в блистерную упаковку  $d = 6-8$  мм и высушивали на воздухе до полного высыхания в течение 24 часов. Подготовленный биорецепторный элемент помещали на поверхность кислородного электрода типа Кларка и закрепляли с помощью фиксатора.

Иммобилизация клеток адсорбцией на стекловолоконном фильтре. Выращенные клетки микроорганизмов промывали фосфатным буферным раствором (20 мМ, рН 6,8), центрифугировали (2000 об/мин, 10 мин), осадок сырой массы клеток взвешивали и разбавляли определённым количеством раствора буфера до концентрации 150 мг/см<sup>3</sup>. Полученную смесь наносили на пористый стекловолоконный фильтр (Whatman GF/A, Sigma) в объеме 0,003 см<sup>3</sup>. Рецепторный элемент размером 3×3 мм подсушивали на воздухе в течение 15 мин при 200 С. Подготовленный биорецепторный элемент помещали на поверхность кислородного электрода типа Кларка и закрепляли с помощью фиксатора.

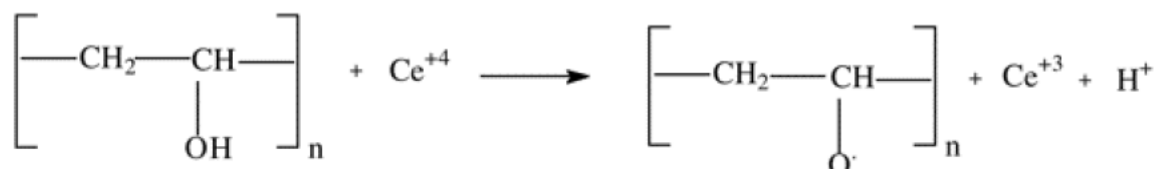
Биосенсорные измерения. Электрохимические измерения проводили с использованием рН-метр-иономер-БПК-термооксиметра ЭКСПЕРТ-001-4.0.1 (ООО «Эконикс-эксперт», Россия), сопряженного с персональным компьютером, работающим под управлением специализированного программного обеспечения EXP2PR (ООО «Эконикс-эксперт», Россия). Измеряемым параметром (ответом биосенсора) являлась максимальная скорость изменения концентрации кислорода при добавлении субстратов (мг/дм<sup>3</sup>·мин). Датчиками являлись кислородные электроды типа Кларка с иммобилизованными клетками микроорганизмов. Измерения выполнены в кювете объемом 5 мл. Для измерений использовали натрий-калиевый фосфатный буферный раствор (рН = 6,8), концентрация солей в котором составляла 20 мМ. Раствор перемешивали магнитной мешалкой (200 об/мин). Пробы вводили автоматическими микропипетками переменного объема (200 – 1000 мкл, 20 – 200 мкл, 0.5 – 10 мкл, Biotech, США).

### Результаты и обсуждение

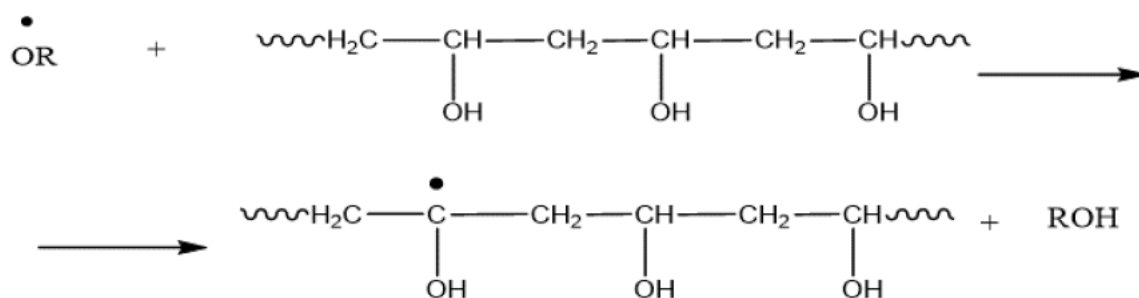
Долговременная стабильность и механическая прочность рецепторных элементов, полученных иммобилизацией микроорганизмов в полимерный гидрогель, зависит от степени сшивки макромолекул исходного полимера. Ранее сообщалось о синтезе композиционной

матрицы для иммобилизации бактериальных клеток модификацией поливинилового спирта N-винилпирролидоном (N-ВП) в присутствии церий-аммоний нитрата и предложен механизм образования сшитого полимера через стадию образования оксильных радикалов [4]. В настоящее время выпуск N-винилпирролидона в России остановлен. В связи с этим в целях решения проблемы импортозамещения было решено провести сшивку ПВС в отсутствие N-ВП.

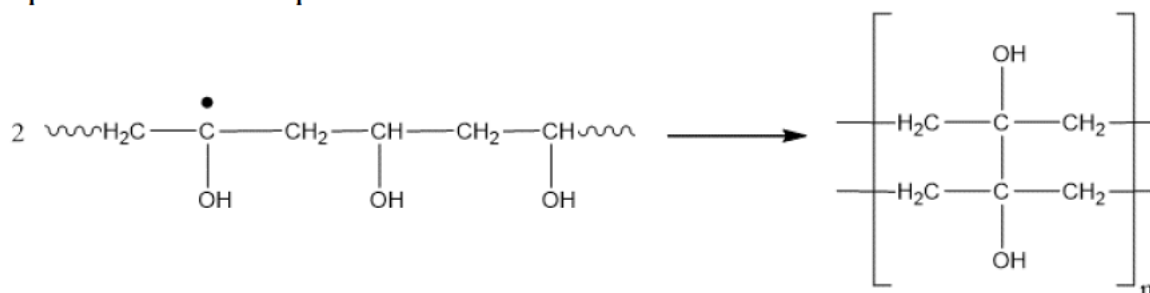
Естественно было предположить, что оксильные радикалы, образующиеся на первой стадии при восстановлении ионов церия:



способны вести реакции роста цепи и сшивки и без участия N-ВП, так как известно, что они весьма активны в реакциях отрыва атомов водорода от всех СН-связей поливинилового спирта [6]:



Далее может происходить рекомбинация алкильных радикалов с образованием поперечных сшивок:



Для получения сшитого полимера 5 % водный раствор ПВС перемешивали в инертной атмосфере при 55<sup>0</sup>С в течение 3 часов в присутствии церий-аммоний нитрата при мольном соотношении полимер : инициатор = 2400:15. Методом капиллярной вискозиметрии была определена относительная вязкость полученного раствора как отношение времени истечения раствора полимера ко времени истечения растворителя, которая составила 10,2 ± 0,2. Относительна вязкость раствора ПВС, модифицированного N-винилпирролидоном, полученного по описанной методике [4], составила 13,7±0,4. Незначительное снижение вязкости раствора полимера в отсутствие N-винилпирролидона в качестве



сшивающего агента, можно объяснить более низкой молекулярной массой получающегося сшитого полимера.

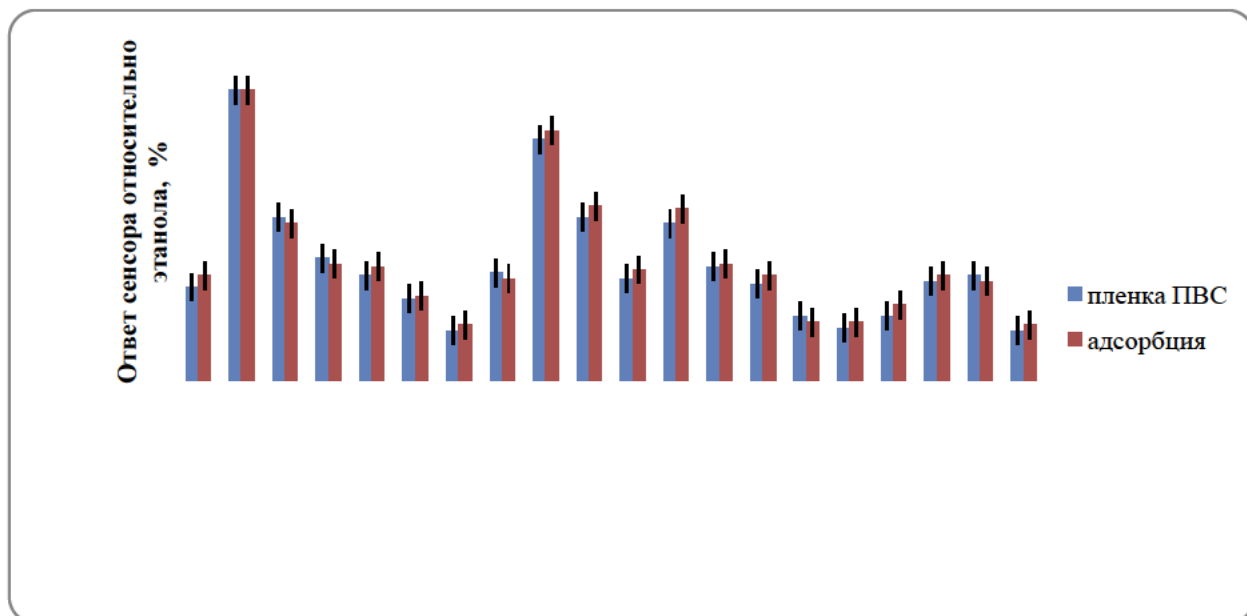
Для доказательства сетчатой структуры полимерного материала, была определена доля сшитого полимера в пленке методом экстракции. Известно, что ПВС растворяется в воде [7], сетчатые же полимеры набухают, но не растворяются. Образец пленки взвешивали, заливали водой и перемешивали в течение 4-6 часов, при  $t = 50-60^{\circ}\text{C}$ , затем воду сливали, а набухшую пленку сушили и взвешивали. Опыт повторяли несколько раз до постоянной массы высушенного образца. Доля сшитого полимера составила около 50 %, в то время как для ПВС, модифицированного N-ВП, этот показатель составляет 10-16 % [8].

Модифицированный в результате окислительной сшивки ПВС использовали для формирования рецепторных элементов БПК-биосенсора иммобилизацией дрожжевых клеток *Debaryomyces hansenii*.

При разработке рецепторного элемента биосенсора для определения БПК предпочтительно использовать целые клетки микроорганизмов, обладающие широкой субстратной специфичностью. Широкая субстратная специфичность при этом является преимуществом, так как приводит к повышению правильности результатов анализа БПК. Оценка субстратной специфичности иммобилизованных микроорганизмов была проведена по 20 субстратам, включая спирты, углеводы и карбоновые кислоты. Для проведения эксперимента использовались растворы субстратов одинаковой концентрации (0,1 моль/дм<sup>3</sup>), за 100 % принимался ответ биосенсора на этанол. Результаты представлены на рисунке.

Из данных, приведенных на рисунке, видно, что иммобилизация дрожжей *Debaryomyces hansenii* в пленку модифицированного ПВС практически не изменяет их субстратную специфичность по сравнению с наиболее щадящим методом иммобилизации – адсорбцией: ответ сенсора на спирты уменьшается по мере увеличения длины углеводородного радикала и степени его разветвления; величина отклика на углеводы уменьшается при переходе от альдоз (глюкоза) к кетозам (фруктоза); окисление дисахаридов (сахароза и лактоза) проходит менее интенсивно, чем моносахаридов; многоосновные кислоты окисляются более эффективно (32-35 %) по сравнению с одноосновными (19-24 %).

Все аналитические и метрологические характеристики биорецепторного элемента были определены для глюкозо-глутаматной смеси (ГГС), так как её применение в качестве стандарта при анализе БПК предусмотрено федеративными природоохранными нормативными документами [9].



**Портрет субстратной специфичности дрожжей *Debaryomyces hansenii*, иммобилизованных адсорбцией на стекловолоконном фильтре и в пленку модифицированного ПВС.**

**Сравнительная характеристика рецепторных элементов на основе ПВС, модифицированного окислительной сшивкой (полимер I) и N-винилпирролидоном (полимер II) при определении содержания глюкозо-глутаматной смеси (ГГС).**

Характеристики	Полимер I	Полимер II [10]
Относительное стандартное отклонение по 10 измерениям, %	1,0	4,2
Долговременная стабильность, сутки	36	30
Коэффициент чувствительности, мин <sup>-1</sup>	0,0025±0,0001	0,0045±0,0003
Нижняя граница определяемых содержаний, мг/дм <sup>3</sup>	0,54	0,7
Продолжительность одного измерения, мин.	5-7	5-7

Из результатов, приведенных в таблице видно, что увеличение доли сшитого полимера в рецепторном элементе на основе ПВС, модифицированного окислительной сшивкой (полимер I) приводит к более высокой долговременной стабильности – 36 суток, по сравнению с полимером ПВС-N-ВП (полимер II) – 30 суток. Операционная

стабильность, характеристикой которой является относительное стандартное отклонение по 10 последовательным измерениям, также оказалась выше для рецепторного элемента на основе полимера I: относительное стандартное отклонение составило 1 %, против 4,2 % для полимера II.

Коэффициент чувствительности, характеризующий скорость развития отклика биосенсора при введении субстрата, для рецепторных элементов на основе полимера I снижается по сравнению с полимером II: 0,0025 и 0,0045 мин<sup>-1</sup> соответственно. Очевидно, что в рецепторном элементе с более высоким содержанием сшитого полимера меньше размер пор и активные центры биокатализатора менее доступны. Тем не менее, это не повлияло на продолжительность одного измерения, которое составляет 5-7 минут.

### Выводы

1. Показано, что окислительная сшивка поливинилового спирта под действием нитрата церия-аммония в отсутствие N-винилпирролидона в качестве сшивающего агента позволяет получить гидрогель, пригодный для иммобилизации микроорганизмов.

2. Показано, что биорецепторные элементы на основе ПВС, модифицированного окислительной сшивкой, обладают более высокой операционной и долговременной стабильностью по сравнению с биорецепторами на основе гидрогеля ПВС-N-ВП.

3. Биосенсоры с рецепторными элементами на основе ПВС, модифицированного окислительной сшивкой, могут быть с успехом использованы при определении БПК, так как имеют низкий предел обнаружения органических примесей и обладают высокой долговременной и операционной стабильностью.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта "УМНИК" № 8358ГУ/201

### Список литературы

1. Methods for assessing biochemical oxygen demand (BOD): a review/ S.Jouanneau, L.Recoules, M.J.Durand et al//Water research. 2014. Т. 49. С. 62-82.

2. Микробные биосенсоры для определения биологического потребления кислорода/ О.Н.Понаморева, В.А.Арляпов, В.А.Алферов и др.// Прикладная биохимия и микробиология.2011. Т.47. №1. С. 5-15.

3. Handbook of Biosensors and Biochips. / Edited by Marks R. S., Cullen D. C., Karube I., Lowe C. R., Weetall H. 2007. 356 p.

4. Получение стабильного рецепторного элемента биосенсора иммобилизацией бактериальных клеток *Glucanobacteroxydans* в пленку из поливинилового спирта, модифицированного N-винилпирролидоном / В.А.Алферов, Н.М.Филатова, Л.Д. Асулян и др. // Известия Тульского государственного университета. Химия. Вып. 1. 2011. С. 210-220.

5. Лосев И.П.. Практикум по химии высокомолекулярных соединений. М.: Госхимиздат, 1962. С. 174.

6. Валиева А.Ф. Кинетика и механизм окисления поливинилового спирта в водной среде: автореферат дис. ... канд. хим. наук. Уфа, 2007. 23 с.

7. Бойко В.В. Синтез поливинилового спирта в водно-спиртовых средах: дис. ... канд. хим. наук. М., 2004. 112 с.

8. Свойства поливинилового спирта, модифицированного N-винилпирролидоном, растворов, пленок и биорецепторных элементов на его основе /Л.Д.Асулян, В.А.Алферов, Д.В.Долгая и др.// Известия Тульского государственного университета. Химия. Вып. 2: в 2 ч. 2013. Ч.1. С. 231-240.

9. ПНД Ф 14.1:2:3:4.123-97 Количественный химический анализ вод. Методика выполнения измерений биохимической потребности в кислороде после n-дней инкубации (БПК<sub>полн.</sub>) в поверхностных пресных, подземных (грунтовых), питьевых, сточных и очищенных сточных водах.

10. BOD biosensor based on the yeast *Debaryomyces hansenii* immobilized in poly (vinylalcohol) modified by N-vinylpyrrolidone/V.A.Arlyapov, N.Yu.Yudina, L.D.Asulyan et al. // Enzyme and Microbial Technology. V.53. 2013. P. 257-262.

*Асулян Людмила Дмитриевна, канд.хим. наук, доц., [asuljan@rambler.ru](mailto:asuljan@rambler.ru), Россия, Тула, Тульский государственный университет,*

*Камаева Оксана Александровна, магистрант, [kamaieva.oksana@mail.ru](mailto:kamaieva.oksana@mail.ru), Россия, Тула, Тульский государственный университет,*

*Арляпов Вячеслав Алексеевич, канд.хим. наук, доц., [v.a.arlyapov@gmail.com](mailto:v.a.arlyapov@gmail.com), Россия, Тула, Тульский государственный университет,*

*Алферов Валерий Анатольевич, канд. хим. наук, проф., директор, [chem.@tsu.tula.ru](mailto:chem.@tsu.tula.ru), Россия, Тула, Тульский государственный университет*

## PREPARATION OF STABLE RECEPTOR ELEMENTS BASED ON A HYDROGEL OF POLY(VINYL ALCOHOL) TO FORM A BOD-BIOSENSOR

*L. D. Asulian, O. A. Kamaeva, V. A. Arlyapov, V. A. Alferov*

*Modification of polyvinyl alcohol by oxidative crosslinking of polymer chains with cerium-ammonium nitrate leads to the formation of the reticulate structure. The main characteristics of the receptor element based on crosslinked PVA and immobilized yeast *Debaryomyces hansenii* are received.*

Keywords: *polymer, polyvinyl alcohol (PVA), cerium-ammonium nitrate, immobilization, yeast Debaryamyceshansenii, bioreceptor element, a biosensor, an index of biochemical oxygen demand (BOD).*

*Asulyan Lyudmila Dmitrievna, candidate of chemical sciences, docent, [asuljan@rambler.ru](mailto:asuljan@rambler.ru), Russia, Tula, Tula State University,*

*Kamaeva Oksana Alexandrovna, graduate student, [kamaieva.oksana@mail.ru](mailto:kamaieva.oksana@mail.ru), Russia, Tula, Tula State University,*

*Arlyapov Vyacheslav Alekseevich, candidate of chemical sciences, docent, [v.a.arlyapov@gmail.com](mailto:v.a.arlyapov@gmail.com), Russia, Tula, Tula State University,*

*Alferov Valeriy Anatolievich, candidate of chemical sciences, professor, director, [chem.@tsu.tula.ru](mailto:chem.@tsu.tula.ru), Russia, Tula, Tula State University*

УДК 543.9 + 543.38

## АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИЙ БИОСЕНСОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЛЮКОЗЫ НА ОСНОВЕ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ, ИММОБИЛИЗОВАННОЙ В ЭЛЕКТРОПРОВОДЯЩИЙ ГЕЛЬ

С. С. Каманин, Л. С. Скворцова, Е. А. Коина, В. А. Арляпов

*Проведено закрепление медиатора электронного транспорта – нейтрального красного на печатном электроде путем ковалентного связывания с белковой матрицей с образованием электропроводящего гидрогеля. Установлена возможность сопряжения ферментативной реакции с электрохимическими процессами на электроде с помощью полученного гидрогеля. Проведена модификация графитового печатного электрода смесью глюкозооксидазы и электропроводящего гидрогеля, и определены основные характеристики биосенсора на его основе. Диапазон определяемых концентраций глюкозы для разработанного биосенсора составил 0,6–2,7 мМ, коэффициент чувствительности –  $250 \pm 10 \text{ мкА} \cdot \text{М}^{-1}$ , что выше, чем у аналогов на основе электрополимеризованного нейтрального красного. Апробация разработанного биосенсора на образцах вин показала, что он может использоваться для определения содержания глюкозы в продуктах биотехнологических производств.*

*Ключевые слова: Биосенсор, печатный электрод, электропроводящий гидрогель, нейтральный красный, иммобилизация медиатора, биотехнологическое производство, бычий сывороточный альбумин.*

### Введение

В настоящее время биосенсорные технологии являются одним из наиболее быстро развивающихся методов определения содержания органических веществ в смесях [1]. В области биосенсорики в последние десятилетия наблюдается тенденция миниатюризации датчиков, входящих в состав биосенсора, что ведет к снижению итоговой стоимости и повышению чувствительности аналитического оборудования. Немалый вклад в это внесла технология трафаретной печати [2], адаптация которой к нуждам биосенсорного анализа дала возможность печати биологического материала и вспомогательных компонентов на поверхности электрода прямо в процессе его производства, что позволило создавать недорогие одноразовые датчики для применения в медицинской практике и для контроля состояния окружающей среды. Наиболее простым и эффективным подходом при разработке биосенсоров на основе печатных электродов является применение в качестве распознающих элементов ферментов класса оксидаз. Например, на текущий момент существует множество лабораторных моделей печатных электродов на основе глюкозооксидазы для определения содержания глюкозы в среднем диапазоне 0,01 – 1 мМ [3–6]. Данные модели основаны на различных принципах регистрации аналитического сигнала биосенсора: как через измерение концентрации вспомогательного соединения (например,

пероксида водорода [7]), так и путем переноса электронов с помощью медиатора электронного транспорта [8], либо вообще без посредников [9]. Каждый из перечисленных принципов регистрации имеет свои преимущества и недостатки: прямой перенос электронов не требует участия в процессе дополнительных химических соединений, но накладывает ограничения на выбор биологического материала для создания биосенсора, так же, как и регистрация вспомогательного вещества, концентрация которого, к тому же, зависит не только от протекания целевых процессов на электроде, что вносит в определенных ситуациях ошибку в результаты измерения. Использование медиаторов электронного транспорта – наиболее универсальный принцип регистрации аналитического сигнала, так как он позволяет использовать в качестве биологического материала не только ферменты, но и целые клетки микроорганизмов [10], однако недостатком данного подхода является необходимость физического передвижения заряженной частицы медиатора между электродом и биологическим материалом. Учитывая, что заряженная форма медиатора, как правило, имеет повышенную растворимость в водной среде [11], данное движение приводит к десорбции медиатора с поверхности электрода, и, как следствие, к снижению аналитического сигнала биосенсора. Ограничение подвижности медиатора традиционными способами (электрополимеризация медиатора на поверхности электрода [12], или введение в структуру медиатора гидрофобных заместителей [13]) решает эту проблему, однако параллельно снижается доступность медиатора для активных центров фермента, так как медиатор электронного транспорта сконцентрирован у поверхности электрода. Другим подходом к данной задаче является использование в качестве медиатора электронного транспорта соединений достаточно большой молекулярной массы, чтобы их молекулы одновременно контактировали с поверхностью электрода и биологическим материалом, и таким образом, отпадала необходимость челночного передвижения медиатора в системе. Такие соединения можно получить путем модификации биологических полимеров электропроводящими соединениями [14]. Получаемые модифицированные полимеры могут быть использованы в качестве иммобилизующей матрицы для биологического материала, которая параллельно может выполнять функции медиатора электронного транспорта. В данном приложении представляется перспективным использование белков небольшой молекулярной массы, например, бычьего сывороточного альбумина (БСА), так как они обладают большим набором функциональных групп, по которым можно проводить реакции модификации. Кроме того, получаемый после сшивания молекул БСА глутаровым альдегидом гидрогель обеспечивает хорошую диффузию субстратов и метаболитов и формирует благоприятное для иммобилизованного биологического материала белковое окружение [15].

Поэтому целью данной работы является получение электропроводящего гидрогеля на основе бычьего сывороточного альбумина, ковалентно связанного с медиатором нейтральным красным, и использование его в качестве иммобилизующей матрицы при модификации графитового печатного электрода.

### Материалы и методы

Проведение биосенсорных измерений.

В качестве преобразователя использовали потенциостат EmStat (PalmSens, Нидерланды). Измерения проводились в кювете объемом 4 см<sup>3</sup> в натрий-калиевом фосфатном буферном растворе с pH=6,8 при перемешивании магнитной мешалкой (Экрос, Россия) со скоростью 200 об/мин. Ввод пробы осуществляли автоматическими микропипетками переменного объема (Ленпипет, Россия). Схема лабораторной установки представлена на Рис.1.

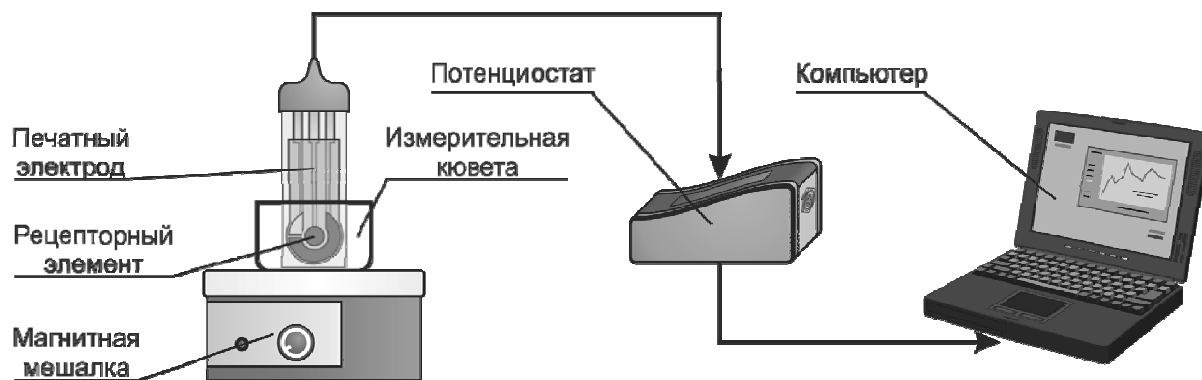


Рис.1. Общая схема биосенсорной установки

Выходные данные потенциостата обрабатывались на персональном компьютере с применением программы PStTrace 4.4. Аналитическим сигналом (ответом биосенсора) являлась амплитуда изменения силы тока при добавлении глюкозы в кювету с модифицированным печатным электродом. После каждого измерения осуществляли промывание электрода буферным раствором в течение 1-2 минут.

Модификация графитового печатного электрода.

Для приготовления рецепторного элемента в микропробирке смешивали 5 мкл раствора нейтрального красного (НК) (Sigma, США) с концентрацией 0,6 моль/л, 3,5 мг бычьего сывороточного альбумина (Sigma, США), 50 мкл натрий-калиевого фосфатного буферного раствора (pH=6,8, 33 ммоль/дм<sup>3</sup>). К полученному раствору добавляли 5 мкл раствора глюкозооксидазы (ГО) (Sigma, США) с концентрацией 100 мг/мл, перемешивали на центрифуге/миксере CM70M (ELMI, Латвия) и добавляли 7,5 мкл 25 % глутарового альдегида (ГА) (Panreac Química



S.L.U.). После повторного перемешивания 3 мкл полученной смеси быстро переносили на рабочий графитовый электрод диаметром 4 мм, находящийся в составе печатной трехэлектродной схемы (Русенс, Россия). Время полимеризации составляло от 30 до 60 минут. Модифицированный печатный электрод перед использованием трехкратно промывали в буферном растворе.

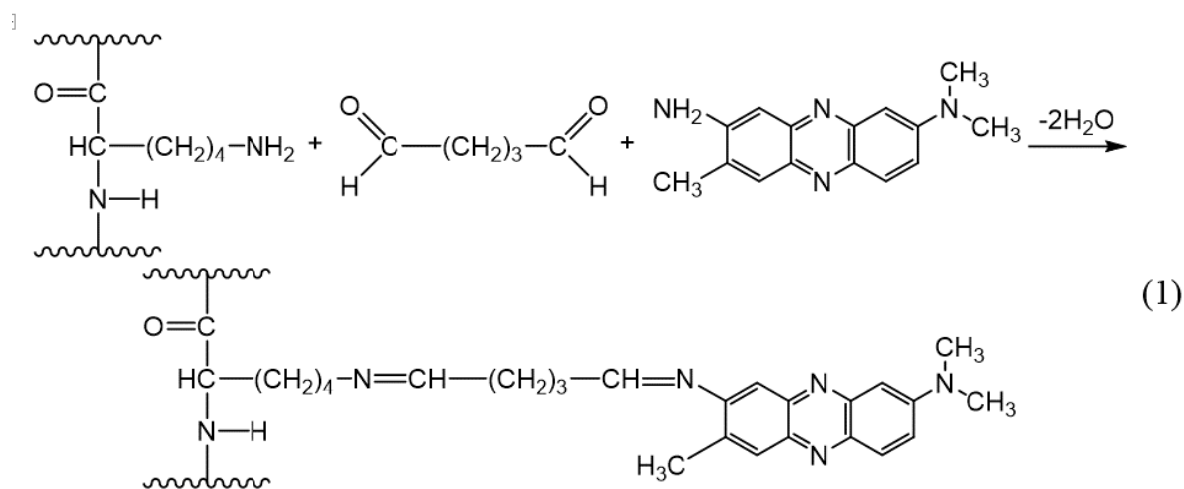
Определение содержания глюкозы энзиматическим методом со спектрофотометрическим детектированием.

Рабочий реактив для определения глюкозы энзиматическим методом готовили следующим образом: к 70 мл 0,25 Н ацетатного буферного раствора (рН=4,8) добавили 2 мг глюкозооксидазы (Sigma, США) и 1 мг кристаллической пероксидазы (Sigma, США). Смесь перемешивали, и приливали к ней 1 мл 1 % раствора о-толуидина (Sigma, США), затем доводили объем пробы до 100 мл ацетатным буферным раствором. К пробе, содержащей 1 мл исследуемого образца, приливали 3 мл рабочего реактива для определения глюкозы. Одновременно в аналогичные пробирки, содержавшие по 1 мл раствора глюкозы (с концентрацией 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 мкг/мл), и в контрольную пробирку, содержавшую 1 мл воды, также приливали 3 мл рабочего реактива. Регистрировали оптическую плотность раствора глюкозы соответствующей концентрации после добавления рабочего реактива на спектрофотометре Эксперт-003 (Эконикс-Эксперт, Россия) при длине волны 670 нм (кювета шириной 10 мм). На основании полученных величин оптической плотности для всех стандартных растворов глюкозы строили градуировочную зависимость, по которой рассчитывали количество глюкозы в исследуемой пробе.

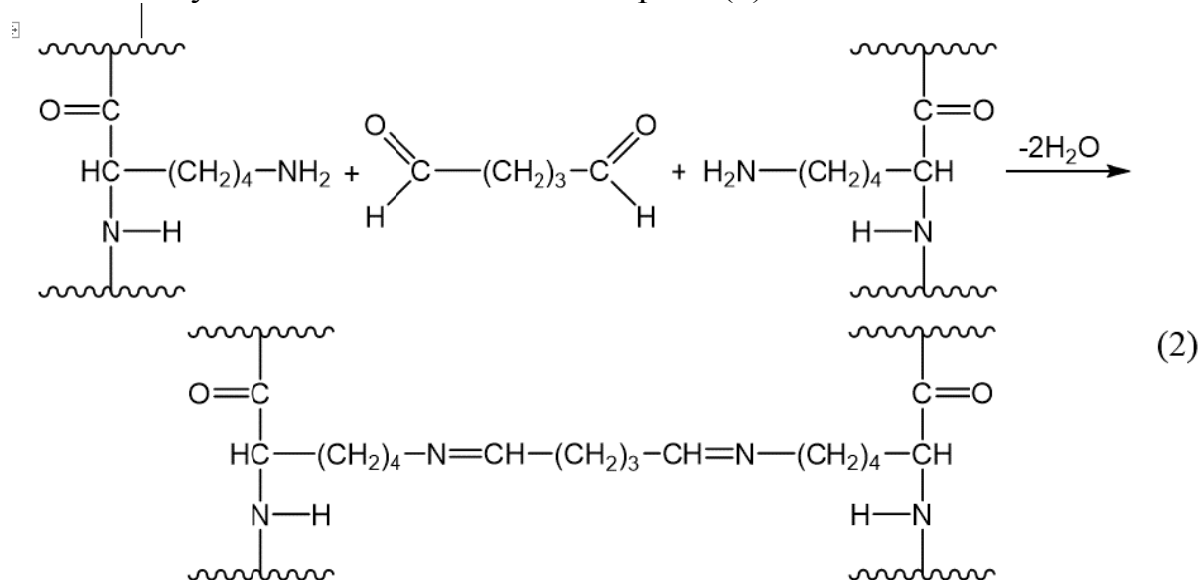
### **Результаты и обсуждение**

Получение электропроводящего полимера.

Образование электропроводящего полимера происходило непосредственно во время модификации печатного электрода. При смешивании растворов бычьего сывороточного альбумина, глутарового альдегида и медиатора нейтрального красного протекает реакция, в ходе которой нейтральный красный ковалентно связывается с молекулой БСА с помощью глутарового альдегида (1).



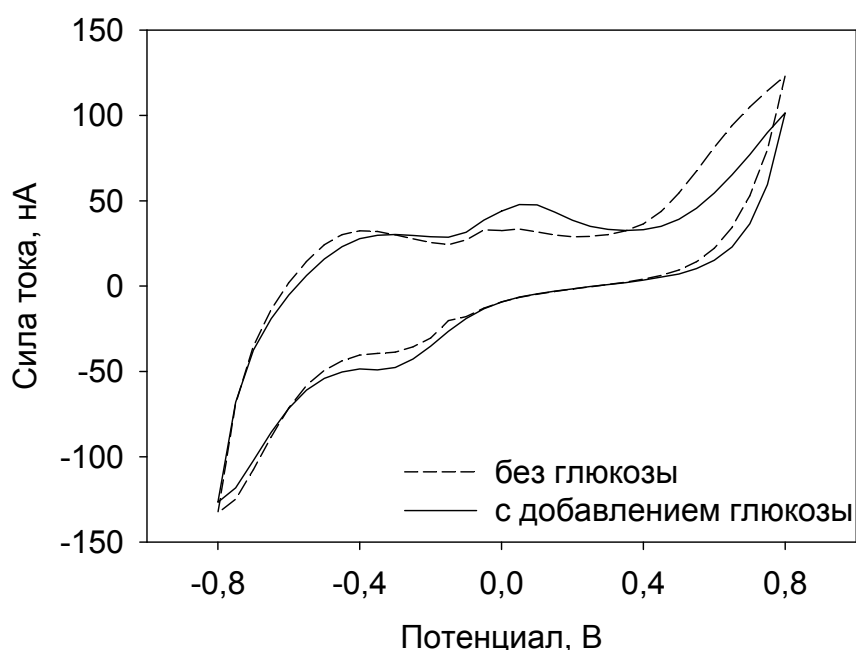
Однако помимо этого присутствующий в растворе глутаровый альдегид связывается с аминогруппами белковых молекул (как БСА, так и глюкозооксидазы), в результате чего образуется гидрогель, надежно иммобилизующий биологический материал (2).



После высыхания полученной структуры на поверхности электрода, его промывали натриево-калиевым фосфатным буферным раствором, для того, чтобы удалить остатки нейтрального красного, не вступившего во взаимодействие с глутаровым альдегидом. Далее электропроводность полученного полимера подтверждали методом циклической вольтамперометрии.

Определение рабочего потенциала.

На рис. 2 приведены циклические вольтамперограммы (условия) для печатного электрода, модифицированного глюкозооксидазой, иммобилизованной в электропроводящий гидрогель БСА, ковалентно связанного с НК.

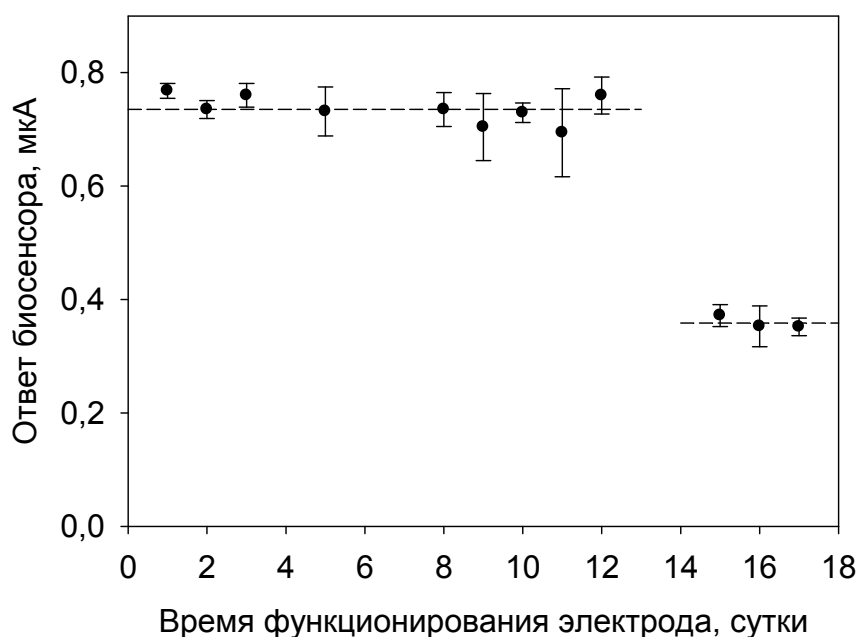


**Рис.2. Циклическая вольтамперограмма (ЦВА) биосенсора на основе электрода, модифицированного ГО в электропроводящем гидрогеле**

По сравнению с ЦВА чистого графитового электрода, у электрода, модифицированного ГО в электропроводящем гидрогеле, наблюдается отчетливый пик в анодной области при потенциале -300 мВ, который усиливается при добавлении в кювету с электродом раствора глюкозы. В рамках поиска оптимального рабочего потенциала электрода были получены ответы биосенсора на одну и ту же концентрацию глюкозы в кювете при потенциалах от -300 мВ до -450 мВ. Показано, что наибольший ответ биосенсора наблюдается при потенциале -400 мВ, поэтому дальнейшие измерения проводились при тех же условиях.

Характеристики биосенсора на основе глюкозооксидазы, иммобилизованной в электропроводящий гидрогель.

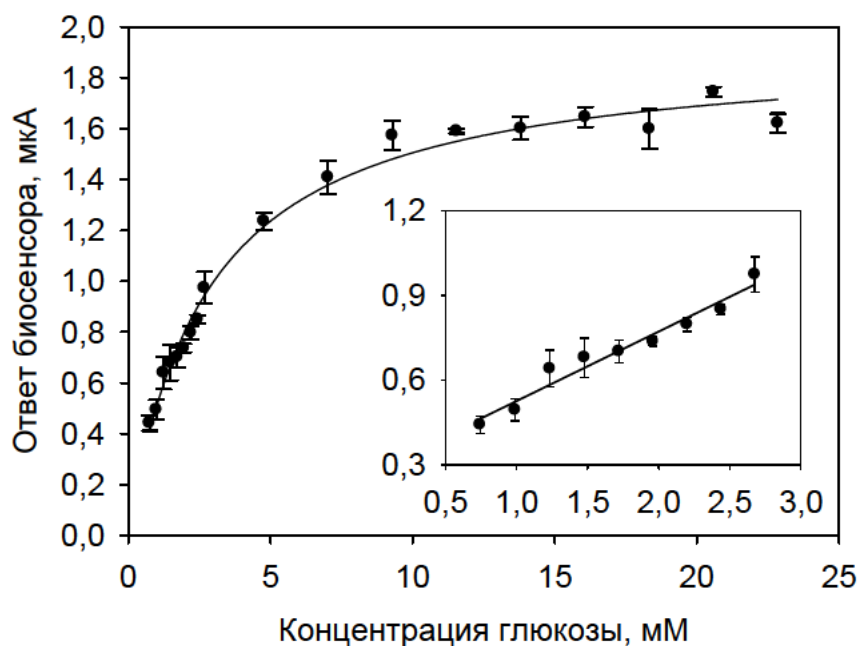
Для того, чтобы определить, насколько стабилен аналитический сигнал полученного модифицированного электрода, было проведено 10 параллельных измерений ответа биосенсора на добавление 70 мкл 0,1 М раствора глюкозы. Относительное стандартное отклонение при проведении серии из 10 измерений составило 1,6 %. Явного снижения ответа биосенсора в ходе измерений не наблюдалось, поэтому была исследована долговременная стабильность ответов биосенсора на основе модифицированного печатного электрода. Долговременную стабильность определяли путём ежедневного измерения ответа биосенсора на определенную концентрацию глюкозы в кювете.



**Рис. 3. Долговременная стабильность биосенсора на основе электрода, модифицированного ГО в проводящем гидрогеле**

На протяжении 12 суток ответ биосенсора сохранялся примерно на одном уровне (0,74 мкА), а на 15 сутки было отмечено падение ответа на 52 % от первоначального, что свидетельствует о невозможности продолжать анализ с использованием данного модифицированного электрода [16]. Таким образом, электрод, модифицированный ГО в проводящем гидрогеле, способен функционировать без потери чувствительности не менее 12 суток, что является хорошим результатом для печатных электродов, которые чаще всего позиционируются, как одноразовые [17].

Способность печатного электрода на основе ГО, иммобилизованной в электропроводящий гидрогель, функционировать длительное время без снижения уровня ответов биосенсора позволяет рассматривать его, как перспективное устройство для определения глюкозы в бродильных средах и пищевых продуктах. Чтобы получить количественную информацию о содержании глюкозы в пробах, необходимо построить градуировочную зависимость аналитического сигнала биосенсора от концентрации глюкозы. Данная зависимость представлена на рис. 4.



**Рис.4. Градуировочная зависимость ответа биосенсора на основе модифицированного печатного электрода от концентрации глюкозы в кювете**

Данная градуировочная зависимость имеет вид гиперболы и может быть аппроксимирована с помощью уравнения типа Михаэлиса-Ментен (3).

$$R = \frac{R_{\max} [S]}{K_M + [S]}, \quad (3)$$

где [S] – концентрация определяемого вещества;

$R_{\max}$  – максимальный ответ биосенсора, достигается при  $[S] \rightarrow \infty$ ;

$K_M$  – эффективная константа Михаэлиса численно равна концентрации определяемого вещества, при которой ответ биосенсора достигает половины своего максимального значения ( $R = \frac{1}{2}R_{\max}$ ).

Уравнение Михаэлиса-Мэнтен описывает полученную зависимость ответа сенсора от концентрации глюкозы с коэффициентом корреляции  $R=0,9908$ . Эффективная константа Михаэлиса для биосенсора на основе разработанного электрода составила  $K_M=2,7\pm0,6$  мМ, а максимальный ответ биосенсора равен  $1,92\pm0,02$  мкА. Для того чтобы определить чувствительность биосенсора на основе модифицированного печатного электрода, необходимо выделить начальный линейный участок градуировочной зависимости (рисунок 4). За его верхнюю границу принимали значение эффективной константы Михаэлиса. Коэффициент чувствительности определяли как тангенс угла наклона линейного участка градуировочной зависимости ответа биосенсора от концентрации глюкозы в кювете. Он составил  $250\pm10$  мкА·М<sup>-1</sup>. На основании данных о

коэффициенте чувствительности был проведен расчет предела обнаружения глюкозы и нижней границы определяемых концентраций глюкозы. Они составили, соответственно, 0,2 мМ и 0,6 мМ.

Важно отметить, что разработанный биосенсор превосходит аналоги на основе электрополимеризованного НК по значению коэффициента чувствительности, что может объясняться большей доступностью медиатора электронного транспорта для биологического материала, так как в случае иммобилизации медиатора ковалентной сшивкой НК равномерно распределен по всему объему модифицирующей смеси, в то время как электрополимеризация НК концентрирует его на поверхности электрода, что не позволяет ему передавать электроны от удаленных молекул фермента [12, 19].

Апробация биосенсора на основе разработанного модифицированного печатного электрода.

Апробацию разработанного биосенсора проводили на образцах вин. В качестве референтного метода определения содержания глюкозы был выбран энзиматический метод со спектрофотометрическим детектированием. Результаты анализа образцов приведены в таблице **Ошибка! Источник ссылки не найден.**

#### **Определение содержания глюкозы в образцах алкогольной продукции**

Метод определения	Концентрация глюкозы, мМ	
	Анализ с использованием разработанного биосенсора	Энзиматический метод
Вино п/сладкое «Dellisimo»	120±30	110 ± 30
Вино п/сухое «Miraflores»	94±8	90 ± 30
Вино п/сухое «Токай Фурминт»	68±6	77 ± 6

Статистический анализ полученных результатов с использованием модифицированного теста Стьюдента показал, что значения концентраций глюкозы, определяемые с помощью разработанного биосенсора и полученные референтным методом, незначимо различаются между собой.

#### **Выводы**

Таким образом, установлена возможность сопряжения ферментативной реакции с электрохимическими процессами на электроде

с помощью гидрогеля бычьего сывороточного альбумина, ковалентно связанного с медиатором - нейтральным красным. Для печатных электродов на основе глюкозооксидазы проводящего гидрогеля, получены основные характеристики. Коэффициент чувствительности для разработанного биосенсора составил  $250 \pm 10 \text{ мкА} \cdot \text{М}^{-1}$ , диапазон определяемых концентраций глюкозы – 0,6-2,7 мМ. Показано увеличение коэффициента чувствительности по сравнению с биосенсорами аналогичной конструкции на основе электрополимеризованного НК. Таким образом, новый способ закрепления медиатора на электроде является более эффективным, чем электрополимеризация, что позволяет расширить область применения водорастворимых медиаторов электронного транспорта при формировании биосенсоров. Апробация биосенсора на основе разработанного модифицированного печатного электрода на образцах вин показала, что значения концентраций глюкозы, полученные с использованием разработанного биосенсора и референтным методом, совпадают с учетом доверительных интервалов.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук, договор № 14.Z56.16.5425-МК и гранта РФФИ № 16-48-710959 р\_а.

### Список литературы

1. Turner A. P. F. Biosensors: sense and sensibility // Chem. Soc. Rev. 2013. V. 42. I. 8. P. 3184–3196.
2. Domínguez-Renedo O., Alonso-Lomillo M. A., Arcos-Martinez M. J. Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications // Talanta. 2007. V. 73. I. 2. P. 202–219.
3. Glucose biosensor based on the highly efficient immobilization of glucose oxidase on layer-by-layer films of silsesquioxane polyelectrolyte/C.G.de Jesus, D.Lima, V.dos Santos et al // Sensors Actuators B Chem. 2013. V. 186. P. 44–51.
4. A paper disk equipped with graphene/polyaniline/Au nanoparticles/glucose oxidase biocomposite modified screen-printed electrode: Toward whole blood glucose determination / F.-Y.Kong, S.-X.Gu, W.-W.Li et al // Biosens. Bioelectron. 2014. V. 56. P. 77–82.
5. A novel glucose biosensor constructed by glucose oxidase immobilized with methylene blue intercalated layered lanthanum niobic acid nanocomposite / X.Zhang, L.Shen, M.Wang et al // Mater. Lett. 2014. V. 135. P. 39–42.
6. Screen-Printed Electrodes Modified with Glucose Oxidase Immobilized in Hybrid Organosilicon Sol-Gel Matrix / S.S.Kamanin,

V.A.Arlyarov, T.V. Rogova et al // Appl. Biochem. Microbiol. 2014. V. 50. I. 9. P. 835–841.

7. Karyakin A. A., Gitelmacher O. V, Karyakina E. E. Prussian Blue-Based First-Generation Biosensor. A Sensitive Amperometric Electrode for Glucose // Anal. Chem. American Chemical Society. 1995. V. 67. I. 14. P. 2419–2423.

8. Amperometric detection of glucose and ethanol in beverages using flow cell and immobilised on screen-printed carbon electrode PQQ-dependent glucose or alcohol dehydrogenases / J.Razumiene, V.Gurevičiene, V.Laurinavičius et al // Sensors Actuators B Chem. 2001. V. 78. I. 1-3. P. 243–248.

9. Direct electrochemistry of glucose oxidase on screen-printed electrodes through one-step enzyme immobilization process with silica sol-gel/polyvinyl alcohol hybrid film / S.Zuo, Y.Teng, H.Yuan et al // Sensors Actuators B Chem. 2008. V. 133. I. 2. P. 555–560.

10. Interaction of Ferrocene Mediators with *Gluconobacter oxydans* Immobilized Whole Cells and Membrane Fractions in Oxidation of Ethanol / E.Y.Indzhgiya, O.N.Ponamoreva, V.A.Alferov et al // Electroanalysis. 2012. V. 24. I. 4. P. 924–930.

11. Diggle J. W., Parker A. J. Solvation of ions-XX. The ferrocene-ferricinium couple and its role in the estimation of free energies of transfer of single ions // Electrochim. Acta. 1973. V. 18. I. 12. P. 975–979.

12. Characterisation of poly(neutral red) modified carbon film electrodes; application as a redox mediator for biosensors / R.Pauliukaite, M.Ghica, M.Barsan et al // J. Solid State Electrochem. Springer-Verlag. 2007. V. 11. I. 7. P. 899–908.

13. Efficiency of bioelectrocatalytic oxidation of ethanol by whole cells and membrane fractions of *Gluconobacter oxydans* bacteria in the presence of mediators of ferrocene series / O.N.Ponamoreva, E.Y.Indzhgiya, V.A.Alferov et al // Russ. J. Electrochem. 2011. V. 46. I. 12. P. 1408–1413.

14. Chitosan–ferrocene film as a platform for flow injection analysis applications of glucose oxidase and *Gluconobacter oxydans* biosensors / Ö.Yılmaz, D.O.Demirkol, S.Gülcemal et al // Colloids Surfaces B Biointerfaces. 2012. V. 100. P. 62–68.

15. Brena B.M., Batista-Viera F. Immobilization of enzymes // Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells. 2nd ed. / ed. M. G.J. Totowa (N.J.): Humana press, 2006. V. XIV. P. 15–30.

16. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification / D.R.Thevenot, K.Toth, R.A.Durst et al // Biosens. Bioelectron. 2001. V. 16. I. 1-2. P. 121–131.

17. Hill B. Accu-Chek® Advantage: Electrochemistry for Diabetes Management // Curr. Sep. 2005. V. 21. I. 2. P. 45–48.



18. Design and application of a flow cell for carbon-film based electrochemical enzyme biosensors / M.M.Barsan, J.Klinčar, M.Batič et al // *Talanta*. 2007. V. 71. I. 5. P. 1893–1900.

19. Ghica M. E., Brett C. M. A. Development of Novel Glucose and Pyruvate Biosensors at Poly(Neutral Red) Modified Carbon Film Electrodes. Application to Natural Samples // *Electroanalysis*. 2006. V. 18. I. 8. P. 748–756.

*Каманин Станислав Сергеевич, канд. хим. наук., ассистент, s.s.kamanin@gmail.com, Россия, Тула, Тульский государственный университет,*

*Скворцова Любовь Сергеевна, магистрант, lsskvortsova@gmail.com, Россия, Тула, Тульский государственный университет,*

*Коина Екатерина Андреевна, студент, katrina-nmsk@list.ru, Россия, Тула, Тульский государственный университет,*

*Арляпов Вячеслав Алексеевич, канд. хим. наук, доц., v.a.arlyapov@gmail.com, Россия, Тула, Тульский государственный университет*

## AMPEROMETRIC GLUCOSE BIOSENSOR BASED ON GLUCOSE OXIDASE IMMOBILIZED INTO THE CONDUCTIVE HYDROGEL

*S. S. Kamanin, L. S. Skvortsova, E. A. Koina, V. A. Arlyapov*

*Abstract. Immobilization of electron transport mediator (neutral red) on screen-printed electrode by covalent binding to the protein matrix was carried out to form electrically conductive hydrogel. The possibility of enzymatic reaction conjugation with electrode electrochemical processes using the hydrogel was found. Modification of screen-printed graphite electrode with a mixture of glucose oxidase and an electrically conductive hydrogel was carried out. The main characteristics of the biosensor based on it were obtained. The detection range of glucose was 0,6–2,7 mM, sensitivity coefficient -  $250 \pm 10 \text{ mA} \cdot \text{M}^{-1}$ , which is higher than that of counterparts based on electropolymerized neutral red. Testing of the developed biosensor on wine samples showed that it can be used to determine the glucose content in the products of biotechnological industries.*

*Keywords: Biosensor, screen-printed electrode, conductive hydrogel, neutral red, mediator immobilization, biotechnological production, bovine serum albumin*

*Kamanin Stanislav Sergeevich, candidate of chemical sciences, teaching assistant, s.s.kamanin@gmail.com, Russia, Tula, Tula State University,*

*Skvortsova Lyubov Sergeevna, graduate student, lsskvortsova@gmail.com, Russia, Tula, Tula State University,*

*Koina Ekaterina Andreevna, student, katrina-nmsk@list.ru, Russia, Tula, Tula State University,*

*Arlyapov Vyacheslav Alekseevich, candidate of chemical sciences, assistant professor, v.a.arlyapov@gmail.com, Russia, Tula, Tula State University*

## БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

УДК 579.262/574.38

### БАКТЕРИАЛЬНЫЕ СООБЩЕСТВА ФИОЛЕТОВЫХ ПЯТЕН, ОБНАРУЖЕННЫХ В КРУГОВОМ МАВЗОЛЕЕ РИМСКОГО НЕКРОПОЛЯ ГОРОДА КАРМОНА (ИСПАНИЯ)

Е. В. Акатова, С. Сайс-Хименас, В. Хурадо

*Гробницы некрополя были вырыты в пористой скалистой породе в I-Шв. н.э., а в результате раскопок - открыты воздействию окружающей среды. Это способствует колонизации поверхностей стен различными микроорганизмами, что приводит к их биодegradации. В гробнице Круговой Мавзолей такая биодegradация, вызванная развитием микроорганизмов, видна наиболее ярко. Пятна различного цвета, включая фиолетовые, покрывают поверхности стен. Целью этого исследования является молекулярно-биологический анализ микробного сообщества, развивающегося в фиолетовых пятнах в гробнице Круговой Мавзолей.*

*Ключевые слова: биодegradация памятников культуры, сообщество микроорганизмов, молекулярные методы.*

#### 1. Введение

Некрополь города Кармона (Испания) считают одним из наиболее крупных римских погребальных мест за пределами Рима, а на Пиренейском полуострове это один из наиболее хорошо сохранившихся римских некрополей 1-2 века н.э. (рис. 1). Некрополь включает около 600 подземных гробниц, хотя в настоящее время все усилия направлены на сохранение и реставрацию отрытых гробниц, чем на раскопки новых. Гробницы выкопаны в скалистой породе, отнесенной к известняковым биокластовым песчаникам [12], довольно пористой породе подверженной выветриванию и процессам микрокарстификации [4].

Круговой Мавзолей это коллективная гробница, датированная I веком н.э. Стены и потолок были оштукатурены, однако до наших дней штукатурка сохранилась не на всех поверхностях (рис. 2). В связи с высокой пористостью оголенной породы на стены гробницы легко адсорбируются микроорганизмы, дающие начало различным сообществам. В основном в гробнице наблюдается обильное развитие фототрофных сообществ, визуально заметных из-за образования зеленых пятен. Однако, только в этой гробнице были обнаружены фиолетовые пятна. Целью этого исследования является анализ микробного сообщества, развивающегося в фиолетовых пятнах, молекулярно-биологическими методами и оценка их влияние на гробницу.

Молекулярно-биологические методы, основанные на ДНК, позволяют обнаружить микроорганизмы *in situ* без предварительного выращивания их на специфических культуральных средах [8, 22]. Таким

образом, молекулярные методы представляют сильный инструмент для обнаружения микроорганизмов в сложных природных образцах, а также для идентификации культивируемых микроорганизмов. Кроме того, использование для изучения сложных природных образцов молекулярных методов, основанных на РНК, дает возможность обнаружить и проанализировать часть микроорганизмов активно вовлеченных в развитие микробных колоний. Комбинация этих двух методов поможет лучше оценить потенциальную роль и воздействие специфических микроорганизмов на процессы биodeградации в гробницах некрополя города Кармона (Севилья, Испания).



**Рис. 1. Географическое расположение города Кармона (а); круговой мавзолей, внутренняя камера (б)**

## 2. Материалы и методы

### 2.1 Отбор образцов

Образцы отбирали с фиолетовых пятен, обнаруженных на стенах гробницы Кругового Мавзолея, используя стерильный шпатель, в стерильные микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл. Некоторые образцы были отобраны в несколько пробирок, так чтобы в дальнейшем использовать весь образец для извлечения ДНК или РНК. В случае образцов, отобранных для извлечения РНК, использовались стерильные микроцентрифужные пробирки с 1 мл раствора ARNlater® (Ambion, Foster City, Калифорния, США), который предохраняет РНК от деградации РНКазами.

### 2.2 Выделение нуклеиновых кислот

Выделение геномной ДНК организмов, присутствующих в отобранных образцах, осуществляли, используя коммерческий kit “NucleoSpin Food DNA” (Macherey-Nagel, Дюрен, Германия) и следуя протоколу, рекомендованному изготовителем. Выделенную ДНК хранили при 4°C.

Выделение РНК из организмов, присутствующих в исследуемых образцах, осуществляли, используя kit “Total RNAqueous-4PCR” (Ambion, Фостер Сити, США) и следуя рекомендованному изготовителем протоколу. Этот протокол включал обработку образцов ДНКазой Iи синтез ДНК комплементарной РНК (кДНК) в течение часа при 55°C, используя обратную транскриптазу ThermoScript (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США) и 16SpРНК ген-специфический праймер 518R (5' - АТТАСССГCGGCTGCTGG). Чтобы убедиться в том, что выделенная РНК свободна от ДНК, использовали контроль прошедший все этапы, но без добавления обратной транскриптазы.

### 2.3 Амплификация ДНК

Амплификацию фрагментов 16SpРНК бактерий проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), используя амплификатор GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer). Для амплификации в качестве матрицы использовали кДНК или ДНК выделенную непосредственно из образцов и соответствующую пару праймеров: для кДНК - 518R и 616F (5' - АГА GTT TGA ТУМ TGG CTC AG)[7], для ДНК - 616F и 907R (5' - ССС CGT САА TTC АТТ TGA GTT Т). Для амплификации фрагментов 16SpРНК актиномицетов использовали специфические праймеры StrepF (5' - АСГТGTGCAGСССАAGАСА) и StrepB (5' - АСАAGСССТGGAAACGGGGT). В качестве ДНК полимеразы использовали ExTaq (Takara, Сига, Япония). Программа для амплификации включала следующие этапы: 2 мин при 95 °С; затем 35 циклов 15 с при 95 °С, 15 с при 55 °С и 2 мин при 72 °С; 10 мин при 72 °С.

### 2.4 Электрофорез в полиакриламидном геле с градиентом денатурации

Молекулярный профиль бактериальных сообществ анализируемых образцов был получен с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с градиентом денатурации (ДГГЭ) следуя методу описанному ранее [7, 18]. Для получения молекулярных профилей сообществ амплифицированные фрагменты 16SpРНК генов подвергались второй амплификации с праймерами 518Rи 341F-GC (5'-ССТАССGGGAGGCAGCAGc богатой GCобластью на 5'-конце)[7, 18]. Условия амплификации были такими же, как описано выше за исключением времени роста цепи, которая, в данном случае, составляла 30 с.

Для сравнения длины миграции отдельных полос в различных гелях использовали маркеры миграции, состоящие из смеси ПЦР продуктов,

полученных с теми же праймерами и ДНК, выделенной из *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Paenibacillus* sp. и *Streptomyces caviscabies*.

#### 2.5 Клонирование и идентификация микроорганизмов

Смесь амплифицированных фрагментов 16SpРНК генов были очищены с помощью коммерческого kit «Jetquick PCR purification Spin Kit» (Genomed, Лоне, Германия) и клонированы, используя коммерческий kit «ТОРОТА® Cloning Kit for Sequencing» (Invitrogen, Карлсбад, США), согласно рекомендациям изготовителей. Отбор клонов, полученных генотек, проводил с помощью метода описанного Гонзалес [7]. Клонированные последовательности из отобранных клонов были секвенированы, используя капиллярный секвенатор модели ABI 3700 и kit «ABI PRISM® dye terminator sequencing core kit» (Applied Biosystems, Foster City, США), в Центре Биологических Исследований (CIB, CSIC, Мадрид, Испания).

#### 2.6 Анализ секвенированных последовательностей

Нуклеотидные последовательности, полученные после секвенирования, обрабатывали вручную с помощью программы Chromas v1.45 ([www.technelysium.com.au/chromas.html](http://www.technelysium.com.au/chromas.html)). Последовательности гомологичные полученным находили, используя алгоритм Бласт (BLAST) [3] доступный в NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Анализ последовательностей включал группировку в Оперативные Таксономические Единицы (OTE), используя как критерий объединения сходство между последовательностями более чем 95 %, другими словами группировали на уровне рода [17, 19].

#### 2.7 Статистическая обработка результатов

Метод разрежения [11] применяли для оценки разнообразия групп микроорганизмов в изучаемых образцах. В результате этого метода можно получить кривую разрежения, для построения которой использовали программу «ANALYTIC RAREFACTION 1.3» ([www.uga.edu/~strata/software/index.html](http://www.uga.edu/~strata/software/index.html)) [13]. Для сравнения молекулярных профилей сообществ строили дендрограммы, используя алгоритм UPGMA [6, 21] и программу «PAST 1.89» (<http://folk.uio.no/ohammer/past/>). Сходство между ДГГЭ профилями оценивали, используя коэффициент Дайса.

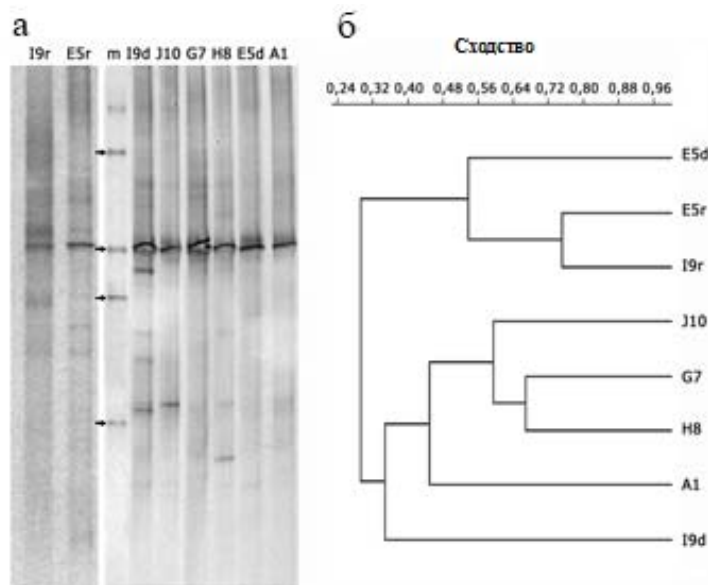
### 3. Результаты

Изучение бактериальных сообществ в отобранных образцах фиолетовых пятен проводили посредством получения молекулярных профилей методом ДГГЭ, а также использовали результаты анализа 16S рДНК и рРНК генотек (только для двух образцов E5, отобранного со стены при входе в гробницу, и I9, отобранного со стены напротив входа в гробницу). Полученные для двух образцов последовательности 16SpРНК

генов были внесены в ДНК базы данных (FN297874 - FN297916, FN298134 - FN298138).

3.1. Сравнение молекулярных профилей бактериальных сообществ из образцов фиолетовых пятен, отобранных со стен Кругового Мавзолея

На рис.2 представлены молекулярные профили анализируемых сообществ в отобранных образцах (рис. 2, а) и сравнение этих профилей, представленное в виде UPGMA дендрограммы (рис. 2, б). В результате сравнения молекулярных профилей сообществ исследуемых образцов выявили достаточно высокое сходство между ними. Также, в молекулярных профилях можно видеть одну интенсивно окрашенную полосу, которая мигрирует на одном уровне во всех образцах. Профили, полученные для двух исследуемых образцов в результате РНК анализа (E5r и I9r) группируются в один кластер. Кроме того, сообщества, полученные для образца E5 (E5r и E5d) очень похожи. Однако, молекулярный профиль сообщества образца I9, полученный при ДНК анализе (I9d), сильно отличается от молекулярных профилей других анализируемых сообществ, что говорит о высоком разнообразии присутствующих в этом образце организмов.



**Рис. 2. Молекулярные профили сообществ фиолетовых пятен. ДНК анализ всех образцов A1, E5 (E5d), G7, H8, I9 (I9d), J10, а РНК анализ только для образцов I9 и E5 (I9r и E5r) m – маркер миграции (а); сравнение молекулярных профилей сообществ (А). Анализ был основан на присутствии или отсутствии полосы на определенной линии в ДГГЭ геле. Шкала указывает коэффициент сходства Дайса (б)**

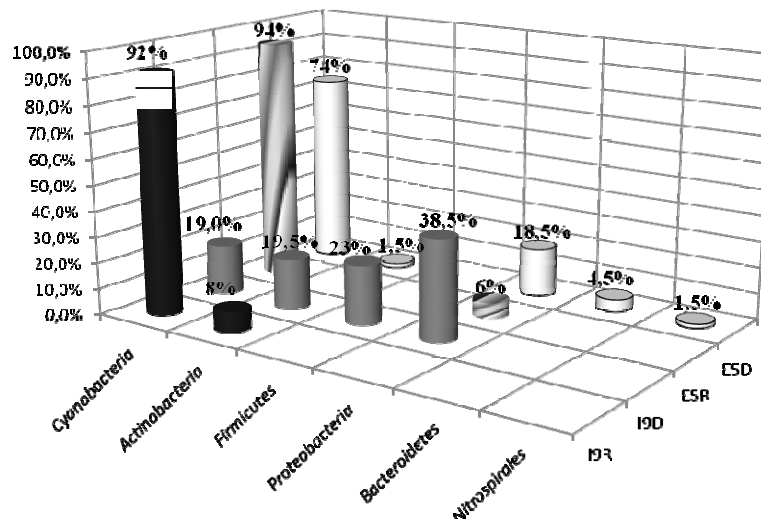
### 3.2. Анализ генотек

Сообщества анализируемых образцов показали достаточно высокое микробное разнообразие (рис. 3). В образце E5 большинство последовательностей (74 %) были отнесены к представителям типа

Суанобактерия(*Brasilonema*). Следующая группа микроорганизмов, которой соответствовало 18,5 % последовательностей этого образца, принадлежала к типу *Proteobacteria*, хотя соответствие между этими последовательностями и рибосомальными генами ближайших культивируемых гомологов этого типа было не достаточно высоким (не более 95 %). Представители *Alphaproteobacteria* (*Nordella*, *Rhodomicrobium* и *Blastochloris*) чаще всего обнаруживали среди культивируемых гомологов протеобактерий. Также среди гомологов идентифицировали представителей класса *Gamma*proteobacteria и некоторые не классифицированные протеобактерии. Кроме этих групп также были обнаружены: *Bacteroidetes*, *Nitrospirales* и *Actinobacteria*.

Причем только последовательности, отнесенные к актинобактериям, показали достаточно высокое сходство с 16S рРНК генами представителей *Actinobacteria* (*Pseudonocardia*) - 96 %, тогда как другие последовательности показывали 91 % – 92 % сходства с гомологичными рибосомальными генами культивируемых бактерий.

В результате анализа ДНК генотеки образца I9 большинство последовательностей были гомологичны 16S рРНК последовательностям бактерий типа *Proteobacteria* (рис. 3). Среди найденных гомологов протеобактерий были выделены три класса *Alphaproteobacteria* (*Aliihoeflea*), *Betaproteobacteria* (*Herbaspirillum*) и *Gamma*proteobacteria в практически равном соотношении. Следующей группой обнаруженной среди гомологов был тип *Firmicutes* (23 % полученных последовательностей), а точнее представители рода *Staphylococcus*. Так же в этом образце были обнаружены бактериям типов *Cyanobacteria* (*Brasilonema*) и *Actinobacteria* (*Rubrobacter* и *Pseudonocardia*).



**Рис. 3. Соотношение различных бактериальных групп, обнаруженных при ДНК (I9d и E5d) и РНК (I9r и E5r) анализе в образцах, отобранных из фиолетовых пятен со стен кругового мавзолея**

РНК генотеки были не так разнообразны как ДНК генотеки. В анализируемых образцах метаболически активные члены сообществ были представлены двумя типами бактерий. В образце Е5 большинство последовательностей (94 %) были гомологичны 16S рРНК последовательностям представителей типа *Cyanobacteria* (*Brasilonema*). Оставшиеся последовательности (6 %) были отнесены к бактериям типа *Proteobacteria* порядка *Rhizobiales* (*Alphaproteobacteria*), хотя процент сходства анализируемых последовательностей и найденных в базе данных последовательностей 16S рРНК культивированных представителей этого порядка были низкими (93 %).

В образце I9 бактериям типа *Cyanobacteria* также соответствовала большая часть полученных в ходе РНК анализа последовательностей (92 %). В то время как оставшиеся 8 % последовательностей отнесли к представителям типа *Actinobacteria* (*Rubrobacter*).

### 3.2. Анализ 16S рРНК последовательностей

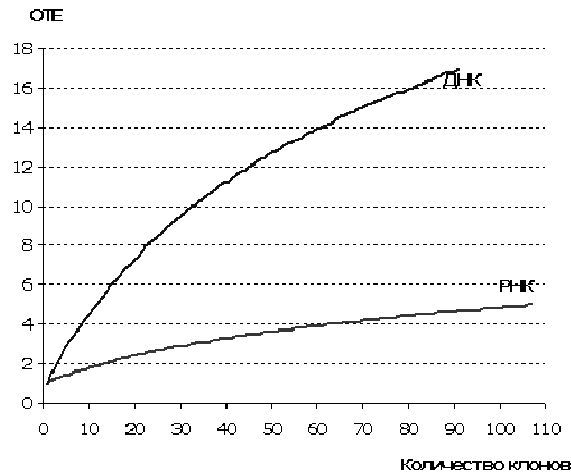
Последовательности ДНК и РНК генотек, полученных из двух образцов фиолетовых пятен (Е5 и I9) были сгруппированы в операционные таксономические единицы (ОТЕ). Объединение в ОТЕ позволит проанализировать полученные последовательности и с большей вероятностью отнести к представителям той или иной таксономической группе, так как сравнение с гомологичными последовательностями, найденными в базе данных, не всегда давал положительный результат. Многие последовательности показывали высокое сходство с последовательностями, выделенными из некультивированных организмов, в связи с чем, определить таксономическую принадлежность организмов, входящих в состав анализируемых сообществ представлялось затруднительным.

Однако только одна ОТЕ объединяла последовательности, полученные в результате ДНК и РНК анализов обоих образцов, а наиболее близким гомологом этой группы являлся представитель рода *Brasilonema* (*Cyanobacteria*). Кроме того, в образце I9 обнаружили одну ОТЕ, которая содержала последовательности ДНК и РНК генотек, чьи ближайшие гомологичные последовательности относились к бактериям рода *Rubrobacter* (*Actinobacteria*).

В общей сложности, самые разнообразные бактериальные группы исследуемых образцов относились к типу *Proteobacteria* (12 ОТЕ) и классу *Alphaproteobacteria* (7 ОТЕ). *Cyanobacteria* и *Actinobacteria* были представлены тремя ОТЕ каждый, в то время *Firmicutes*, *Nitrospirae* и *Bacteroidetes* образовывали по одному ОТЕ. Было также обнаружено, что ДНК генотеки образцов содержала больше разнообразных групп по сравнению с РНК генотекой.



Для оценки разнообразия микробного сообщества, полученного для исследуемых образцов, были построены кривые разрежения (рис. 4), где отражается зависимость числа полученных ОТЕ от числа клонов (последовательностей) отобранных для анализа.



**Рис. 4. Кривая разрежения. Представленные кривые разрежения построены по результатам, полученным для ДНК и РНК генов**

На рис.4 видно, что кривая, построенная с использованием последовательностей РНК генов, приближается к горизонтальной асимптоте. Это говорит о том, что при анализе разнообразия основных групп метаболически активных микроорганизмов в этих образцах было отобрано достаточное количество клонов, и что увеличение числа отбираемых клонов не дало бы больше дополнительной информации о группах присутствующих в анализируемых сообществах. Тем не менее, достижение горизонтальной асимптоты не произошло при изучении бактерий, присутствующих в образцах (результаты анализа ДНК генов), кривая разрежения которых продолжает расти с увеличением числа отобранных клонов. Это позволяет предположить наличие большего разнообразия микроорганизмов, чем удалось установить в этом исследовании.

#### 4. Обсуждение

На стенах только одной гробницы (Круговой Мавзолей) некрополя города Кармона наблюдали пятна фиолетового цвета, проявление которых предположительно связано с развитием микроорганизмов. Микробные сообщества нескольких образцов с этих пятен изучали в данной работе.

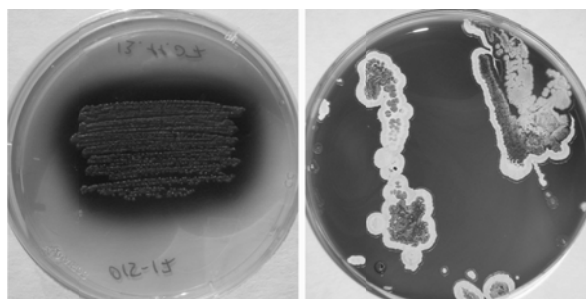
Наличие фиолетовых пятен на стенах гробниц не является новым фактом. Агаросси [1] исследовал микробные сообщества фиолетовых пятен на стенах «Гробницы охоты и рыбной ловли» (TombadellaCacciaedellaPesca) и «Гробницы быков»(TombadeiTorì), в

Тарквинии (Италия). В результате он заключил, что фиолетовый цвет свидетельствует о развитии бактерий рода *Streptomyces*, экстрагирующих фиолетовый пигмент.

В случае исследования фиолетовых пятен обнаруженных в Круговом Мавзолее, представленного в этой работе, также было обнаружено присутствие актиномицетов в сообществах образцов отобранных с этих пятен. Актиномицеты были представлены бактериями родов *Rubrobacter* и *Streptomyces*. Однако, последние были обнаружены только с помощью специфичных для *Actinobacteria* праймеров, что свидетельствует о сравнительно небольшом количестве этих бактерий в составе сообщества. Кроме того, только в образце I9 актиномицеты являются метаболически активными членами сообщества.

Род *Streptomyces* содержит большое количество видов экстрагирующих фиолетовый пигмент [10, 14, 23]. Так уже в 1908 году Р. Миллер обнаружил, что бактерии *Streptomyces coelicolor* на крахмалсодержащей среде выделял темно-синий водорастворимый пигмент, который был назван "амилоцианином" [14].

Ранее из Кругового Мавзолея удалось выделить штамм *Streptomyces* sp., который выделял фиолетовый пигмент в процессе роста (рис. 5). Таким образом, цвет пятен может быть обусловлен развитием данной бактерии, хотя, в момент отбора проб количество представителей рода *Streptomyces* в изучаемых сообществах было низким.



**Рис. 5. Образование фиолетового пигмента при росте *Streptomyces* sp. C48 на богатой агаризованной среде TSA**

Присутствие актинобактерий ранее неоднократно отмечалось при изучении сообществ, развивающихся на стенах подземных памятников, где они составляли значительную часть этих сообществ [9, 15]. Актинобактерии - это гетеротрофные микроорганизмы и их рост зависит от органического материала, поступающего с поверхности в подземную гробницу. Таким образом, низкое содержание бактерий рода *Streptomyces* может говорить о неблагоприятных для их развития условиях, которые предшествовали отбору проб.

При изучении микробных сообществ молекулярно-биологическими методами, получили, что молекулярные профили сообществ всех

изучаемых образцов довольно схожи (около 50 % сходства), за исключением одного образца (I9), а при сравнении метаболически активных сообществ двух образцов выявили еще больше сходства (около 76 %). Таким образом, метод ДГГЭ позволил быстро сравнить сообщества по содержанию доминирующих членов.

По результатам ДНК и РНК анализа образцов выявили, что большая часть их микробных сообществ составляли цианобактерии, главным образом отнесенных к роду *Brasilonema*, исключая образец I9, где по результатам ДНК анализа протеобактерии составляли большую часть сообщества, а цианобактериям соответствовало лишь 19 % (рис. 3). Образец I9 отобрали с дальней стены, где освещенность была ниже по сравнению со стеной около входа в гробницу (образец E5), возможно это повлияло на содержание цианобактерий в данном образце.

В образце E5 вторую по величине группу метаболически активных микроорганизмов составляли бактерии, отнесенные к типу *Proteobacteria* (*Alphaproteobacteria*, *Rhizobiales*), этот тип также составлял вторую по величине группу, обнаруженную при ДНК анализе этого образца. Другие группы, обнаруженные при ДНК анализе (*Actinobacteria*, *Bacteroidetes* и *Nitrospirales*), не были обнаружены среди метаболически активных микроорганизмов. С другой стороны, в образце I9 две большие группы микроорганизмов (которым соответствовало около 60 % последовательностей), обнаруженные в результате ДНК анализа (*Proteobacteria* и *Firmicutes*) не были выявлены среди метаболически активного сообщества, в отличие от представителей двух других групп (*Actinobacteria* и *Cyanobacteria*).

Таким образом, полученные результаты указывают, что метаболически активные микробные сообщества могут быть представлены микроорганизмами отличными от тех, что составляют доминирующие члены общего сообщества в изучаемом месте. Однако, бактерии, которые в момент изучения не проявляли метаболической активности, но присутствующие в сообществах могут проявить метаболическую активность, если наступят подходящие для развития условия.

Среди актинобактерий, обнаруженных обоими методами, наиболее часто встречались представители рода *Rubrobacter*. Бактерии рода *Rubrobacter* – это умеренные галлофилы образующие розовые колонии на питательных средах [16]. Таким образом, обильное развитие данных микроорганизмов может привести к образованию розовых пятен на стенах гробниц, как произошло в часовне замка Герберштейн (Австрия) [20].

Результатами данного исследования подтверждается также теория ассоциации цианобактерий и актинобактерий в сообществах, которые развиваются в подземных условиях. Альбертано и Урзи [2] описали связь между *Streptomyces* и нитчатых цианобактериями (*Scytonema* и *Leptolyngbya*) в катакомбах Рима. В случае сообщества фиолетовых пятен

в Круговом Мавзолее обнаружена связь между цианобактериями рода *Brasilonema* и актинобактериями рода *Rubrobacter* и различных видов *Streptomyces*.

*Brasilonema bromeliae* является недавно описанным видом с эпифитным обитанием (на листьях бромелиевых – семейство Bromeliaceae) в тропическом и субтропическом климате Бразилии [5]. Было бы интересно культивировать и описать штамм присутствующий в некрополе города Кармона, чья последовательность 16S рРНК гена показывает высокое сходство (94 % и 98 %) с рибосомальным геном цианобактерии описанного вида *Brasilonema bromeliae*. Однако на данный момент культивировать этот штамм не удалось.

Данное исследование представляет важный этап в понимании микробиологии одной из гробниц некрополя города Кармона (Испания), представляя информацию по микроорганизмам в этом историческом и культурном месте. Два молекулярно-биологических метода основанных на ДНК и РНК анализе сообществ были применены для сравнения исследуемых сообществ. Определили состав доминирующих членов сообщества фиолетовых пятен, обнаруженных на стенах гробницы Круговой Мавзолей, и установили метаболически активные микроорганизмы (на момент отбора проб) в составе этих сообществ. Эти результаты могут служить дополнительной информацией для разработки более эффективных мер по сохранению этого памятника в будущем.

Работа была выполнена в рамках европейского проекта Marie Curie Action (Early Stage Training) “Advanced Research Training on the Conservation of Cultural Heritage” MEST-CT2004-513915 и проекта RNM 2318, и “Programa de Investigación en Tecnologías para la Valoración y Conservación del Patrimonio” (CONSOLIDER CSD2007-00058).

### **Список литературы**

1. Agarossi G. Biodeterioramento in ambienti ipogei: esperienze e considerazioni /ed. by Guidobaldi F. Studi e ricerche sulla conservazione delle Opere d'Arte dedicati alla memoria di Marcello Paribeni. Roma C.N.R. 1994. P. 1-18.
2. Albertano P., Urzi C. Structural interactions among epilithic cyanobacteria and heterotrophic microorganisms in Roman hypogeal // Microbial ecology. 1999. Vol. 38. P. 244-252.
3. Basic local alignment search tool/S.F. Altschul, W. Gish, W. Miller et al // Journal of Molecular Biology. 1990. Vol. 215. P. 403-410.

4. The deterioration of Circular Mausoleum, Roman Necropolis of Carmona, Spain / J.C.Canaveras, A.Fernandez-Cortes, J.Elez et al // Science of the Total Environment. 2015. Vol. 518–519. P. 65–77.
5. The cyanobacterial genus *Brasilonema*, gen. nov., a molecular and phenotypic evaluation / M.F.Fiore, C.L.Sant'Anna, M.T.de Paiva Azevedo et al // Journal of Phycology. 2007. Vol. 43. P. 789-798.
6. Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns / N.Fromin, J.Hamelin, S.Tarnawski et al // Environmental microbiology. 2002. Vol. 4. P. 634–643.
7. An efficient strategy for screening large cloned libraries of amplified 16S rDNA sequences from complex environmental communities / J.M.Gonzalez, A.Ortiz-Martinez, M.A.Gonzalez-delValle et al // Journal of Microbiological Methods. 2003. Vol. 55. P. 459-463.
8. Gonzalez J. M., Saiz-Jimenez C. Microbial diversity in biodeteriorated monuments as studied by denaturing gradient gel electrophoresis // Journal of separation science. 2004. Vol. 27. P.174-180.
9. Groth I., Saiz-Jimenez C. Actinomycetes in hypogean environments // Geomicrobiology Journal. 1999. Vol. 16. P. 1-18.
10. Habermehl G. and Christ B.G.Amyloeyanin, the blue pigment of *Streptomyces coelicolor*// Naturwissenschaften.1977. Vol. 64P. 97-98.
11. Heck Jr. K. L., van Belle G., Simberloff D. Explicit calculation of the rarefaction diversity measurement and the determination of sufficient sample size // Ecology. 1975. Vol. 56. P. 1459-1461.
12. Estudio de los procesos de alteración de los materiales pétreos y estucos de la Necrópolis de Carmona / M.Hoyos, J.M. Cañaveras, S.Sánchez et al // Informe para la Consejería de Cultura de la Junta de Andalucía.1994. 92 p.
13. Hurlbert S. H. The nonconcept of species diversity: a critique and alternative parameters // Ecology. 1971. Vol. 52. P. 577-586.
14. Kutzner H.J. and Waksman S. A. *Streptomyces coelicolor* müller and *Streptomyces violaceoruber* waksman and curtis, two distinctly different organisms / //Journal of Bakteriology. 1959. Vol. 78. P. 528-538.
15. L.Laiz,B.Hermosin, B.Caballero, C.Saiz-Jimenez. Facultatively oligotrophic bacteria in Roman mural paintings // eds. by Galan E. and Zezza F. Protection and conservation of the cultural heritage of the Mediterranean cities. Lisse: Balkema, 2002. P. 173-178.
16. Isolation of five Rubrobacter strains from biodeteriorated monuments / L.Laiz, A.Z.Miller, V.Jurado et al // Naturwissenschaften. 2009. Vol. 96. P. 71–79.
17. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis / W.Ludwig, O.Strunk, S.Klugbauer et al // Electrophoresis. 1998. Vol. 19. P. 554-568.
18. Muyzer G., de Waal E. C., Uitterlinden A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of

polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA // Applied and Environmental Microbiology. 1993. № 59. P. 695-700.

19. Rossello-Mora R., Amann R. The species concept for prokaryotes // FEMS microbiology reviews. 2001. Vol. 25. P. 39-67.

20. *Rubrobacter*-related bacteria associated with rosy discolouration of masonry and lime wall paintings / C.Schabereiter-Gurter, G.Picar, D.Vybiral et al // Archives of Microbiology. 2001. Vol. 176. P. 347–354.

21. Silva E. P., Russo C. A. M. Techniques and statistical data analysis in molecular population genetics // Hydrobiologia. 2000. Vol. 420. P. 119–135.

22. Ward D. M., Weller R., Bateson M. M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community // Nature. 1990. Vol. 345. P. 63-65.

23. A kind of potential food additive produced by *Streptomyces coelicolor*: Characteristics of blue pigment and identification of a novel compound, k-actinorhodin / H.Zhang, J.Zhan, S.U.Keman et al // Food Chemistry. 2006. Vol. 95. P. 186–192.

*Екатерина Валентиновна Акатова, канд. хим. наук., ассистент, [katiaakatova@gmail.com](mailto:katiaakatova@gmail.com), Россия, Тула, Тульский государственный университет,*

*Сезарео Сайс-Хименас, д-р биологии, заведующий лабораторий, [saiz@irnase.csic.es](mailto:saiz@irnase.csic.es), Испания, Севилья, Институт натуральных ресурсов и агробиологии,*

*Валме Хурадо, д-р биологии, исследователь, [vjurado@irnase.csic.es](mailto:vjurado@irnase.csic.es) Испания, Севилья, Институт натуральных ресурсов и агробиологии*

## BACTERIAL COMMUNITIES OF THE PURPLE SPOTS DETECTED IN THE CIRCULAR MAUSOLEUM OF THE ROMAN NECROPOLIS OF CARMONA (SPAIN)

*E. V. Akatova, C. Saiz-Jimenez, V. Jurado*

*Abstract. The tombs of the necropolis were excavated in porous rock and open to the environment, they are exposed to colonization by various microorganisms, which lead to biodegradation of walls, ceilings and mural paintings, which decorated the tombs. Such biodegradation caused by the development of microorganisms most clearly visible in the tomb of Circular Mausoleum. Spots of different colors, including purple, heavily coated surface of the tomb walls. The purpose of this study is to analyze the microbial community developing in the purple spots by molecular methods and to assess their impact on biodegradation processes at the tomb.*

*Keywords: biodegradation of cultural monuments, microbial communities, molecular methods.*

*Ekaterina Valentinovna Akatova, candidate of chemical sciences, assistant professor, [katiaakatova@gmail.com](mailto:katiaakatova@gmail.com), Russia, Tula, Tula State University,*

*Cezareo Saiz Jimenes, doctor of biology, research professor, department of Geocology and Biogeochemistry, [saiz@irnase.csic.es](mailto:saiz@irnase.csic.es), Spain. Seville, Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, CSIC,*

*Valme Jurado Lobo, doctor of biology,  
researcher, [yjurado@irnase.csic.es](mailto:yjurado@irnase.csic.es) Spain. Seville, Instituto de Recursos Naturales y  
Agrobiología, CSIC*

УДК595.7:574.9

## **ЗООГЕОГРАФИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭНТОМОФАУНЫ В РАЙОНАХ ЛИНИЙ ЭЛЕКТРОПЕРЕДАЧ В ТУЛЬСКОЙ ОБЛАСТИ**

А.А.Короткова, М.С.Дубинин

*В зонах действия ЛЭП выявлено 238 видов насекомых (Insecta), относящихся к 7 отрядам и 67 семействам. Изучение зоогеографической структуры позволило выделить 8 типов ареалов в соответствии с зоогеографическим районированием. Преобладает транспалеарктический тип (37,8 %). На втором месте голарктический тип (15,5 %). Зоогеографическая структура энтомокомплекса в зоне действия ЛЭП соответствует таковой экосистемам естественного и искусственного происхождения.*

*Ключевые слова: насекомые, энтомофауна, зоогеографическая структура, электромагнитные поля, электромагнитное излучение, ЛЭП.*

### **Введение**

Насекомые с древних пор успешно применялись в зоогеографических целях. А.П. Семенов-Тянь-Шанский создал детально разработанную схему зоогеографических подразделений Палеарктической области (1936), предложил гипотезу о происхождении альпийских фаун (1937). А.В. Мартынов предоставил систему зоогеографического районирования для пресноводных и амфибиотических насекомых. Среди зарубежных ученых можно выделить француза Рене Жаннеля, с его многочисленными трудами по систематике и фаунистике, и австрийца Рихарда Хольдхауза, который предложил единственный в мировой литературе подробный обзор географического распространения насекомых в планетарном масштабе [1].

Зоогеографическая структура является одним из значимых показателей состояния биосистемы. Анализ зоогеографической структуры энтомокомплекса выявляет степень устойчивости каждого вида насекомых в отдельности и всего сообщества в целом к изменению среды в условиях различного градиента техногенного загрязнения[2].

Целью данного исследования явилось изучение зоогеографической структуры энтомофауны в районах линий электропередач в Тульской области.

### **Материалы и методы**

Материалом для исследования послужили 4511 экземпляров насекомых, обитающих в районе линий электропередач. Отбор насекомых проводился с мая по сентябрь 2014 и 2015 годов. В качестве методов использовались маршрутное кошение, почвенные ловушки Барбера и ловушки Мерике.

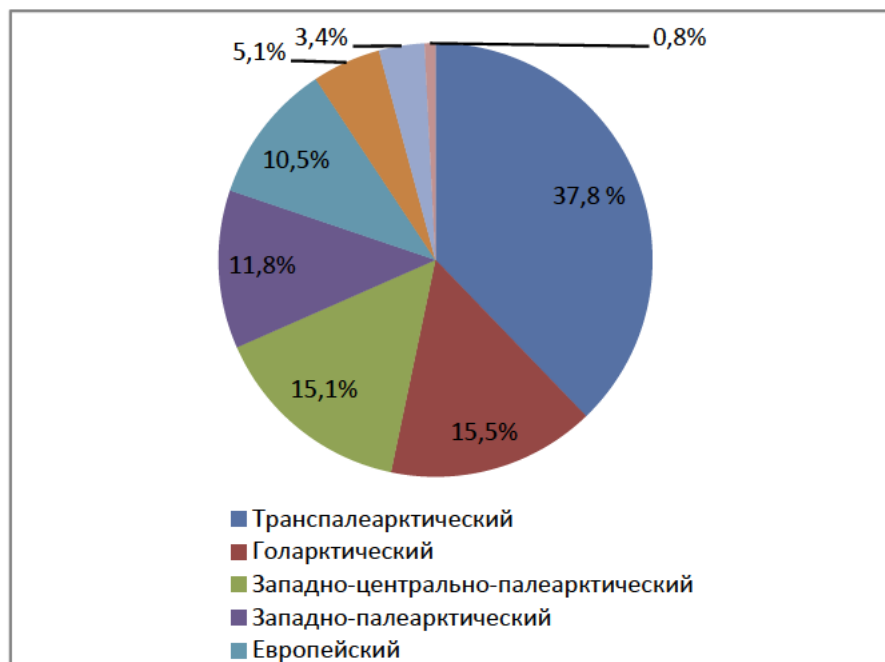


Исследования проводились на территории двух ЛЭП. В зонах влияния линий электропередач "Смоленской АЭС" (750 кВ) определены 3 модельных участка в радиусе от 18 до 50 км от Тулы. Выбранные места исследования схожи по физико-географическим и экологическим характеристикам. Данные ЛЭП проходят по луговым экосистемам. Хорошо выражен травяной ярус, присутствуют редкие кустарники, преобладают серые лесные почвы. Второй модельный участок выделен на территории линий электропередач "Щекинской РЭС" с напряжением 220 кВ. Данное место исследования находится в 5 км от Тулы. ЛЭП проходят через лесную экосистему в зоне серых лесных почв. Фитоценоз представляет собой трехъярусный комплекс деревьев, кустарников и трав.

### Обсуждение результатов

В результате исследования, в зонах действия ЛЭП выявлено 238 видов насекомых, относящихся к 7 отрядам и 67 семействам. Изучение зоогеографических характеристик видов позволило выделить 8 типов ареалов в соответствии с зоогеографическим районированием.

В районах линий электропередач преобладают виды насекомых с транспалеарктическим типом ареала (рисунок). В эту группу входят 90 видов (37,8 %), относящихся к 6 отрядам и 35 семействам. Наибольший вклад вносит отряд *Coleoptera*, в составе которого насчитывается 56 (62,2 %) транспалеарктических видов из 16 семейств, самым многочисленным из которых является *Carabidae* – 15 видов (26,8 %). В составе семейства *Staphylinidae* выделено 9 видов (16,1 %) с транспалеарктическим типом ареала; в составе семейства *Chrysomelidae* таких видов – 8 (14,3 %).



**Зоогеографический преферendum насекомых**

К голарктическому типу ареала относится 37 видов насекомых (15,5 %), представленные 6 отрядами и 18 семействами. Большая часть относится к отряду *Coleoptera*, в составе которого 27 (72,9 %) таких видов из 9 семейств. Самым многочисленным из них является *Carabidae* – 5 видов (18,5 %). По 4 голарктических вида (14,8 %) отмечено в семействах *Silphidae* и *Chrysomelidae*. В составе *Hymenoptera* выделено 4 вида (10,8 %) с голарктическим типом ареала, относящихся к 3 семействам. В отряде *Hemiptera* отмечено 3 голарктических вида. Кроме этого по 1 представителю (2,7 %) с голарктическим типом ареала имеют отряд *Homoptera* (сем. *Cicadellidae*), *Lepidoptera* (сем. *Noctuidae*) и *Diptera* (сем. *Calliphoridae*).

Видов с западно-центрально-палеарктическим типом ареала несколько меньше – 36 (15,1 %). Это представители 18 семейств, подавляющее большинство которых из отряда *Coleoptera* (29 видов (80,5 %) из 11 семейств). Наиболее многочисленным из них является *Carabidae* – 7 западно-центрально-палеарктических видов (24,1 %). Семейства *Curculionidae* и *Chrysomelidae* представлены 5 видами (17,2 %) этого типа ареала. В составе *Hemiptera* выделены 5 видов (13,8 %) с западно-центрально-палеарктическим типом (13,8 %), которые относятся к 5 семействам. По 1 представителю (2,7 %) этого типа ареала выделено в отрядах *Lepidoptera* и *Diptera*.

В районах линий электропередач также отмечено 28 видов (11,8 %) насекомых с западно-палеарктическим типом ареала, относящихся к 3 отрядам и 6 семействам. Почти все найденные нами виды относятся к отряду *Coleoptera*, в составе которого насчитывается 26 видов (92,8 %) из 4 семейств. Большую часть также составляют представители семейства *Carabidae*, которое насчитывает 23 вида (88,5 %) выше названного ареала. По 1 западно-палеарктическому виду (3,8 %) выделено в семействах *Scarabaeidae*, *Dermestidae* и *Chrysomelidae*. Также по 1 представителю (3,6 %) с западно-палеарктическим типом ареала отмечено в составе отрядов *Hymenoptera* и *Diptera*.

Насекомых североазиатским типом ареала насчитывается 25 видов (10,5 %), относящихся к 4 отрядам и 17 семействам. Наибольший вклад вносит отряд *Coleoptera*, в чей состав входит 19 европейских видов (76,0 %) из 11 семейств. Из них отметим *Carabidae*, в котором отмечено 4 таких вида (21,1 %). В составе семейств *Silphidae* и *Curculionidae* выделено по 3 вида (15,8 %) насекомых с европейским типом ареала. Также в составе отрядов *Homoptera*, *Hemiptera* и *Hymenoptera* отмечено по 2 вида, относящегося к европейскому типу ареала.

Трансевроазиатский тип ареала также представлен в районах линий электропередач. Таких видов насчитывается 12 (5,1 %), относящихся к 3 отрядам и 9 семействам. Отряд *Coleoptera* представлен 7 трансевроазиатскими видами (58,3 %) из 6 семейств. В составе

*Diptera* выделено 4 (33,3 %) вида с трансевроазиатским типом ареала, относящимся к 2 семействам. Отряд *Hymenoptera* представлен 1 видом данного типа ареала.

В составе космополитного типа ареала насчитано 8 видов (3,4 %) насекомых, которые относятся к 4 отрядам и 7 семействам. *Hymenoptera* представлен 4 видами (50,0 %) космополитами из 3 семейств. В составе отряда *Coleoptera* отмечено 2 вида (25,0 %) с космополитным типом ареала, которые относятся к 2 семействам *Dermestidae* и *Elateridae*. Отряды *Lepidoptera* и *Diptera* представлены по 1 виду (12,5 %) насекомому космополиту.

Также стоит отметить, что в результате исследований нами найдено 2 вида (0,8 %), соответствующих юго-западно-палеарктическому типу ареала, представленным по 1 представителю из семейств *Carabidae* и *Curculionidae*.

### Заключение

Таким образом, в районах линий электропередач Тульской области преобладают виды насекомых с транспалеарктическим и голарктическим типами ареала. В целом можно отметить, что соотношение типов ареалов в изученных экосистемах полностью соответствует таковому во всех наземных экосистемах Тульской области, как естественного, так и искусственного происхождения.

### Список литературы

1. Крыжановский О.Л. Состав и распространение энтомофаун земного шара. М.: Т-во научных изданий КМК, 2002. 237 с.
2. Банников А.Г. Основы экологии и охрана окружающей среды. 4-ое изд. перераб. и доп. М.: Колос, 1999. 304 с.

*Короткова Анна Альбертовна, д-р биол. наук, проф., зав. кафедрой, korotkova123@mail.ru, Россия, Тула, Тульский государственный педагогический университет им. Л.Н. Толстого,*

*Дубинин Максим Сергеевич, аспирант, dubinin91@ya.ru, Россия, Тула, Тульский государственный педагогический университет им. Л. Н. Толстого*

### ZOOGEOGRAPHICAL CHARACTERISTIC ENTOMOFAUNA IN THE AREAS OF TRANSMISSION LINES IN TULA REGION

*A.A.Korotkova, M.S.Dubinin*

*Abstract. In the zones of power lines identified 238 species of insects (Insecta), belonging to 7 orders and 67 families. The study of zoogeographical structure allowed to allocate 8 types of areas according to zoogeographic zoning. Mostly Trans-type (37.8 %). In sec-*

*ond place Holarctic type (15.5 %). Zoogeographical structure of entomocomplexes power line coverage area corresponds to that of ecosystems, natural and artificial origin.*

*Keywords: insects, entomofauna, zoogeographical structure, electromagnetic fields, electromagnetic radiation, electric power lines.*

*Korotkova Anna Albertovna, doctor of biological science, professor, manager of katedra, [korotkova123@mail.ru](mailto:korotkova123@mail.ru), Russia, Tula, Tula State Pedagogical University after Leo Tolstoy,*

*Dubinin Maxim Sergeevich, post-graduate student, [dubinin91@ya.ru](mailto:dubinin91@ya.ru), Russia, Tula, Tula State Pedagogical University after Leo Tolstoy*

УДК 581.1

## ВЛИЯНИЕ ИОНОВ ЦИНКА И НИКЕЛЯ НА ВОДОБЕСПЕЧЕННОСТЬ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА И ОБРАЗОВАНИЕ ПИГМЕНТОВ ФОТОСИНТЕЗА

В.В. Минайчев, Т.Е. Сиголаева, Д.А. Кузнецов, В.В. Иванищев

*Изучено влияние широкого диапазона концентраций ионов никеля, цинка, а также их совместного присутствия в среде на водобеспеченность и образование фотосинтетических пигментов проростков гороха на раннем этапе онтогенеза. Показано, что ионы никеля оказывали влияние на водный баланс только при самых высоких концентрациях соли в эксперименте. В то же время они, по-видимому, не требуются для синтеза хлорофилла и каротиноидов. Присутствие ионов никеля в среде в концентрации более 0,01 мМ приводило к уменьшению соотношения хлорофиллов а/в. В то же время присутствие ионов цинка в среде в концентрации выше, чем 0,001 мМ является необходимым для стимуляции синтеза пигментов фотосинтеза в проростках гороха. Более высокие концентрации (кроме 10 мМ) ионов металла не оказывали негативного влияния на этот процесс. Представленные результаты позволяют говорить о том, что присутствие ионов цинка в среде не защищает проростки гороха от негативного действия, оказываемого на синтез пигментов возрастающими концентрациями ионов никеля.*

*Ключевые слова: горох (Pisum sativum L.), проростки, цинк, никель, фотосинтетические пигменты*

### Введение

Исследованию влияния физиологически значимых металлов на разные процессы в растениях посвящено множество работ, в т.ч. обзоров [12, 20, 24]. При этом обычно не затрагивается вопрос о состоянии водного баланса, как основы для нормального протекания физиологических процессов и биохимических реакций. В первую очередь водный баланс обеспечивает становление ключевого для растений процесса – фотосинтеза. Кроме описания положительного влияния низких концентраций и негативного влияния высоких концентраций на физиологические и биохимические процессы выявлены механизмы такого действия. Напр., токсическое влияние высоких концентраций цинка выражалось в ингибировании работы обеих фотосистем и снижении фотосинтеза в целом. При этом молекулярный уровень ингибирования работы фотосинтетического аппарата может быть обусловлен как заменой ионов магния ионами цинка в фотосистеме II [19], так и снижением количества хлорофиллов *a* и *b*, и их соотношения [24].

В присутствии ионов никеля в среде наблюдали аналогичные изменения, связанные с активацией процессов при низких концентрациях, и ингибированием – при высоких [3, 21]. При этом также менялась эффективность работы обеих фотосистем. Пролонгированное присутствие

никеля вызывало изменение структуры хлоропластов, уменьшение содержания пигментов и активности ферментов, обеспечивающих ассимиляцию углекислого газа. В то же время показано, что ионы никеля защищали хлорофилл от разрушения при выдерживании растений в темноте [21]. А содержание антоцианинов в цветках петунии даже возросло при инкубации в растворе сульфата никеля [15].

Однако необходимость присутствия таких тяжелых металлов для становления фотосинтетического аппарата остается практически не изученной. Поэтому представляется важным исследовать влияние цинка и никеля на накопление основных пигментов на ранних этапах онтогенеза растений.

### Материалы и методы исследования

В качестве объекта исследования использовали проростки гороха (*Pisum sativum* L.) сорта Фараон, которые выращивали в виде водной культуры, используя дистиллированную воду в контрольном варианте и с добавлением солей металлов ZnSO<sub>4</sub>, NiSO<sub>4</sub> (0,001-10 мМ), либо смеси растворов солей ZnSO<sub>4</sub> и NiSO<sub>4</sub> (1:1) в опытных пробах [4]. Анализ проводили на 2-х недельных проростках. Массу определяли весовым методом, сухую массу – после высушивания при 105 °С в течение 3 часов. Содержание воды рассчитывали по формуле [6]:

$$RWC = (FW - DW) \times 100 / FW,$$

где RWC = относительное содержание воды, FW – сырая масса, DW – сухая масса.

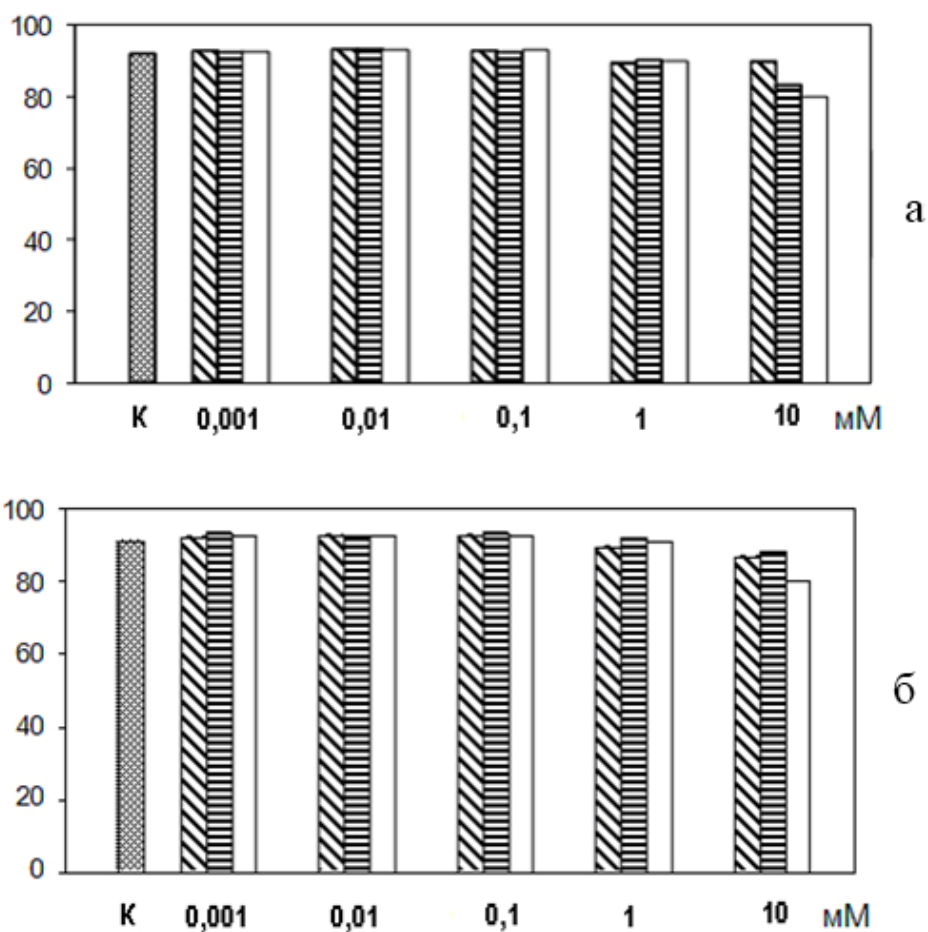
Содержание фотосинтетических пигментов в листьях (хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов) определяли спектрофотометрически в этанольных экстрактах [11].

Эксперименты проведены в трех биологических повторностях. Результаты экспериментов обработаны статистически с использованием программы Excel. На рисунках приведены средние величины. Уровень значимости результатов соответствует P=0,05.

### Результаты исследований

Определение относительного содержания воды в корнях показало, что присутствие солей никеля и цинка в низких концентрациях в среде вызывало незначительное повышение показателя в сравнении с контролем во всех случаях (рис. 1).

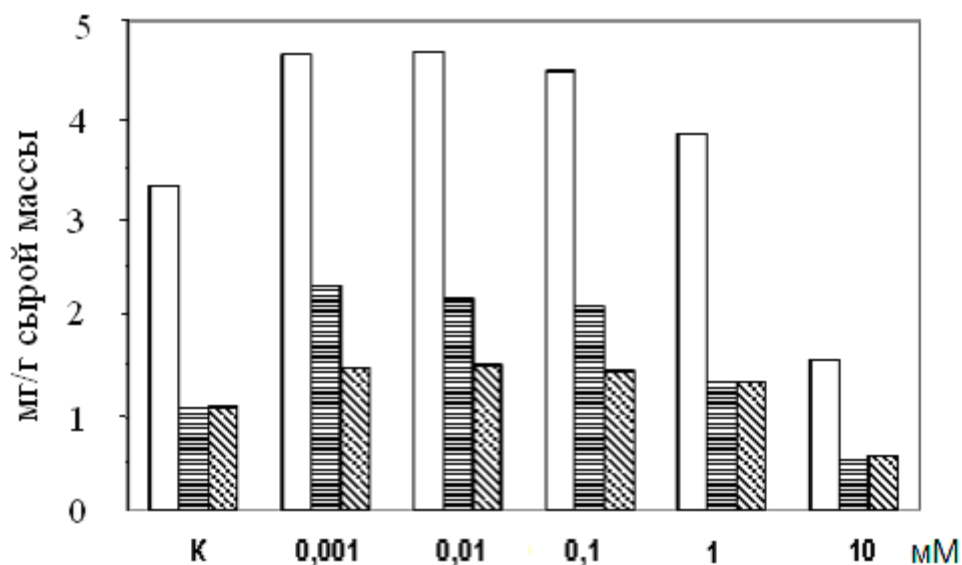
Небольшое (5-10 %) снижение содержания воды наблюдали только при двух наиболее высоких концентрациях металлов. Даже самая высокая концентрация никеля в среде мало меняла эту характеристику, в то время как присутствие ионов цинка и, особенно, обоих металлов (даже в половинной концентрации – 5 мМ) снижали показатель более чем на 10 %.



**Рис. 1. Относительное содержание воды в корнях (а) и побегах (б) гороха в зависимости от концентрации ионов никеля (наклонная штриховка), цинка (горизонтальная штриховка), цинк+никель (белые столбики) в среде. К – контроль**

Определение относительного содержания воды в побегах (при общей положительной динамике) показало, что для цинка эта характеристика снижалась только при его наибольшей концентрации в среде (рис. 1). Для никеля снижение наблюдали при 1 мМ, в то время как совместное присутствие ионов обоих металлов наиболее сильно уменьшало данный показатель при их максимальной суммарной концентрации.

Исследование показало, что возрастание концентрации сульфата цинка приводило к увеличению содержания хлорофилла *a* с последующим снижением до примерно 50 % от контрольной величины, которое наблюдали при 10 мМ. Аналогичную картину наблюдали также для хлорофилла *b* и каротиноидов (рис. 2).



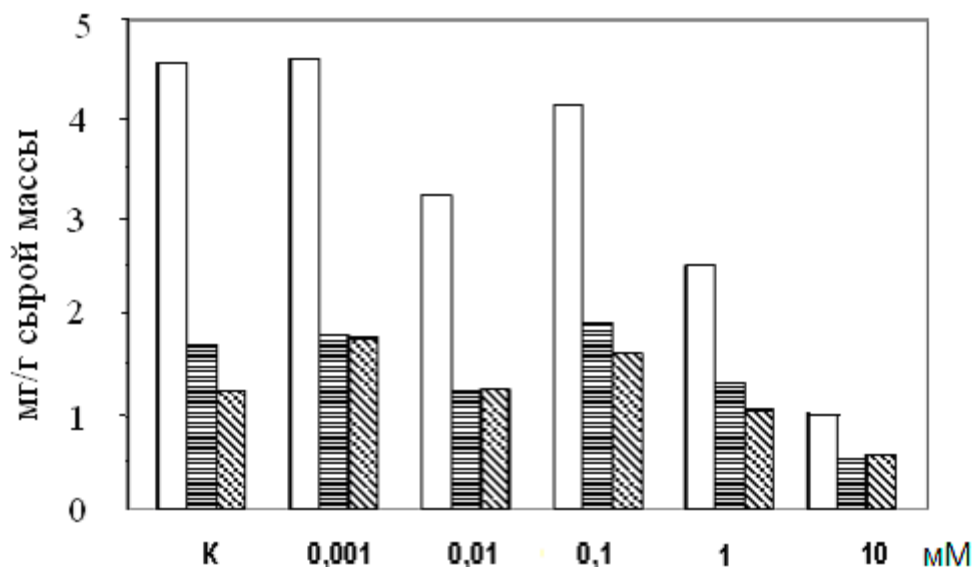
**Рис. 2. Содержание пигментов в проростках гороха в зависимости от концентрации сульфата цинка в среде (хлорофилл а – белые столбики, поперечная штриховка – хлорофилл b, наклонная штриховка – каротиноиды). К – контроль**

Увеличение концентрации сульфата никеля в среде не приводило к такой стимуляции синтеза пигментов, как в присутствии сульфата цинка (рис. 4). Более того, существенное (почти вдвое против контроля) ингибирование наблюдали уже при 1 мМ сульфата никеля в среде. При этом присутствие максимальной концентрации соли никеля не позволяло получить нормальные проростки гороха для определения пигментов, как и в исследовании болгарских коллег [9].

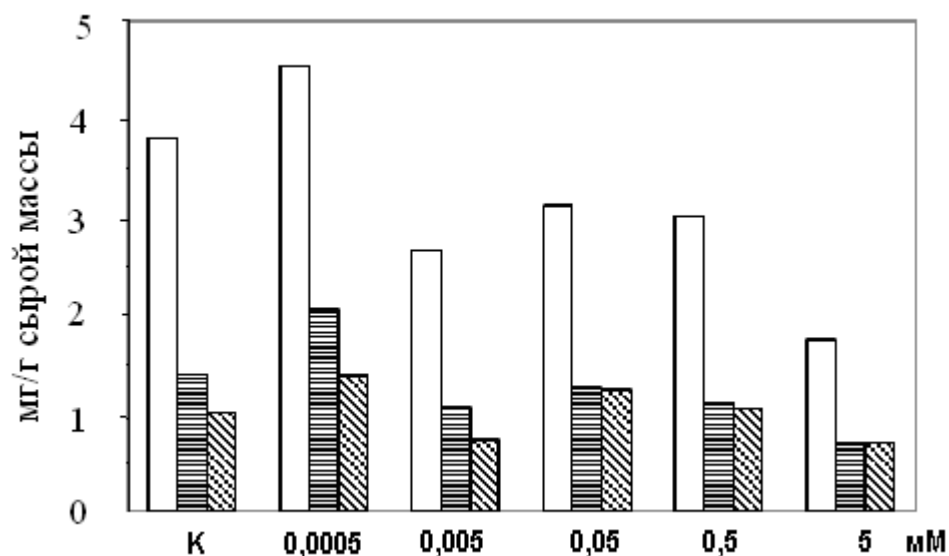
Совместное присутствие ионов цинка и никеля приводило к некоторому повышению содержания хлорофилла а при минимальной концентрации, равной 0,0005 мМ, с последующим снижением показателя. Максимальное снижение наблюдали при наибольшей в эксперименте суммарной концентрации солей в 5 мМ. Оно составляло более 50 % от контрольной величины. Изменение содержания хлорофилла b и каротиноидов менялось сходным образом (рис. 4).

Разная физиологическая роль в фотосинтетическом процессе делала необходимым определить соотношение основных пигментов. Установлено, что отношение хлорофилла а к b уменьшалось в присутствии возрастающих концентраций сульфата никеля в среде, в то время как для цинка и совместного присутствия металлов однозначной тенденции в изменении параметров не наблюдали (рис. 5).





**Рис. 3.** Содержание пигментов в проростках гороха в зависимости от концентрации сульфата никеля в среде (хлорофилл а – белые столбики, поперечная штриховка – хлорофилл b, наклонная штриховка – каротиноиды). К – контроль



**Рис. 4.** Содержание пигментов в проростках гороха в зависимости от концентрации сульфата никеля и сульфата цинка (1:1) в среде (хлорофилл а – бесцветные столбики, поперечная штриховка – хлорофилл b, наклонная штриховка – каротиноиды). К – контроль

Отношение содержания зеленых пигментов к каротиноидам снижалось примерно на 30 % уже при минимальной концентрации соли никеля в среде, равной 0,001 мМ, и оставалось на этом уровне при

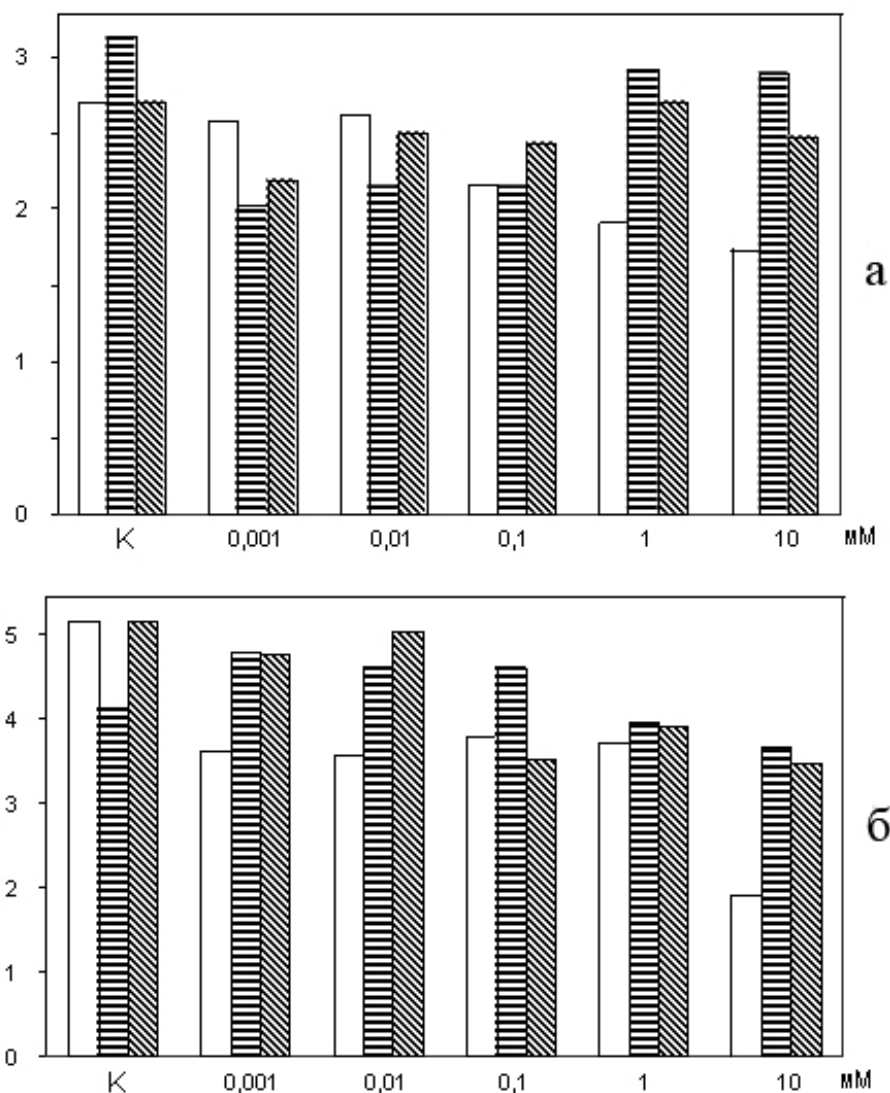
остальных более высоких изученных концентрациях ионов металла (рис. 5). Для сульфата цинка наблюдали некоторую стимуляцию (менее 20 %) с последующим снижением в присутствии 1мМ и более. Присутствие смеси солей металлов не приводило к увеличению показателя, но снижало его при двух наибольших концентрациях.

### Обсуждение результатов

Оценка водообеспеченности проростков гороха показала (см. рис. 1), что в условиях эксперимента она не претерпевала значительных изменений. Поэтому данный фактор не может рассматриваться как существенный в условиях данного эксперимента. В этой связи наблюдавшиеся изменения в пигментной системе могут быть связаны с другими механизмами.

Исследование влияния ионов цинка в среде показало стимулирующий эффект с последующим снижением до контрольных величин для всех изученных пигментов (рис. 2). При этом соотношение хлорофиллов, напротив, снижалось. По-видимому, это связано с более чем двукратным ростом содержания хлорофилла *b* при гораздо меньшем увеличении хлорофилла *a*. Причиной может быть ускорение превращения формы хлорофилла *a* в форму *b* на фоне синтеза белков фотосистемы II [20]. Увеличение показателя до почти контрольного уровня при 1 и 10 мМ сульфата цинка в среде, напротив, могло быть связано с ускорением распада хлорофилльной формы *a*, либо повреждениями белков комплекса фотосистемы II из-за накопления ионов цинка в побегах.

В листьях фасоли (*Phaseolus vulgaris* L.) через 2 недели после обработки сульфатом цинка в концентрации 200 ppm (0,7 ммоль) наблюдали снижение содержания всех пигментов, а отношение *a/b* – увеличилось примерно на 10 % [5]. F.K. Zengin [26] при изучении 9-дневных проростков растений этого же вида показал, что их обработка раствором хлорида цинка в концентрациях 1,5, 2,0 и 2,5 мМ не существенно влияла на содержание пигментов. Исследование изменений в динамике через каждые 2 дня позволило обнаружить почти линейные зависимости снижения суммы хлорофиллов примерно на 10-15 % в сравнении с контролем на 8 день эксперимента. При этом максимальное увеличение отношения *a/b* составляло всего около 6 %.



**Рис. 5. Соотношение зеленых форм хлорофилла a/b (a) и хлорофилл/каротиноиды (b) в зависимости от концентрации ионов никеля (белые столбики), цинка (горизонтальная штриховка), цинк+никель (наклонная штриховка) в среде. K – контроль**

Повышенное содержание общего хлорофилла и каротиноидов против контроля наблюдали в проростках кластерной фасоли (*Cyamopsistetragonoloba*(L.) Taub) при концентрациях сульфата цинка 0,035 и 0,087 мМ. Увеличение концентрации соли приводило к негативному эффекту [14]. В исследовании других авторов показано трехкратное снижение содержания общего хлорофилла в 7-дневных проростках растений этого же вида при 25 ppm (0,09 ммоль) сульфата цинка, причем содержание каротиноидов было лишь на 20 % ниже

контроля. Аналогичное почти трехкратное снижение каротиноидов наблюдали только при 50 ppm (0,17 ммоль) соли цинка.

В другом овощном растении семейства мальвовых – бамии (*Abelmoschus esculentus* L.), напротив, меньшая из указанных концентраций сульфата цинка стимулировала образование хлорофилла более чем на 10 %, в то время как концентрация в 50 ppm приводила к снижению содержания каротиноидов примерно на 30 % [13].

Увеличение содержания хлорофиллов и каротиноидов при низких концентрациях сульфата цинка (50-100 мг/кг почвы) (0,17-0,35 ммоль) обнаружили также для растений редиса [25]. Дальнейшее повышение соли до 250 мг/кг (0,87 ммоль) приводило более чем к 40 %-ному снижению показателей против контроля. В проростках ячменя содержание пигментов начинало возрастать при концентрации цинка в среде выше, чем 0,18 мМ [8]. Содержание каротиноидов по отношению к контролю недостоверно возрастало при минимальном содержании цинка в среде с последующим возвращением к контрольному показателю.

L. Rastgoо с соавт. [18] показали снижение содержания всех пигментов в листьях 30 дневных злаковых растений *Aeluropus littoralis* при 0,05 и 0,1 мМ цинка. При этом соотношение *a/b* не менялось, а отношение зеленых пигментов к каротиноидам было меньше контроля при 0,05 мМ соли цинка, но выше контроля при 0,1 мМ.

В присутствии в среде хлорида цинка в концентрациях 1, 3, 5 и 7 мМ показано более чем двукратное (максимально) увеличение содержания зеленых пигментов в проростках томата (*Lycopersicon esculentum* Mill.) при стабильной величине соотношения зеленых пигментов [10]. Также показано более чем 10-кратное увеличение антоцианина в гипокотиле проростков.

Таким образом, представленные результаты показывают необходимость присутствия ионов цинка в концентрациях 0,05-1 мМ (в зависимости от культуры), чем ионов никеля, для реакций, обеспечивающих нормальный синтез пигментов. При этом снижение содержания всех пигментов наблюдали только в условиях наиболее высокой концентрации ионов цинка в среде.

Изучение влияния возрастающих концентраций ионов никеля в среде на содержание пигментов в проростках гороха показало неоднозначное направление изменений в количестве каждого пигмента (см. рис. 3). Сравнение с литературными данными показывает, что в проростках вики минимальная концентрация хлорида никеля в 0,001 мМ увеличивала содержание общего хлорофилла примерно на 50 % [3]. В исследованиях других авторов показано, что присутствие хлорида никеля в среде в концентрации 0,01 мМ и выше ингибировало накопление обеих форм хлорофилла и каротиноидов в проростках черной фасоли (*Vignamungo* L.) [22]. В листьях других бобовых растений

(*Phaseolus vulgaris* L.) через две недели после обработки сульфатом никеля в концентрации 200 ppm (мг/кг почвы) (0,7 ммоль) наблюдали снижение всех пигментов, но соотношение хлорофиллов при этом не менялось [5].

В проростках ячменя возрастание концентрации никеля в среде (до 0,002 мМ) приводило к увеличению содержания хлорофиллов, вслед за которым следовало его двукратное снижение [8]. Содержание каротиноидов недостоверно менялось с уменьшением показателя при концентрации никеля 0,015 мМ и выше. У другого злакового растения *Aeluropus littoralis* присутствие ионов никеля в среде в концентрации 0,05 и 0,1 мМ приводило к снижению содержания обеих форм хлорофилла, в то время как содержание каротиноидов возрастало примерно на 10 %, а отношение Хл/кар уменьшалось примерно на 20 % [18]. Присутствие в среде хлорида никеля в широком диапазоне также меняло содержание хлорофилла в проростках пшеницы [17]. Увеличение составляло около 50 % при 0,01 мМ соли никеля, при 0,1 мМ показатель возвращался к контрольной величине, вслед за этим наблюдали снижение содержания хлорофилла (более чем в 5 раз против контроля при концентрации соли в 1 мМ). Соотношение хлорофиллов *a/b* также возрастало с последующим снижением: при 0,01 мМ увеличение составляло 60 %, при 0,1-0,4 мМ показатель был близок к контролю, после чего наблюдали дальнейшее снижение отношения *a/b* при увеличении содержания соли металла в среде. У растений водного салата (*Pistia stratiotes* L.) наблюдали снижение пигментов и соотношение хлорофиллов при концентрации сульфата никеля в среде в 1 и 10 ppm (мг/кг почвы) (0,0035 и 0,007 ммоль) [23].

Таким образом, низкие концентрации никеля в среде (менее 0,01 мМ), у большинства изученных растений оказывали стимулирующий эффект на образование хлорофиллов. Дальнейшее повышение концентрации ионов металла приводило к уменьшению зеленых пигментов. При этом часто увеличивалось соотношение хлорофиллов *a/b*, которое свидетельствует о стрессе, испытываемом проростками в условиях эксперимента [27]. Содержание каротиноидов было менее чувствительным. На основании таких данных можно сделать вывод о том, что никель в небольших концентрациях (порядка 0,001-0,01 мМ) необходим некоторым растениям для синтеза зеленых пигментов.

Совместное присутствие ионов цинка и никеля приводило вначале к некоторому повышению содержания всех изученных пигментов, вслед за которым наблюдали снижение этого показателя (см. рис. 4). Изменение величины соотношения зеленых пигментов было неоднозначным, но близким к контрольному значению, в то время как отношение Хл/кар снижалось при концентрации выше, чем 0,05 мМ (см. рис. 5). Литературных данных в этом аспекте почти нет. Напр., изучение присутствия ионов цинка (0,1 мМ) в качестве металла, ослабляющего (по предположению авторов) токсические эффекты никеля в проростках

пшеницы (*Triticumaestivum*L.), показало увеличение содержания общего хлорофилла примерно на 10 % и увеличение отношения хлорофиллов *a/b*[17]. Кроме того, среди физиологически значимых тяжелых металлов известно взаимодействие меди и цинка, а также цинка и железа [16].

Таким образом, представленные результаты предполагают, что никель и цинк, по-видимому, необходимы для обеспечения различных биохимических реакций, важных для синтеза главных пигментов растений. При этом между ионами указанных металлов, скорее всего, отсутствуют явления аддитивности, синергизма или антагонизма по отношению к процессам, связанным с накоплением пигментов. В то же время, стимулирующее влияние низких концентраций ионов цинка не преодолевало негативного действия ионов никеля на синтез фотосинтетических пигментов в проростках гороха при совместных концентрациях выше 0,005 мМ (см. рис. 4).

### Список литературы

1. Абрамова Э.А., Иванищев В.В. Исследование морфогенеза проростков при прорастании семян вики в присутствии ионов никеля // Известия ТулГУ. Естественные науки. 2012. Вып. 2. С. 246-252.
2. Абрамова Э.А., Иванищев В.В. Содержание воды в проростках вики и накопление ими биомассы в присутствии ионов никеля // Научные ведомости БелГУ. 2012. № 15 (134). Вып. 20. С. 42-45.
3. Абрамова Э.А., Иванищев В.В. Содержание фотосинтетических пигментов и аскорбиновой кислоты в проростках вики в присутствии хлорида никеля // Научные ведомости БелГУ. 2012. № 9 (128). Вып. 19. С.152-155.
4. Влияние ионов цинка и никеля на формирование проростков *Pisumsativum*L./В.В.Минайчев, Т.Е.Сиголаева, Д.А.Кузнецов и др. // Известия ТулГУ. Естественныенауки. 2015. Вып. 3. С. 292-304.
5. AldoobieN.F., BeltagiM.S. Physiological, biochemicalandmolecularrsponsesofcommonbean (*Phaseolusvulgaris*L.) plantsto heavy metals stress // African Journal of Biotechnology. 2013. V. 12(29). P. 4614-4622. – DOI: 10.5897/AJB2013.12387.
6. Gonzalez A., Chumillas V., del Carmen Lobo M. Effect of Zn, Cd and Cr on growth, water status and chlorophyll content of barley plants (*H. vulgare* L.) // Agricultural Sciences. 2012. V. 3, № 4. P. 572-581. doi:10.4236/as.2012.34069.
7. Ivanishchev V.V., Abramova E.A. Accumulation of nickel ions in seedlings of *Vicia sativa* L. and manifestations of oxidative stress // Environ. Sci. Pollut. Res. 2015. V. 22 (10). P. 7897-7905. – DOI 10.1007/s11356-015-4173-8.

8. The effect of heavy metals on spring barley (*Hordeum vulgare* L.) /R.Juknys, M.Racaite, G.Vitkauskaite // *Zemdirbyste-Agriculture*. 2009. V. 96 (2). P. 111-124.
9. Kaymakanova M. and Stoeva N. Physiological reaction of bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) to salt stress// *Gen. Appl. plant physiol. Salt stress in bean plants, special issue*. 2008. V. 34 (3-4), p. 177-188.
10. Kösesakal T., Ünal M. Effects of zinc toxicity on seed germination and plant growth in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) // *Fresenius Environmental Bulletin*. 2012. V. 21. № 2. P. 315-324.
11. Lichtentaller H.K., Welburn A.R. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents // *Biochem. Soc. Trans.* 1983. V. 11. № 6. P. 591-592.
12. Lin Y.-F., Aarts M.G.M. The molecular mechanism of zinc and cadmium stress response in plants // *Cell. Mol. Life Sci.* 2012. V. 69. P. 3187-3206. – DOI 10.1007/s00018-012-1089-z.
13. Mangal M., Agarwal M., Bhargava D. Effect of Cadmium and Zinc on growth and Biochemical Parameters of Selected Vegetables // *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2013. V. 2, № 1. P. 110-114.
14. Effect of Zinc on Germination, Seedling Growth and Biochemical Content of Cluster Bean (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub) / R.Manivasagaperumal, S.Balamurugan, G.Thiyagarajan et al // *Current Botany*. 2011. V. 2, № 5. P. 11-15.
15. Medvedeva E.A. Effect of nickel on the anthocyanin level in *Petunia* flowers // *Dokl. Acad. Nauk Tadzh. SSR*. 1972. V. 115. P. 59-61.
16. Mousavi S.R., Galavi M., Rezaei V. The interaction of zinc with other elements in plants: a review // *Intl. J. Agri. Crop. Sci.* 2012. V. 4, № 24. P. 1881-1884.
17. Effect of chelating agents and metal ions on nickel bioavailability and chlorophyll fluorescence response in wheat – An approach for attenuation of Ni stress / N.Patnaik, M.Mohanty, B.Satpathy et al // *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*. 2012. V. 8 (3). P. 99-112.
18. Effects of copper, nickel and zinc on biochemical parameters and metal accumulation in gouan, *Aeluropus littoralis* / L.Rastgoo, A.Alemzadeh, A.M.Tale et al // *Plant Knowledge Journal*. 2014. V. 3(1). P. 31-38.
19. Reichman S. M. *The Responses of Plants to Metal Toxicity: A review focusing on Copper, Manganese and Zinc*. Melbourne, 2002. Australian Minerals & Energy Environment Foundation. URL: [http://plantstress.com/Articles/toxicity\\_i/Metal\\_toxicity.pdf](http://plantstress.com/Articles/toxicity_i/Metal_toxicity.pdf) (датаобращения 15.02.2015).
20. Sairam R.K., Srivastavag.C. Induction of oxydative stress and antioxidant activity by hydrogen peroxide treatment in tolerant in tolerant and susceptible wheat genotypes // *Biol. Plant*. 2000. V.43, No3, p.381-386.

21. Occurrence, uptake, accumulation and physiological responses of nickel in plants and its effects on environment / R.S.Sengar, S.Gupta, M.Gautam et al // Res. J. Phytochem. 2008. V. 2 (2). P. 44-60.

22. Effect of lead and nickel toxicity on chlorophyll and proline content of Urd (*Vigna mungo* L.) seedlings / G.Singh, R.K.Agnihotri, R.S.Reshma // International Journal of Plant Physiology and Biochemistry. 2012. V. 4(6). P. 136-141. - DOI: 10.5897/IJPPB12.005

23. Singh K., Pandey S.N. Effect of nickel-stresses on uptake, pigments and antioxidative responses of water lettuce, *Pistia stratiotes* L. // J. Environ. Biol. 2011. V. 32. P. 391-394.

24. Tsonev T., Lidon F.J.C. Zinc in plants – An overview // Emir. J. Food Agric. 2012. V. 24 (4). P. 322-333.

25. Vijayarengan P. Growth and biochemical variations in radish under zinc applications // International Journal of Research in Plant Science. 2012. V. 2(3). P. 43-49.

26. Zengin F.K. The effects of  $\text{Co}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  on the contents of protein, abscisic acid, proline and chlorophyll in bean (*Phaseolus vulgaris* cv. Strike) seedlings // Journal of Environmental Biology. 2006. V. 27(2). P. 441-448.

27. Zengin F.K., Munzuroglu O. Effects of some heavy metals on content of chlorophyll, proline and some antioxidant chemicals in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings // Acta Biologica Cracoviensia. SeriesBotanica. 2005. V. 47 (2). P. 157-164.

### Сведения об авторах

Минайчев Владислав Валентинович, студент, [vminaichev@mail.ru](mailto:vminaichev@mail.ru), Россия, Тула, Тульский государственный педагогический университет им. Л.Н. Толстого,

Сиголаева Татьяна Евгеньевна, магистрант, [tatyana.sigolaeva@yandex.ru](mailto:tatyana.sigolaeva@yandex.ru), Россия, Тула, Тульский государственный педагогический университет им. Л.Н. Толстого,

Кузнецов Дмитрий Андреевич, студент, [zavodskaya.3.7@yandex.ru](mailto:zavodskaya.3.7@yandex.ru), Россия, Тула, Тульский государственный педагогический университет им. Л.Н. Толстого,

Иванищев Виктор Васильевич, д-р биол. наук, старший научный сотрудник, зав. кафедрой, [avdey\\_VV@mail.ru](mailto:avdey_VV@mail.ru), Россия, Тула, Тульский государственный педагогический университет им. Л.Н. Толстого

## THE EFFECT OF ZINC AND NICKEL IONS IN WATER AVAILABILITY OF PEA SEEDLINGS AND THE FORMATION OF PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS

*V.V. Minaychev, T.E. Sigolaeva, D.A. Kuznetsov, V.V. Ivanishchev*

*The influence of a wide range of concentrations of nickel ions, zinc, and their joint presence in the medium in water availability and the formation of photosynthetic pigments in pea (*Pisum sativum* L., cv. Pharaoh) seedlings during early ontogeny was studied. It was shown that nickel ions influence the water availability only at a high salt concentration dur-*



ing experiments. Probably they are not required for the synthesis of chlorophyll and carotenoids. The presence of nickel ions in the medium at a concentration of 0,01mM resulted in a reduction of the chlorophyll a/b ratio. At the same time, the presence of zinc ions in the medium at a concentration higher than 0,001 mM is necessary to stimulate the synthesis of photosynthetic pigments in pea seedlings. The higher concentrations of the metal (except 10 mM) do not adversely influence this process. The presented results suggest that the presence of zinc ions in the medium does not protect the synthesis of pigments in pea seedlings from the negative influence the increasing concentrations of nickel ions.

Keywords: pea (*Pisum sativum* L.), seedlings, zinc, nickel, photosynthetic pigments

Minaychev Vladislav Valentinovich, student, [yminaychev@mail.ru](mailto:yminaychev@mail.ru), Russia, Tula , Tula State Lev Tolstoy Pedagogical University,

Sigolaeva Tatyana Evgenievna, master student, [tatyana.sigolaeva@yandex.ru](mailto:tatyana.sigolaeva@yandex.ru), Russia, Tula , Tula State Lev Tolstoy Pedagogical University,

Kuznetsov Dmitry Andreevich, student, [zavodskaya.3.7@yandex.ru](mailto:zavodskaya.3.7@yandex.ru), Russia, Tula, Tula State Lev Tolstoy Pedagogical University,

Ivanishchev Viktor Vasiljevich, Doctor of Biology, Senior Researcher, Head of the Department, [avdey\\_VV@mail.ru](mailto:avdey_VV@mail.ru), Russia, Tula, Tula State Lev Tolstoy Pedagogical University

УДК 579.222; 579.6

## ВЛИЯНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ БАКТЕРИЙ РОДА *RHODOCOCCLUS* НА ДЕГРАДАЦИЮ *n*-ГЕКСАДЕКАНА

И.А. Нечаева, Т.М. Лыонг, В.Э. Сатина, О.Н. Понаморёва

*Установлена зависимость процесса биodeградации гидрофобных субстратов (на примере n-гексадекана) от способности бактерий рода Rhodococcus выделять в культуральную среду биосурфактанты гликолипидной природы и от степени гидрофобности клеточной поверхности микроорганизмов-деструкторов. Показано, что по мере накопления трегалолипидов в культуральной среде (238 и 268 мг/л после 6 суток культивирования) происходит уменьшение гидрофобности клеточной поверхности штаммов R.erythropolisX5 и R.erythropolisS67. Степень деградации n-гексадекана для S67 и X5 составила 89 % и 81 %, соответственно.*

*Ключевые слова: биосурфактанты, трегалолипиды, Rhodococcus, гидрофобность, биodeградация, n-гексадекан*

### 1. Введение

В настоящее время бактерии рода *Rhodococcus* привлекают внимание исследователей, вследствие их широкого практического применения в биоремедиации окружающей среды от ксенобиотиков, повышении нефтеотдачи почвенных пластов, очистке сточных вод от нефтепродуктов. Данному факту способствуют уникальные биологические, физиологические и биохимические особенности этой группы микроорганизмов. Широкий спектр метаболических возможностей обуславливает способность родококков трансформировать и деградировать разнообразные по химической структуре углеводороды (алифатические, ароматические, нитроароматические, поли- и гетероциклические) и их производные (пестициды, полихлорированные бифенилы, фенолы, нитрилы) [1]. Родококкам свойственны циклический характер развития и наличие морфогенетических переходов «кокк-палочка-кокк». Причём в первые часы роста образуется нестабильный мицелий, не имеющий перегородок и представляющий собой одну клетку. За счёт последующей фрагментации клеточного мицелия на короткие палочковидные формы увеличивается отношение клеточной поверхности к общему объёму клетки, что повышает способность родококков поглощать трудноусваиваемый гидрофобный субстрат [2].

Кроме того, клеточная стенка бактерий данной группы в силу своей липофильности имеет высокое сродство к гидрофобным субстратам и представляет собой мощное липофильное образование, подобного которому нет у других бактерий [3]. Большое значение имеет содержание в ней липидов, которые играют ведущую роль в процессе потребления углеводов. Также в клеточной стенке нокардиоформных

микроорганизмов содержатся простые жирные кислоты, гликолипиды, корд-фактор и его аналоги, фосфолипиды, нейтральные липиды. Помимо липидов клеточная стенка родококков включает в себя миколовые кислоты, которые являются специфическими и обязательными структурными компонентами клеточных стенок ряда бактерий, таких как *Rhodococcus* sp., *Mycobacterium* sp., *Nocardia* sp., *Pseudonocardia* sp. и др. [4].

Способность утилизировать труднодоступные субстраты бактериями рода *Rhodococcus* происходит также благодаря образованию биологических поверхностно-активных веществ (биоПАВ или биосурфактантов) гликолипидной природы, которые способствуют солюбилизации и эмульгированию гидрофобных субстратов.

Вышеперечисленные особенности родококков, в сочетании со способностью выживать в неблагоприятных условиях окружающей среды, обуславливают перспективность их использования при разработке биопрепаратов для очистки территорий и акваторий, загрязнённых нефтью и нефтепродуктами.

Целью данной работы являлось выяснение влияния гидрофобности клеточной поверхности бактерий рода *Rhodococcus* и их способности образовывать биосурфактанты гликолипидной природы на степень деградации *n*-гексадекана в жидкой минеральной среде.

## 2. Материалы и методы исследования

### **Штаммы микроорганизмов-деструкторов углеводородов нефти.**

Штаммы бактерий *Rhodococcus erythropolis* S67 и *Rhodococcus erythropolis* X5 входят в состав биопрепарата «МикроБак», который используют для биоремедиации нефтезагрязнённых территорий [5].

### **Питательные среды и условия культивирования.**

Микроорганизмы культивировали в жидкой минимальной минеральной среде Эванса [6] и полноценной среде Лурия-Бертани [7]. Готовые среды стерилизовали автоклавированием в течение 30 мин. при 120°C. Инокулирование колб проводили суспензией микроорганизмов, выращенной на среде Лурия-Бертани в течении 24 часов. Культивирование микроорганизмов проводили в колбах Эрленмейера объёмом 750 мл на орбитальной качалке (при 26°C,  $n=180$  об/мин) в течение 6 суток в присутствии *n*-гексадекана (2 % по объёму) как единственного источника углевода и энергии.

### **Определение гидрофобности клеточной поверхности.**

Гидрофобность определяли по МАТН-тесту (Microbial Adherence to Hydrocarbon) с модификациями [8, 9]. После 6 суток культивирования родококков в условиях, описанных выше, содержимое колб центрифугировали в течение 10 мин., при 12000 г на центрифуге TG16WS («Поликом» Россия). Клеточную биомассу дважды отмывали дистиллированной водой и ресуспендировали в фосфатно-магниевом

буфере (рН=7,0), так чтобы значение оптической плотности (ОП<sub>600нм</sub>) клеточной суспензии всех образцов было в пределах 0,48 – 0,50. К 3,0 мл клеточной суспензии добавляется 0,5мл н-гексадекана. Содержимое пробирок интенсивно встряхивали в течение 3 минут и оставляли для разделения фаз на 10мин при температуре 37оС. Аккуратно пипеткой отбирали 3 мл нижней водной фракции и измеряли ее оптическую плотность при 600нм. Степень адгезии клеток рассчитывают по формуле:  $N(\%) = (1 - \text{ОП}_1 / \text{ОП}_0) * 100 \%$ , где ОП<sub>0</sub>, ОП<sub>1</sub> – оптическая плотность клеточной суспензии до и после добавления н-гексадекана соответственно. В качестве контрольного образца использовали буферный раствор вместо суспензии клеток.

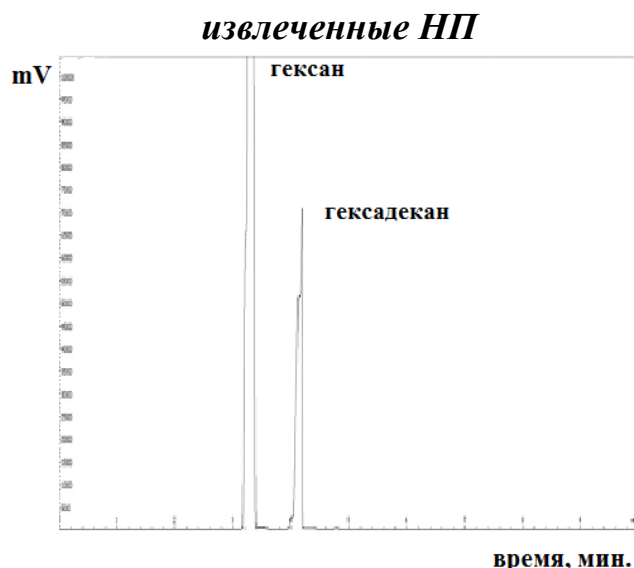
**Определение содержания гликолипидных биосурфактантов.** Содержание биосурфактанта оценивали по концентрации сахаров в бесклеточном супернатанте колориметрическим методом с использованием фенольного реактива по методике [10]. Стандартом служил раствор трегалозы.

**Определение н-гексадекана в культуральной среде методом газовой хроматографии.** Для определения гексадекана методом газовой хроматографии использовали газовый хроматограф с пламенно-ионизационным детектором Кристалл 5000.2 (СКБ Хроматэк, Россия) . Условия хроматографирования были следующими:

газохроматографическая капиллярная колонка: SGEAnalyticalScienceforteGCCapillaryColumnBP1 J08 30м\*0,3мм\*0,53мкм;  
температура термостата — 250°С;  
температура испарителя (инжектора) — 300°С.  
инжектор с делением потока – коэффициент деления потока 1:1.  
детектор ионизации в пламени (ДИП):  
температура детектора — 200 — 250°С;  
расход воздуха — 18 дм<sup>3</sup>/ч;  
расход водорода — 1,8 дм<sup>3</sup>/ч;  
скорость потока газа-носителя — 17,4 см<sup>3</sup>/мин  
объем пробы — 1 мм<sup>3</sup>.

Исследуемый образец экстрагировали н-гексаном в стеклянной делительной воронке емкостью 250 мл в течение 5 мин при интенсивном встряхивании содержимого воронки. После расслоения жидкостей отбирали верхнюю фазу. В испаритель (инжектор) вводили 1 мм<sup>3</sup> образца экстракта и осуществляли хроматографическое разделение. Регистрировали пики в области времени удерживания, соответствующие компонентам градуировочной смеси. По полученным хроматограммам рассчитывали концентрацию гексадекана с использованием градуировочной зависимости (зависимость площади пика от концентрации гексадекана). Порядок выхода пиков представлен на рис. 1.

**После расслаивания жидкостей слой н-гексана, содержащий**

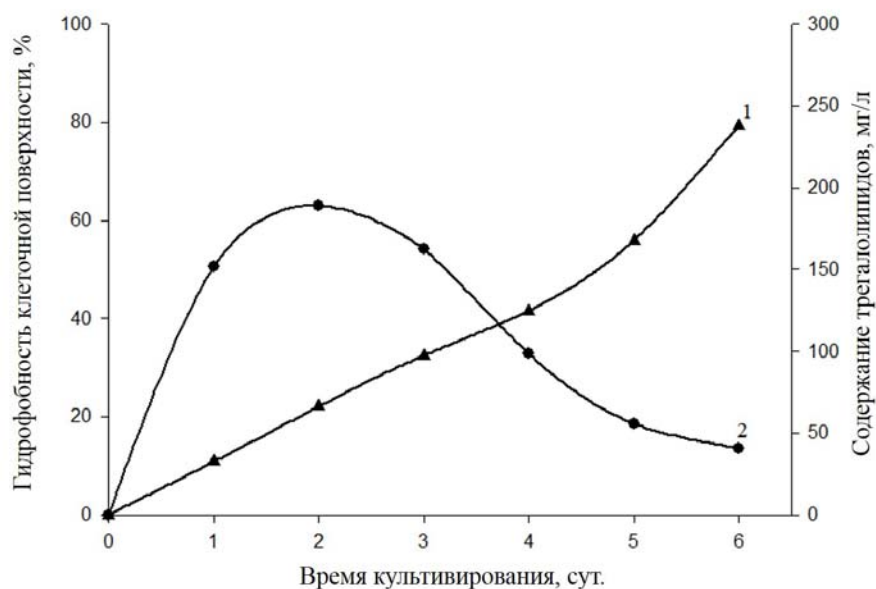


**Рис. 1. Хроматограмма гексадекана, растворитель гексан**

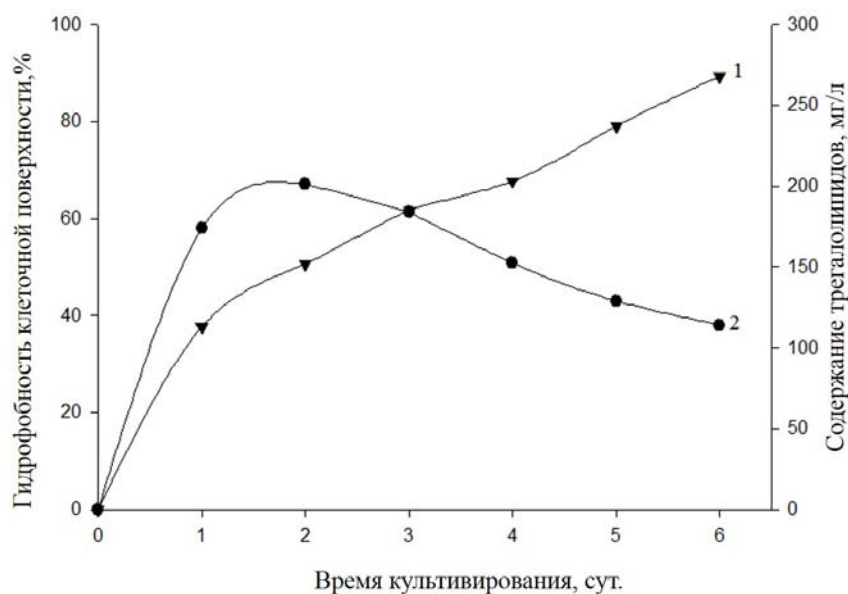
### 3. Результаты и их обсуждение

Начальным этапом биodeградации гидрофобных субстратов, в частности алифатических углеводородов, является их поступление в микробные клетки. Способность к поглощению углеводородных соединений тесно связана с особенностями строения и метаболической организации углеводородоокисляющих бактерий. В процессе окисления углеводородов важную роль играет прямой контакт клеток с субстратом, поэтому способность или неспособность микроорганизмов поглощать углеводороды зависит от состава и строения клеточной стенки и, в первую очередь, определяется присутствием гидрофобной клеточной поверхности [3, 11]. Гидрофобность клеточной поверхности микроорганизмов-деструкторов углеводородов нефти *Rhodococcus erythropolis* S67 и *Rhodococcus erythropolis* X5 определяли с помощью МАТН-теста на протяжении 6 суток культивирования с использованием н-гексадекана в качестве гидрофобного субстрата. Наибольшее значение гидрофобности клеточной поверхности составляло 63 % для *R. erythropolis* S67 и 67 % *R. erythropolis* X5 после 2 суток культивирования. В работе Рубцовой [12] показана зависимость гидрофобности клеточной поверхности от ростового субстрата и от видовой принадлежности бактерий рода *Rhodococcus*. Представители *R. opacus*, *R. rhodochrous* и *R. ruber* проявляют высокую (75–90 %) адгезивную активность при культивировании как в присутствии углеводорода, так и без него. Для представителей видов *R. erythropolis*, *R. fascians* и *R. longus* средние показатели клеточной адгезии при использовании глюкозы в качестве источника углерода не превышали 55 %, тогда как культивирование в присутствии н-гексадекана способствовало значительному (до 30 %) повышению адгезивной активности. По-видимому, присутствие углеводорода в среде

культивирования способствует повышению степени гидрофобности клеточной поверхности у представителей данных видов родококков. В нашей работе получены сопоставимые результаты по гидрофобности клеточной поверхности для вида *Rhodococcus erythropolis* (рис.2).



а



б

**Рис. 2. Содержание трегалолипидов в бесклеточном супернатанте (1) и гидрофобность клеточной поверхности (2) при культивировании микроорганизмов *R. erythropolis* X5 (а) и *R. erythropolis* S67 (б) на *n*-гексадекане**

Известно, что родококки при культивировании на гидрофобных субстратах продуцируют в культуральную среду биосурфактанты гликолипидной природы, а именно трегалолипиды [13]. Содержание трегалолипидов, выделяемых *R. erythropolis* S67 и *R. erythropolis* X5 в культуральную среду, было максимальным после 6 суток культивирования и составило 268 и 238 мг/л, соответственно. По мере накопления биосурфактантов происходит уменьшение гидрофобности клеточной поверхности данных микроорганизмов (рис. 2). Полученные результаты показывают взаимосвязь между гидрофобностью клеточной поверхности и образованием биосурфактантов. В работе [14] показано уменьшение гидрофобности клеточной поверхности бактерий рода *Gordoniac* 60 до 2 % при обнаружении в культуральной среде биосурфактантов. Полученные нами результаты и данные других авторов согласуются с гипотезой о том, микроорганизмы, образующие биосурфактанты, способны изменять свои поверхностные свойства [15]. Следует отметить, что у штамма S67 в меньшей степени происходит снижение гидрофобности клеточной поверхности (с 61 % до 38 %), чем у штамма X5 (с 54 % до 14 %), в то время как оба этих микроорганизма продуцируют в культуральную среду практически одинаковое количество трегалолипидов (268 и 238 мг/л, соответственно). Таким образом, на изменение гидрофобности клеточной поверхности родококков оказывает влияние не только образование биосурфактантов, но и особенности строения их клеточной стенки, содержащей липиды. Известно [16, 11, 10], что при росте *R. rhodochrous* и *R. ruber* на средах с жидкими и газообразными n-алканами индуцируется избыточный синтез липидных компонентов клеточной стенки, что способствует гидрофобизации клеточной поверхности. Мы можем предположить, что у изучаемых нами родококков при культивировании на n-гексадекане количество образуемых липидов клеточной стенки будет различаться. Такое различие в физиологическом поведении углеводородокисляющих родококков интересно для дальнейшего изучения.

В результате продуцирования биосурфактантов происходит эмульгирование гидрофобного субстрата, который становится более доступным для микробных клеток и как следствие этого ускоряется процесс биодеградации. Для выяснения зависимости убыли n-гексадекана от содержания гликолипидных биосурфактантов проводили определение остаточного содержания n-алкана газохроматографическим методом. На протяжении 6 суток культивирования происходит постепенное потребление n-гексадекана штаммами *R. erythropolis* X5 и *R. erythropolis* S67, что выражается в уменьшении процентного содержания углеводорода в культуральной среде до 0,23 и 0,37 %, соответственно. В работе [17] деградация 1 % гексадекана *Rhodococcus* sp. NJ2, *P. aeruginosa* PSA5 и *O. intermedium* составила 81 %, 50 % и 23 %, соответственно. Способность

бактерий рода *Rhodococcus* к росту на среде, содержащей длинноцепочечные алканы от C<sub>10</sub> до C<sub>36</sub>, изучали в работе [18]. В результате проведённых кинетических экспериментов доказали, что *R. opacus*R7 с большей скоростью деградирует н-алканы с меньшим числом углеродных атомов, а именно 88 % C<sub>12</sub>, 69 % C<sub>16</sub>, 51 % C<sub>20</sub>, 78 % C<sub>24</sub>. Таким образом, полученные нами результаты по деградации н-гексадекана согласуются с литературными данными, что демонстрирует способность бактерий *R. erythropolis* X5 и *R. erythropolis* S67 эффективно деградировать гидрофобный субстрат (89 и 81 %, соответственно).

### Заключение

Бактерии-деструкторы углеводородов нефти *R. erythropolis* S67 и *R. erythropolis* X5 – компоненты биопрепарата для биоремедиации нефтезагрязнённых территорий, являются эффективными продуцентами гликолипидных биосурфактантов при росте в жидкой минеральной среде на н-гексадекане и обладают гидрофобной клеточной стенкой. Вышеперечисленные физиологические особенности микроорганизмов рода *Rhodococcus* при росте на н-гексадекане способствуют потреблению данного субстрата, так как эффективность биodeградации на прямую зависит от способности микроорганизмов поглощать гидрофобный субстрат.

### Список литературы

1. Серебренникова М. К., Тудвасева М. С., Куюкина М. С. Биологические способы очистки нефтезагрязнённых сточных вод (обзор) // Вестник Пермского университета. 2015. Вып. 1. №10. С. 15-30.
2. Ившина И.Б., Каменских Т.Н., Анохин Б.А. Адаптационные механизмы выживания алканотрофных родококков, реализованные в неблагоприятных условиях среды // Вестник Пермского университета. 2007. Вып. 5. №10. С. 107-112.
3. Коронелли Т.В. Поступление углеводородов в клетки микроорганизмов // Успехи микробиологии. 1996. №6. С. 579-585.
4. Гоголева О.А., Немцева Н.В. Углеводородокисляющие микроорганизмы природных экосистем // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН (электронный журнал). 2012. №2. С. 1-7.
5. Патент 2378060 РФ. Биопрепарат для очистки почв от загрязнений нефтью и нефтепродуктами, способ получения и применения / А.Е. Филонов [и др.] // Опубл. 10.01.2009. Бюл. №1.
6. Evans C.G.T., Herbert D., Tempest D.B. The continuous cultivation of microorganisms. 2. Construction of a chemostat // Meth Microbiol. 1970. V.2. P.277–327.
7. Carhart G., Hegeman G. Improved method of selection for mutants of *Pseudomonas putida* // Appl. Microbiol. 1975. V.30. P.1046-1053.



8. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review / S.K.Satpute, A.G.Banpurkar, P.K.Dhakephalkar et al // Crit Rev Biotechnol. 2010. V. 30. №2. P.127-144.

9. Rosenberg M. Bacterial adherence to hydrocarbons: a useful technique for studying cell surface hydrophobicity// FEMS Microbiology. 1984. V.22. P. 289-295.

10. Dubois M. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // Anal. Chem.1956. V. 28. №3. P. 350-356.

11. Куюкина М.С., Ившина И.Б., Рычкова И.М. Влияние состава клеточных липидов на формирование неспецифической антибиотикорезистентности алканотрофных родококков // Микробиология. 2000. №1. С. 62-69.

12. Рубцова Е.В., Куюкина М.С., Ившина И.Б. Влияние условий культивирования на адгезивную активность родококков в отношении n-гексадекана // Прикладная биохимия и микробиология. 2012. Т.48. №. 5. С. 501-509.

13. Production and application of trehalose lipid biosurfactants / A.Franzetti, I.Gandolfi, G.Bestetti et al// Eur J Lipid Sci Technol. 2010. V. 112. P.617 - 627.

14. Franzetti A., Bestetti G., Caredda P. Surface-active compounds and their role in the access to hydrocarbons in *Gordonia* strains // FEMS Microbiol Ecol. 2008. №63. P. 238-248.

15. Ron E., Rosenberg E. Natural roles of biosurfactants// Environ Microbiol. 2001.V.3.N4. P. 229-236.

16. Ившина И.Б. Бактерии рода *Rhodococcus* (иммунодиагностика, детекция, биоразнообразие) : дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.07. Пермь, 1997. 197 с.

17. Mishra Sh., Singh S.N. Microbial degradation of n-hexadecane in mineral salt medium as mediated by degradation enzymes // Bioresource Technology. 2012. №111. P. 148-154.

18. Biodegradation of variable-chain-length n-alkanes in *Rhodococcus opacus* R7 and the involvement of an alkane hydroxylase system in the metabolism / J.Zampolli, E.Collina, M.Lasagni et al // AMB Express. 2014. V.4. №73. P. 2-9.

Льонг Тхи Мо, аспирант, [luongmo@mail.ru](mailto:luongmo@mail.ru), Россия, Тула, Тульский государственный университет,

Нечаева Ирина Александровна, канд. биол. наук, доц., [nechaeva1902@gmail.com](mailto:nechaeva1902@gmail.com), Россия, Тула, Тульский государственный университет,

Понаморёва Ольга Николаевна, д-р хим. наук, зав. кафедрой, [olgaronamoreva@mail.ru](mailto:olgaronamoreva@mail.ru), Россия, Тула, Тульский государственный университет,

Сатина Валерия Эдуардовна, магистрант, [lerysya-93@mail.ru](mailto:lerysya-93@mail.ru), Россия, Тула, Тульский государственный университет

INFLUENCE OF THE PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE  
BACTERIA GENUS RHODOCOCCLUS ON THE DEGRADATION  
N-HEXADECANE

*I. A. Nechaeva, T.M. Luong, V. E. Satina, O.N. Ponamoreva*

*Abstract: The dependence of the process of biodegradation of hydrophobic substrates (for example, n-hexadecane) on the ability of Rhodococcus bacteria secrete into the culture medium glycolipid biosurfactant and the degree of hydrophobicity of the cell surface of microorganisms-destroyers. It was shown that the accumulation in the culture medium trehalose lipids (238 u 268 mg / l after 6 days cultivation) decreases hydrophobicity of the surface of the cell strains R. erythropolis X5 and R. erythropolis S67. The degree of degradation n-hexadecane for X5 and S67 was 89 % and 81 %, respectively.*

*Keywords: biosurfactants, trehalolipids, Rhodococcus, hydrophobicity, biodegradation, n-hexadecane*

*Luong Thi Mo, graduate student, [luongmo@mail.ru](mailto:luongmo@mail.ru), Russia, Tula, Tula State University,*

*Nechaeva Irina Aleksandrovna, candidate of biological sciences, associate professor, [nechaeva1902@gmail.com](mailto:nechaeva1902@gmail.com), Russia, Tula, Tula State University,*

*Ponamoreva Olga Nikolaevna, doctor of chemical sciences, head of department, [olgaponamoreva@mail.ru](mailto:olgaponamoreva@mail.ru), Russia, Tula, Tula State University,*

*Satina Valerya Eduardovna, graduate student, [lerysya-93@mail.ru](mailto:lerysya-93@mail.ru), Russia, Tula, Tula State University*

УДК 579.2:579.66:579.695:577.2

## КУЛЬТИВИРОВАНИЕ *BACILLUS SUBTILIS* В СТРУКТУРЕ БЕЗОТХОДНОЙ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА ВЕТЕРИНАРНОГО НАЗНАЧЕНИЯ

Н.В.Ширшиков, Ю.В. Редикульцев, Е.Н.Музафаров, А.Б. Гаврилов

*Обсуждаются вопросы асептического культивирования спорогенных бактерий в погруженной культуре для получения суспензии клеток, используемых для разработки пробиотического препарата ветеринарного назначения. Разработаны элементы безотходной биотехнологии культивирования микроорганизмов с применением питательных сред на основе зернового материала. Использование размолотого зерна пшеницы как на стадии приготовления питательной среды, так и на стадии приготовления препарата сокращает к минимуму расход водной фазы, что является основной безотходности в рамках микробиологического процесса. Обсуждаются вопросы применения пробиотиков в качестве альтернативы медикаментозным препаратам, массово используемых в птицеводстве и животноводстве. Рассматриваются также вопросы организации системы культивирования микроорганизмов на основе пневмоприводных ферментеров.*

*Ключевые слова: пробиотики, культивирование бактерий, безотходная биотехнология, зерновой материал, пневмоприводной биореактор.*

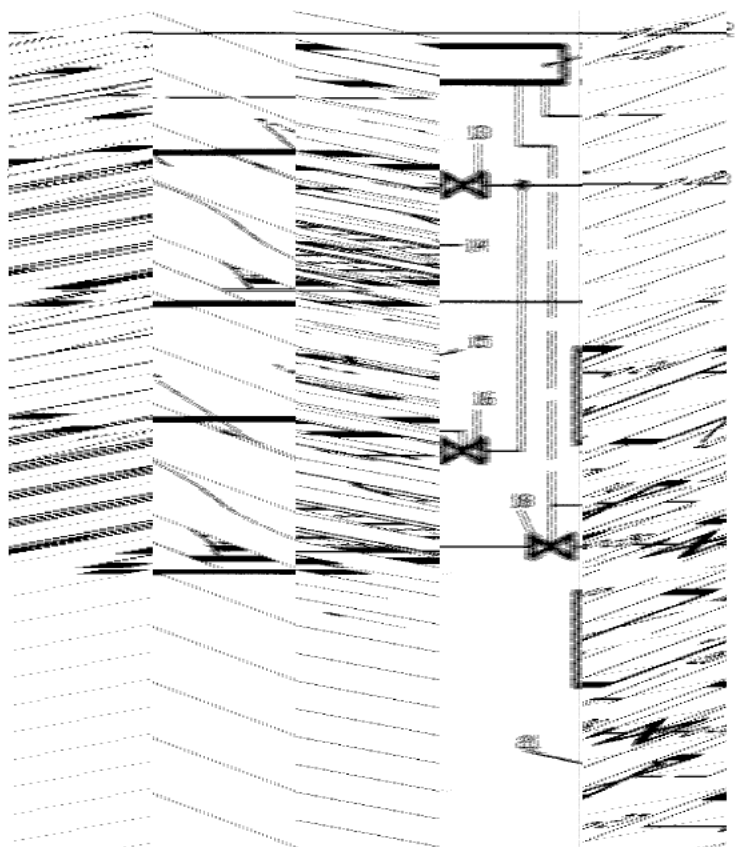
### Введение

Использование спорообразующих бактерий в качестве пробиотических микроорганизмов известно уже более 20- лет. В мировой биотехнологии создано большое количество препаратов на основе рода *Bacillus*, в России создано более 20 подобных препаратов, используемых как в медицинских целях, так и ветеринарии [1]. Пробиотический эффект спорообразующих бактерий при лечении дисбактериоза животных и человека достигается тем, что споры, попадая в желудочнокишечный тракт, прорастают. Соответственно, бактерии продуцируют физиологически активные вещества типа антибиотиков и ферментов, которые подавляют рост патогенной микрофлоры. Следует отметить, что вопросам культивирования спорогенных бактерий посвящены многочисленные публикации патенты [2]. В прелагаемых модельных процессах использованы, как правило, комплексные среды на основании соевого шрота, кукурузного экстракта с применением минеральных компонентов. Нами предложен в качестве исходного сырья зерновой материал из пшеницы, причем зерно используется как на стадии приготовления жидкой питательной среды, так и на стадии приготовления продукта. Минеральные компоненты не используются, а водная фракция или этанол используются на стадии первичной очистки зерна от технологических примесей. При больших выходах продукта наиболее

эффективно использование этанола, поскольку этанол легче регенерировать. На этапах испытания активности препарата делались высевы для анализа колониеобразующих единиц (КОЕ).

### Материалы и методы

**Ферментационная установка.** Использовали систему ферментации ИБП РАН МФК-3 [3]. В состав системы входят: модуль фильтрации подающего и отходящего воздуха, ферментационные емкости объемом по 3 литра (рис. 1); система коммуникационных магистралей и клапанов; автономный модуль парогенератора рабочим объемом 20 л с подсистемой автоматической дозирования водой; модуль периодической стерилизации питательных сред в режиме автоклавирования объемом 20 л; двухуровневая система сбора данных и управления.



*Рис. 1. Схема ферментационной установки. 1-2– ферментационные емкости, 3-4 – крышки герметические, 5-6- теплообменные рубашки, 7 – кольца Рашига или матрикс, 9 – трубопровод нижнего слива, 10 – насос, 11 – буферная емкость, 12 – шлюзовая камера, 13-21 – клапаны, 22-27- патрубки для подключения к внешним сетям, 28- система управления*

Ядром системы является каскадный модуль, который состоит из двух ферментационных емкостей. В данном модуле используется пневматический режим аэрации и перемешивания культуральной жидкости (КЖ), моторы и герметические системы передачи мощности в жидкость типа магнитных муфт, уплотнений и сальников не используются. Ферментационные емкости соединены магистралью для перетока культуральной жидкости из одной емкости в другую, причем каждая наполовину заполнена «структурными элементами» типа колец Рашига или матриксом для создания «физиологической поверхности» массообмена. При подаче стерильного воздуха по магистрали 23 и открытом клапане 13 и закрытом клапане 16 КЖ из емкости 1 по патрубку нижнего слива поступает в емкость 2. При открытом клапане 16 и закрытом клапане 13 КЖ из емкости 2 возвращается в емкость 1; таким образом, осуществляется цикл перетока. В противофазе клапанам 13, 16 работают клапаны 14 и 15, которые вместе с буферной емкостью 11 и патрубком 24 образуют магистраль отходящего воздуха. По линии 22 и помощью насоса в ферментационную емкость 1 подаются питательная среда и загружается посевной материал. Линия 25 служит для подачи пара; линия 26 обеспечивает сбор продукта; линия 27 сброс в канализацию.

В модуле фильтрации газов и воздуха использовали стерилизуемые фильтры с фильтрующими элементами и корпусами компании «Владипор» (Россия).

В качестве приводных клапанов использовали 3/2 электропневмопреобразователи фирмы SMC (Япония). Для коммуникации культуральной жидкости, пара и сред использовали пережимные клапаны оригинальной конструкции. Двухуровневая система управления состоит из микроконтроллера и РС [4]. Система реализует удобные элементы графического пользовательского интерфейса (GUI), осуществляет режимы управления исполнительными элементами, параметризацию процесса и визуализацию состояния процесса ферментации, архивирование данных, доступных, кроме того, для интерпретации средствами Excel.

**Питательная среда.** Основой питательной среды является отвар размолотого зерна пшеницы. Химический состав зерна представлен в работе [5]. Среду готовили следующим образом:

- зерно пшеницы промыли в холодной водопроводной воде до просветления смывной воды, затем просушили,
- размололи зерно на крупорешке до фракции 0.2-0.4 мм,
- взяли 200 г размола и залили 3-4 л водопроводной воды в бутылку объемом 10 л,
- в бутылку подвели пар (110 °С), разогрели смесь паром и варили 20-30 мин.; объем среды довели до 5.5 -6.0 л.
- отвар фильтровали через сито (0.7),
- в фильтрат внести 5 г/ л мела – CaCO<sub>3</sub> и тщательно перемешали,

- взяли 600 мл отвара на приготовление посевного материала, основная часть среды загрузили в специальный стерилизатор сред, который является составной частью ферментационной установки, стерилизовали 120 °С, 60 мин,

- рН среды до стерилизации 7.2, среда забуферена углекислым кальцием.

**Стерилизация модулей установки и питательной среды.** Стерилизацию модуля ферментеров, модуля фильтров и питательной среды осуществляли от встроенного в систему парогенератора с помощью процедур управления, специально разработанных и адаптированных для данного микробиологического процесса. Параметры стерилизации составляли 120 °С, 60 мин.

**Выращивание посевного материала.** Для исследований использовался штамм *Bacillus subtilis* ВКПМ В-5225. Выращивание инокулюма осуществляли в трех колбах по 150 мл на качалке на основной среде ферментации, при 30 °С и 180 об/мин. Суточный посевной материал снимали и сливали в боксе под пламенем в одну колбу с отростком для последующего посева в ферментер.

**Процесс культивирования.** В ферментационную емкость 1 загружается питательная среда объемом 2 л и посевной материал; данный объем среды является оптимальным для требуемого режима перемешивания и аэрации. Обе ферментационные емкости заполнены связывающими КЖ элементами – кольцами Рашига (высота кольца равна его диаметру). Ход и параметры процесса отражены в табл. 1. В соответствии с процедурой управления культуральная жидкость перетекает поочередно из одного ферментера в другой, при этом на кольцах Рашига осаждается часть жидкости, которая аэрируется сжатым воздухом. Частота смены фаз на кольцах Рашига в цикле перетока культуральной жидкости определяет скорость массообмена по кислороду.

**Таблица 1**

**Культивирование *B.subtilis* в отъемно-доливном режиме**

Культивирование *B.subtilis* в отъемно-доливном режиме. Ферментер: 2x2 л пневмоприводной, активная поверхность сетка или фторопластовые кольца: насыпной объем 50 % от объема ферментера.

Пит. среда:

- зерно пшеницы мыть в холодной водопроводной воде до просветления смывной воды. Сушить.

- размолоть на крупорушке до самой крупной фракции 0.2-0.4 мм.

Окончание табл. 1

<p>- размол 200 г залить 3-4 л холодной водопроводной воды в бутылку                  - разогреть паром и варить 20-30 мин.; объем среды довести до 5.5 -6.0 л.                  - Отвар фильтровать через сито (0.7)                  - в фильтрат внести 50 г/5 л мела – CaCO<sub>3</sub>; тщательно перемешать                  - взять 600 мл на приготовление инокулята.                  Инокулят: Три колбы по 150 мл, слитые в одну, рН – 6.5, титр <math>8 \times 10^8</math> клеток в 1 мл КЖ.</p>				
Время	Операция	рН	Титр	Примечание
Начало роста	1.Посев 9-30, Инокулюм 600 мл с Титром $8 \times 10^8$ 2. Расход воздуха на подачу 15 л/мин	6.0	Посевная доза в ферментере, титр: $T = 8 \times 10^8 / 2600 = 3 \times 10^6$	1.Объем ферментера начальный =2600 мл 2. Температура культивирования 37°C
24 часа	Отбор пробы в 10-00	6.0	$T = 2.3 \times 10^8$	
48 часов	Отбор пробы в 10-00 Слив 1.5 л КЖ	6.0	$T = 2.0 \times 10^8$	
72 часа	Отбор пробы в 9-00 Долив среды до $2 \times V_{\phi}$	6.5	$T = 0.7 \times 10^8$	
96 часов	Слив КЖ полностью («Инокулят» на кольцах и стенках), долив среды	7.0		
120 часов	Процесс в норме			
144 часа	Слив/долив	7.0	$T = 1.2 \times 10^8$	
168 часов	Слив/долив	7.0	$T = 1.0 \times 10^8$	
192 часа	Слив	7.0	$T = 1.0 \times 10^8$	Процесс окончен
			Титр подсчитывали по формуле: $T = 4Rm \times 10^6$ R-разведение, m – среднее число клеток в одном малом квадрате	

**Расчет квоты слива в режиме отъема-долива и периода восстановления биомассы:**

Физиологически предельная концентрация биомассы -  $X_{t_2}$ , текущая концентрация биомассы связаны с ростовым периодом  $t_2$  -  $t_1$  (периодом

восстановления) и удельной скоростью роста -  $\mu$ , следующим соотношением:

$$t = \ln(X(t_2)/X(t_1)) / \mu \quad (1)$$

Для удобства эксперимента (*обслуживание процесса один раз в сутки – утром*) слив КЖ осуществляли «овернайт» в количестве исходного объема КЖ, т.е. в слив уходила практически вся суточная биомасса, а в ферментационной емкости оставалась биомасса ниже посевной дозы – то, что осаждалось на кольцах (матрикс), величина по титру около  $0,3(1) \times 10^6$ . При этом через сутки концентрация перед сливом достигала  $2,3 \times 10^8$  (см. табл. 1). В соответствии с этими данными при удельной скорости (0.25-0.3) 1/час рассчитывали период восстановления биомассы от  $X(t_1)$  до  $X(t_2)$  по формуле (1) :  $\ln(230/0.5) / 0.25 = 24.52$  часа.

Таким образом, микробиологический процесс укладывается в рамки классической экспоненциальной модели роста, что говорит о правильности выбранных методик и возможности потенциального масштабирования процесса.

**Получение модельной формы препарата.** Взяли 1 литр КЖ и перенесли на носитель: 0.7 л размола пшеничного зерна и перемешали на специальном поддоне; сушили при комнатной температуре. Одновременно с сушкой происходил рост бактерий по типу твердофазной ферментации. Высушенный препарат размолоти до фракции аналогичной исходному размолу зерна; распаковали в полипропиленовые банки.

**Контроль активности.** Одним из показателем качества препарата является длительность его активности, которая выражается в сохранении спор бактерий способных к прорастанию. Анализ активности спор проводили методом определения колониеобразующих единиц (КОЕ). Для этого брали 1 г препарата, которой хранился при комнатной температуре или в холодильнике, и разводили в 50 мл водопроводной воды и 1 мл суспензии через разведение высевали на чашки с МПА, затем подсчитывали колонии и определяли титр жизнеспособных спор. Результаты свели в табл. 2.

Таблица 2

*Анализ активности спор*

Дата определения КОЕжизнеспособных спор	Концентрация жизнеспособных спор в 1 грамме препарата
08-12 - 2010	$6,5 \times 10^7$
14 - 01 - 2011	$5,0 \times 10^7$
20- 01 - 2012	$1,5 \times 10^7$



### Результаты и обсуждение

В данной работе продемонстрированы результаты исследований по использованию пневмоприводных биореакторов и получение биопрепарата в рамках смоделированной в лабораторных условиях безотходной технологии.

Ферментационная система, основанная на периодической смене межфазного пространства для бактериальной культуры и состоящая из двух горизонтально расположенных емкостей, показала хорошие массообменные характеристики, которые оценивались по выходу биомассы. Выходы биомассы в биореакторе были сопоставимы с «колбочными» вариантами культивирования строгих аэробов, какими являются бактерии *Bacillus subtilis*. Применение кислородных электродов в данной система затруднено из-за того, что *переменное давление* в емкостях и *периодическое удаление жидкой фазы* из реакционной емкости проводит к некорректным измерениям парциального давления кислорода, поэтому массообменные характеристики получили оценку на основе интегральных показателей выхода *биомассы*.

Другим важным аспектом применения пневмоприводных биореакторов является их экономичность по механическому приводу и расходу сжатого воздуха, а также решение проблемы статического давления при горизонтальном расположении ферментационных емкостей. Все эти позитивные факторы, заложенные в конструкционные элементы ферментационной системы привели к тому, что было проведено восемь ростовых циклов в режиме отъема-долива биомассы. Практически это означает, что было воспроизведено *восемь периодических процессов в одном технологическом цикле!*

Одним из самых важных результатов - моделирование в данном процессе безотходной технологии получения пробиотика ветеринарного назначения. Тема применения пробиотиков в ветеринарии и медицине в плане «*антибиотикозамещения*» достаточно актуальна как у нас в стране, так и за рубежом. Англичане К.А. Дей и Дж. Лисански показали, что при транспортном стрессе у свиней компенсаторная доза пробиотических лактобацилл оценивается как  $10^8 - 10^9$  в день [6]. Существуют основания полагать, что для спорообразующих бактерий эффективная лечебная доза также находится в этих пределах. Полученный нами на основе зернового материала пробиотик имеет сопоставимые параметры по лечебной дозе, а также имеет высокие показатели качества при хранении. Вариант предложенной технологии вполне вероятно может иметь далеко идущие последствия в принципе безотходности, как переносе «продукта» на носитель.

### Выводы

Процессе культивирования бактерий *Bacillus subtilis* в пневмоприводном биореакторе показал хорошую воспроизводимость выхода по биомассе нескольких ростовых циклов в отъемно-доливном режиме. Реализована модель безотходной технологии получения пробиотика на основе культуры спорогенной бактерии. Применение пробиотических препаратов в будущем, вероятно, приведет к отказу от массового применения антибиотиков в животноводстве.

### Список литературы

1. Похиленко В.Д., Перельгин В.В. Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их безопасность // Химическая и биологическая безопасность. 2007. №2-32. С.20-41.
2. Зубарева И.М., Федорова И.С., Зубова А.В. Разработка глубинных питательных сред в производстве биоспорина // Вопросы химии и химической технологии. 2004. №1. С.85-88.
3. Полезная модель 69518. Аппарат для культивирования клеток и микроорганизмов / Ю.В. Редикульцев, В.К. Кудряшов, В.С. Голиченков. Оpub. 27.12.2007. МПК: С12М3/00.
4. ФГБУН Институт биологического приборостроения Российской Академии Наук [Электронный ресурс] // [сайт]. URL: [http://www.ibpran.ru/units/nauchno-issledovatel'skie\\_podrazdeleniya/otdel\\_razrabotki\\_eksperimentalnoy\\_apparatury\\_i\\_programmnogo\\_obespecheniya/](http://www.ibpran.ru/units/nauchno-issledovatel'skie_podrazdeleniya/otdel_razrabotki_eksperimentalnoy_apparatury_i_programmnogo_obespecheniya/)
5. Семенов С.М. Лабораторные среды для актиномицетов и грибов. Справочник. М.: Агропромиздат, 1990. 240 с.
6. Форстер К.Ф., Дж. Вейз Д.А. Экологическая биотехнология / под ред. К.Ф. Форстера, Д.А. Дж. Вейза. Л.: Химия, 1990. Пер. изд.: Великобритания, 1987. 384 с.

*Ширишков Николай Васильевич* [biotec2016@yandex.ru](mailto:biotec2016@yandex.ru)), ведущий биотехнолог  
*Ширишков Николай Васильевич*, ведущий биотехнолог, [biotec2016@yandex.ru](mailto:biotec2016@yandex.ru), Россия,  
Пушино, Институт биологического приборостроения РАН,

*Редикульцев Юрий Васильевич*, руководитель группы, [bio\\_2016@yandex.ru](mailto:bio_2016@yandex.ru)  
Россия, Пушино, Институт биологического приборостроения РАН,

*Музафаров Евгений Назибович*, д-р биол.наук, проф., зав. кафедрой биологии,  
[enmuzafarov@mail.ru](mailto:enmuzafarov@mail.ru), Россия, Тула, Тульский государственный университет,

*Гаврилов Анатолий Брониславович*, руководитель отдела, [bio\\_2016@yandex.ru](mailto:bio_2016@yandex.ru)  
Россия, Пушино, Институт биологического приборостроения РАН,

*Шевелев Дмитрий Алексеевич*, ведущий программист, [bio\\_2016@yandex.ru](mailto:bio_2016@yandex.ru)  
Россия, Пушино, Институт биологического приборостроения РАН

## CULTIVATION OF BACILLUS SUBTILIS IN THE STRUCTURE OF NON-WASTE TECHNOLOGY OF PROBIOTIC VETERINARY DRUG

*N.V.Shirshikov, Y. V. Redikultsev, E.N.Muzafarov, A.B.Gavrilov, D.A. Shevelev*

*The article discusses the aseptic culturing sporogenous bacteria in submerged culture for cell suspension used for the development of probiotic veterinary drug. Developed elements without waste biotechnology cultivation of microorganisms with the use of culture media on the basis of grain material. Use of the milled wheat grain at the stage of preparation of the nutrient medium, and the step of preparing the drug reduces to a minimum flow rate of the aqueous phase, which is the basis of disposability within microbiological process. The problems of the use of probiotics as an alternative to medical drugs, massively used in poultry and livestock. We also consider the organization of microbial cultivation system based on pneumatically fermenters.*

*Keywords: probiotics, bacteria cultivation, waste-free biotechnology, cereal material, pneumatically bioreactor.*

*Shirshikov Nikolas Vasilevich, lead biotechnologist, [biotec2016@yandex.ru](mailto:biotec2016@yandex.ru), Russia, Pushchino, Institute for Biological Instrumentation Russian Academy of Sciences,*

*Redikultsev Yuri Vasilevich, head of group, department of biotechnology, [bio\\_2016@yandex.ru](mailto:bio_2016@yandex.ru), Russia, Pushchino, Institute for Biological Instrumentation Russian Academy of Sciences,*

*Muzafarov Evgeni Nazibovich, doctor of biology science, professor, manager katedra, [enmuzafarov@mail.ru](mailto:enmuzafarov@mail.ru), Russia, Tula, Tula state University,*

*Gavrilov Anatoly Bronislavovich, head of department, [bio\\_2016@yandex.ru](mailto:bio_2016@yandex.ru), Russia, Pushchino, Institute for Biological Instrumentation Russian Academy of Sciences,*

*Shevelev Dmitri Alexeyevich, lead programmer, [bio\\_2016@yandex.ru](mailto:bio_2016@yandex.ru), Russia, Pushchino, Institute for Biological Instrumentation Russian Academy of Sciences*

УДК 581.5:581.9

## **ПРОЕКТИРОВАНИЕ РЕГИОНАЛЬНОЙ МОНИТОРИНГОВОЙ СЕТИ ДЛЯ КОНТРОЛЯ ЗА ВНЕДРЕНИЕМ И РАССЕЛЕНИЕМ ИНВАЗИОННЫХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ**

Ю.М. Мартынюк, Л.В. Хорун

*Изложены подходы к формированию региональной мониторинговой сети для контроля за внедрением и расселением инвазионных видов растений и представлению результатов мониторинга в виде электронного сетевого ресурса (сайта) на примере Тульской области.*

*Ключевые слова. Инвазионные виды растений, расселение чужеродных видов растений, мониторинг, сетевой информационный ресурс, базы данных*

Раннее обнаружение и предотвращение воздействия видов-инвайдеров на экосистемы и здоровье человека является фундаментальным требованием стратегии ЕЭС по сохранению биоразнообразия в Европе до 2010 года и далее. Однако при отсутствии надежных региональных исследований и системы демонстрации их результатов многие европейские государства не способны заняться этой проблемой в стратегическом плане. Экономический ущерб, наносимый видами-инвайдерами экономике, здоровью населения огромен. В 2002 году принята Стратегия по инвазионным видам Европы [1]. Она включает три последовательных и взаимосвязанных комплекса мер, направленных на прогнозирование появления и скорости расселения видов-инвайдеров по территориям, обеспечение внутри- и межрегионального мониторинга за ходом этого процесса; обеспечение реализации научно-обоснованных и экономически оправданных мероприятий по контролю за отдельными видами.

Разработка и реализация на национальном уровне системы мероприятий по предотвращению неконтролируемого распространения чужеродных видов и ликвидации его последствий отнесена к приоритетным направлениям деятельности по обеспечению экологической безопасности в рамках экологической доктрины РФ (одобрена распоряжением Правительства РФ от 31 августа 2002 г. № 1225-р) [2].

В России пока недостаточно развито информационное обеспечение мониторинга инвазионных видов. Созданы 2-3 базы данных по всем группам организмов (для сравнения: в США только по инвазионным растениям созданы 34 базы данных) [3]. Важным шагом в этом направлении явилось создание проблемно-ориентированного портала «Чужеродные виды на территории России» в домене [sevin.ru](http://sevin.ru) (ИПЭЭ РАН) [4]. Однако наличие информационной системы национального масштаба

не означает ни в коей мере, что не должно быть сети интернет-ресурсов регионального уровня.

В регионах России, в том числе и в Тульской области, эффективному контролю за инвазиями чужеродных видов растений препятствуют следующие обстоятельства: отсутствие эффективно налаженного регионального мониторинга заносимых видов с достаточно частыми интервалами; отсутствие средств информирования населения и хозяйственных структур; отсутствие возможности для правильной идентификации находок вследствие отсутствия информации; отсутствие объективных возможностей для прогнозирования проникновения и распространения инвазионных видов по территориям регионов.

Таким образом, столь масштабная проблема должна решаться не только нисходящим путем – от центра к регионам, но и восходящим – от регионов к центру. Вследствие значительных размеров России, включающей разные климатические и природные зоны, состав региональных фракций инвазионных видов существенно отличается. Особенности физико-географических условий, хозяйственно-экономического и культурно-исторического развития регионов определяет разные флорогенетические и инвазионные статусы одних и тех же видов [5]. Подходы к оценке их роли в составе флор, прогнозы относительно дальнейшего расселения и меры контроля также могут существенно различаться. Поэтому региональные сайты могут выполнять важную роль сбора и анализа местной мониторинговой информации и представления ее на межрегиональном и национальном уровнях. Это позволит существенно уточнить реальную картину расселения и продвижения реализовавшихся и потенциальных инвайдеров как внутри регионов, так и между ними.

Осознание актуальности и необходимости создания региональной мониторинговой сети для контроля за внедрением и расселением инвазионных видов растений, а также анализ существующих отечественных и зарубежных разработок подобного назначения определяют структуру и компоненты разрабатываемого сетевого ресурса и позволяют выделить и описать его основные функции.

Основным компонентом региональной мониторинговой сети по контролю за внедрением и расселением инвазионных видов растений является сетевая база данных, включающая перечень инвазионных и потенциально инвазионных видов растений. В базе предусматривается возможность описания биологических особенностей растения, его систематических признаков, сведений о происхождении и расселении в России и в мире, а также наличие фотографии растения хорошего качества и ссылок на цифровые гербарные источники с целью его возможной точной идентификации. Существенной особенностью структуры базы должно стать наличие информации в ней о возможных и наиболее эффективных мерах контроля за внедрением и расселением инвайдеров, а

также связь с картами расселения для каждого вида с возможностью их пополнения. Предлагаемая модель сетевого ресурса определяет его функционал в условиях информационного общества.

Термин «информационное общество» рассматривается по отношению к сообществам, в которых существует легкий доступ к информации и знанию, ведущий к устойчивому и равноправному росту и прогрессу. В таком сообществе каждый извещен о настоящем положении дел, у каждого есть возможность сделать свой голос услышанным. Традиционно, источниками пополнения баз данных по биоразнообразию служат собственные исследования авторов, литературные и гербарные материалы. Однако, площади российских регионов и количество специалистов, занимающихся инвазионными видами, выдвигают на первых план необходимость поиска новых способов сбора и обмена информацией. Нормой должны стать контакты между всеми заинтересованными сторонами в решении означенной проблемы: учеными, государственными и региональными организациями и структурами, широкими слоями населения. В этой связи мониторинговая сеть выполняет две основные функции: информирование о проблеме и путях ее решения, а также поддержание диалога между всеми участниками решения проблемы. С таких позиций можно рассматривать информационный ресурс как электронный источник информации, ориентированный на достаточно широкий круг пользователей, не ограниченный спецификой обрабатываемых данных, т.к. проблемы окружающей среды, экологии, разумного природопользования не могут быть уделом избранных.

Без сомнения, третья основная функция мониторинговой сети – это сбор больших объемов данных по рассматриваемой проблеме. В век цифровых технологий для получения достаточно четкой фотографии растения с пометкой на карте места его нахождения нужно не более пяти минут. Поэтому пополнение сетевого ресурса новыми данными превращается из сложной и трудоемкой операции в увлекательную игру, в которой найдутся роли и специалисту, и любителю.

Реализация означенных функций будет проходить наиболее эффективно, если разрабатываемый ресурс опирается на положительный опыт использования всего многообразия современных информационно-коммуникационных технологий: социальные сети, облачные технологии, мобильная связь и т.п. Например, создание группы соответствующей направленности в социальных сетях позволяет не только оперативно обмениваться актуальной информацией, но и приглашать к диалогу все новых и новых собеседников, расширяя тем самым круг заинтересованных лиц. Хранение и обработка собранных данных в облаке не только снимет ограничения на объем, но и сделает их доступными с любого устройства, подключенного к сети. Передача данных по каналам мобильной связи существенно упростит процедуру сбора новых данных.

Открытость мониторинговой сети в части наполнения и обратной связи позволит максимально эффективно собрать и обработать информацию на региональном уровне с целью дальнейшего пополнения и обновления национальной базы данных, определяющей динамику флорогенетических процессов на территории Российской Федерации.

В самое последнее время в российском информационном поле появилось еще одно направление – создание «Черных книг», в которых представлена информация о составе инвазионной фракции флоры описываемой территории. В 2010 году была издана «Черная книга флоры Средней России» [5], а в 2011 г. «Черная книга флоры Тверской области» [6]. Это фундаментальные работы, в которых собрана обширная информация, накопленная в результате многолетних исследований. Издания играют важную роль в консолидации научного знания, однако подготовка и выпуск книг требует значительного времени, а информация на сайте может обновляться постоянно и следовать за изменениями реальной картины расселения видов. К сожалению, в регионах России не отлажен механизм подсчета прямого и косвенного ущерба, связанного с влиянием инвазионных видов на экосистемы, здоровье людей и безопасность продуктов питания. Исчерпывающие данные о воздействии на экологию и экономику существуют в базе данных DAISIE только для тех стран (Латвия, Литва и Великобритания) где, как считается, около 20 % натурализовавшихся видов оказывают подобное влияние. Наилучшие данные имеются в Швейцарии, где из 97 натурализовавшихся видов 50 оказывают влияние на экологию и экономику [5]. База данных, накопленная в исследованиях и представленная на сайте, будет являться необходимой материальной основой и для такого рода работ. Прогнозирование и мониторинг появления и расселения инвазионных и потенциально инвазионных видов является средством экономии ресурсов, которые впоследствии могут быть потрачены на борьбу с уже расселившимися видами. Кроме того, учет местных особенностей сформированности вторичного ареала, биологических особенностей видов и широты их расселения даст возможность рекомендовать наиболее экономически оправданные способы контроля за этими видами. Сайт может также выполнять роль социальной рекламы, повышая экологическую грамотность населения в этой области и способствуя искоренению опасных, но не массово расселившихся видов, сконцентрированных на дачных участках, в цветниках, на газонах, во дворах.

Ранее мы уже обращались к проблеме временной динамики флор. Нами сделаны две работы, демонстрирующие временные срезы формирования адвентивной флоры Тульской области, в том числе расселения инвазионных видов: адвентивная флора Тульской и Конспект флоры сосудистых растений Тульской области [7]. Дополнены подходы к

методике оценки скорости и хода инвазионного процесса в историческом аспекте за последние 200 лет на примере флоры Тульской области [8] и составлена база данных исторической динамики адвентивной флоры Тульской области, которая демонстрирует изменение инвазионного статуса видов на протяжении двух веков. Ведутся исследования в области поиска подходов к прогнозированию возможности перехода вида, попавшего в регион, в статус инвазионного [9].

Разработка, апробация и презентация регионального подхода к прогнозированию появления и расселения инвазионных видов растений, мониторингу инвазионных и потенциально инвазионных видов, информационная поддержка мер контроля должна включать ряд последовательных шагов, а именно:

1. Выявление состава инвазионных и потенциально инвазионных видов растений, зафиксированных на территории Тульской области;

2. Распределение их по степени инвазионной опасности (статус 1-4), учитывая сложившиеся в последнее время подходы в науке [5,6];

3. Подбор, структурирование и адаптация научной информации для размещения ее на сайте. Для каждого вида на отдельной странице сайта следует представить название, таксономическую принадлежность, морфологическое описание, распространение в России и регионе, историю обнаружения и расселения в регионе, степень сформированности вторичного ареала, биологические и экологические особенности вида, пути и способы заноса, практическое применение (при наличии), меры борьбы. Необходимо кратко показать расселение вида в сопредельных регионах.

4. Подбор качественных авторских иллюстраций, демонстрирующих систематические признаки вида и его присутствие в экосистемах региона;

5. Представление карты-схемы региона, на которой обозначена выявленная на сегодняшний день картина расселения вида методом сеточного картирования;

6. Проверка через форум сайта возможности интерактивного взаимодействия с населением региона и сбора дополнительных мониторинговых сведений о появлении и расселении наиболее агрессивных видов, имеющих статус 1. Эти сведения должны проверяться на достоверность, а затем вноситься на карты-схемы и ежегодно архивироваться с целью отслеживания динамики расселения видов;

7. Организация научно-просветительской информационной поддержки мер контроля за видами, которые потенциально очень опасны, но пока находятся в регионе на периферии вторичного ареала и могут быть уничтожены в первичных очагах работниками РЖД, дорожных служб, ЖКХ, садоводами;



8. Включение предупреждающей информации о возможности появления в регионе новых инвайдеров, обнаруженных на территории России и вблизи границ региона;

9. Разработка рекомендаций для хозяйственных структур по применению научно-обоснованных мер контроля за агрессивными и расселяющимися видами.

Таким образом, предполагаемый сетевой ресурс будет выполнять информационную функцию в решении проблемы прогнозирования появления новых инвайдеров, мониторинга расселения уже внедрившихся и обеспечении мер контроля. Кроме того, сайт будет способствовать повышению экологической грамотности населения региона, привлечения к проблеме заинтересованных структур и широкого круга общественности, координации усилий в этой области внутри региона и между регионами.

### Список литературы

1. European strategy on invasive alien species // European Network on Invasive Alien Species. Regional Portal on Invasive Alien Species: [Электронный ресурс] / сост.: P. Genoversi, C. Shine. 2003. URL: [http://www.nobanis.org/files/eu.\\_stratgy\\_inva.pdf](http://www.nobanis.org/files/eu._stratgy_inva.pdf). (дата обращения 22.03.2016).

2. Экологическая доктрина РФ [Электронный ресурс]: одобрена распоряжением правительства РФ от 31 августа 2002 г. № 1225-р / URL: <http://www.scrf.gov.ru/documents/24.html> (дата обращения 22.03.2016).

3. Invasive plant species // Center for Plant Conservation. National Headquarters: [Электронный ресурс: база данных] / URL: <http://www.centerforplantconservation.org> (дата обращения 22.03.2016).

4. Чужеродные виды на территории России: [Электронный ресурс: база данных] / ИПЭЭ РАН [Москва, 2010]. URL: <http://www.sevin.ru/invasive> (дата обращения 22.03.2016).

5. Виноградова Ю.К., Майоров С.Р., Хорун Л.В. Черная книга флоры Средней России: чужеродные виды растений в экосистемах Средней России. М.: ГЕОС, 2010. 512 с.

6. Виноградова Ю.К., Майоров С.Р., Нотов А.А. Черная книга флоры Тверской области: чужеродные виды в экосистемах Тверского региона. М.: КМК, 2011. 279 с.

7. Шереметьева И.С., Хорун Л.В., Щербаков А.В. Конспект флоры сосудистых растений Тульской области / под ред. В.С. Новикова. М.: Изд. Бот. сада Моск. ун-та; Тула: Гриф и К, 2008. 274 с.

8. Хорун Л.В., Захаров В.Г., Соколов Д.Д. Количественная оценка динамики адвентивной флоры (на примере Тульской области) // Журнал общей биологии. Т. 67. № 4. 2006. С. 298-310.

9. Хорун Л.В. О возможностях определения степени отсроченности инвазионной опасности заносных видов растений // Российский журнал биологических инвазий. № 3. 2011. С. 89-104.

*Хорун Людмила Владимировна, канд. биол. наук, доц., [khoroon@mail.ru](mailto:khoroon@mail.ru), Россия, Тула, Тульский государственный педагогический университет им. Л.Н. Толстого,  
Мартынюк Юлия Михайловна, канд. пед. наук, доц., [juliamart@ya.ru](mailto:juliamart@ya.ru), Россия, Тула, Тульский государственный педагогический университет им. Л.Н. Толстого*

## DESIGNING OF THE REGIONAL MONITORING NETWORK FOR CONTROL OF INTRODUCTION AND MOVING OF INVASIVE SPECIES OF PLANTS

*J.M. Martyniuk, L. V. Khoroon*

*Summary. In work approaches to formation of a regional monitoring network for control of introduction and moving of invasive species of plants and to representation of results of monitoring in the form of an electronic network resource (website) on the example of Tula region are stated.*

*Keywords. Invasive species of plants, moving of alien species of plants, monitoring, network information resource, databases.*

*Khoroon Lyidmila Vladimirovna, candidate of biological sciences, docent, [khoroon@mail.ru](mailto:khoroon@mail.ru), Russia, Tula, Tolstoy Tula State Pedagogical University,  
Martyniuk Julia Mikhajlovna, candidate of pedagogical sciences, docent, [juliamart@ya.ru](mailto:juliamart@ya.ru), Russia, Tula, Tolstoy Tula State Pedagogical University*

УДК: 612.13

## **КОНТРОЛЬ ДЫХАНИЯ КАК ФАКТОР МОДУЛЯЦИИ КОЛЕБАНИЙ МИКРОЦИРКУЛЯТОРНОГО КРОВОТОКА КОЖИ ЧЕЛОВЕКА**

Г.В.Красников, Д.Ю.Ефимова, М.Й.Тюрина, Т.Н.Коняева,  
И.В.Красникова, Г.М.Пискунова

*Цель работы – оценка значимости произвольного компонента регуляции дыхания в формировании модуляции периферического кровотока. Проведено сравнительное исследование произвольно контролируемого дыхания на ритмическую структуру кровотока кожи. Показано достоверное снижение амплитуды колебаний кровотока кожи пальца в условиях контролируемого дыхания по синусоидальному профилю в диапазонах эндотелий-зависимой, нейрогенной, миогенной и респираторно-зависимой активности по сравнению со спонтанным дыханием (в 1.7, 1.6, 1.7, и 1.3 раза соответственно). Полученные данные демонстрируют, что произвольный контроль дыхания может выступать как фактор модуляции микроциркуляторного кровотока через влияние на уровень активности симпатической регуляции сосудистого тонуса.*

*Ключевые слова: микроциркуляция, лазерная доплеровская флоуметрия, вариабельность сердечного ритма, колебания кровотока, спектральный анализ.*

С современных позиций кортико-висцеральные отношения рассматриваются как механизмы модуляции корой больших полушарий деятельности подкорковых структур, имеющих непосредственное отношение к регуляции внутренней среды организма [1-4]. В основе кортико-висцеральных связей в сердечно-сосудистой системе может лежать функциональное взаимодействие осцилляторной активности мозга с волновыми модуляторами на уровне центрального и периферического кровотока [5, 6]. Ведущим условием в этом случае выступает произвольная активность и/или осознаваемость воздействия (сенсо-моторное внимание, мышечная активность, ментальная нагрузка и т.п.). Известно, что влияния коры больших полушарий на сердечно-сосудистую систему могут проявляться в форме «центральной команды» [7, 8]. В этой связи мы предполагаем, что кора больших полушарий может участвовать в частотно-зависимой вегетативной регуляции периферического кровотока и являться фактором формирования колебаний кровотока на уровне системы микроциркуляции. Наиболее «удобной» физиологической функцией для исследования механизмов влияния коры больших полушарий на ритмическую структуру колебаний кровотока, по-нашему мнению, является дыхание. Регуляция дыхания является многоуровневой и включает в себя, помимо автономного контура, возможность произвольного изменения параметров дыхания. Используя управляемое дыхание с изменяемыми параметрами частоты, глубины и паттерна, мы предполагаем оценить вклад произвольного контура регуляции дыхания в

формирование респираторных колебаний периферического кровотока и соответствующие возможности биоуправления кровотоком. Многочисленные исследования демонстрируют, что произвольная активность различного характера вызывает изменения осцилляторных процессов как на центральном, так и на периферическом уровнях сердечно-сосудистой системы [5, 9-15]. Цель данного исследования – оценка значимости произвольного компонента регуляции дыхания в формировании модуляции периферического кровотока.

### **Материалы и методы исследования**

Исследование проведено на группе из 11 практически здоровых девушек-добровольцев 18-25-летнего возраста. В ходе эксперимента осуществляли синхронную регистрацию экскурсии грудной клетки, сердечного ритма и колебаний микроциркуляторного кровотока кожи испытуемых. Для регистрации дыхания использовали ленточный потенциометрический грудной датчик собственной конструкции. Аналоговый сигнал датчика оцифровывали частотой дискретизации 10 Гц (АЦП Е154, L-Card, Россия) и демонстрировали на мониторе персонального компьютера. Испытуемые, управляя глубиной и частотой дыхания, визуально совмещали показания пневмографического датчика (собственную кривую дыхания) с эталонной кривой, демонстрируемой на мониторе. Регистрацию ритма сердца осуществляли на основе электрокардиографии с использованием компьютерного электрокардиографа «ВНС-Микро» («Нейрософт», Россия). Регистрацию уровня микроциркуляторного кровотока кожи осуществляли посредством двухканального лазерного доплеровского флоуметра ЛАКК-02 (ЛАЗМА, Россия). Для оценки роли симпатической нервной системы исследование микроциркуляторного кровотока кожи проведено в двух зонах с различной выраженностью симпатической иннервации: на ладонной поверхности ногтевой фаланги указательного пальца – зоне с высокой плотностью симпатической иннервации и на наружной поверхности предплечья вблизи лучезапястного сустава левой руки – зоне с низкой плотностью симпатической иннервации. Регистрируемый параметр – показатель микроциркуляции (ПМ) – характеризует степень перфузии ткани кровью и измеряется в условных (перфузионных) единицах (пф.ед.). Частота дискретизации ЛДФграммы составляла 16 Гц. Спектральный анализ исследуемых сигналов осуществляли на основе оригинальных алгоритмов непрерывного адаптивного вейвлет-преобразования [16-18].

Для каждого испытуемого было проведено три последовательных 5-минутных регистрации указанных сигналов при следующих условиях:

1. При спонтанном дыхании в условиях физического и психического покоя без акцентирования внимания на дыхании.

2. При контролируемом дыхании в режиме воспроизведения индивидуального паттерна спонтанного дыхания, записанного на предыдущем этапе. В этом случае испытуемый дышал в привычном для себя режиме, но при этом присутствовал некоторый уровень произвольного контроля дыхания.

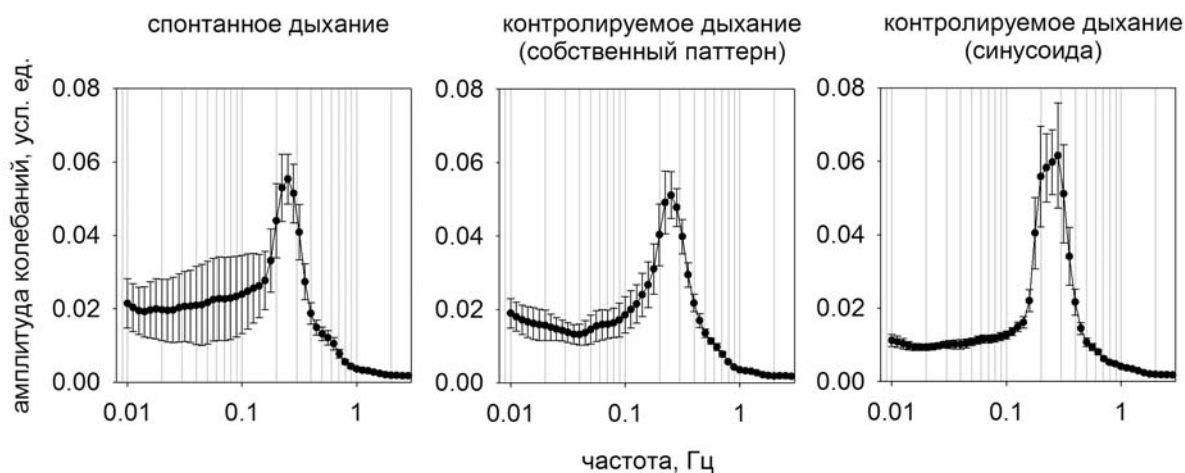
3. При контролируемом дыхании в режиме синхронизации с эталонной синусоидальной кривой с параметрами, соответствующими средней частоте и амплитуде спонтанного дыхания испытуемого. В этих условиях параметры вентиляции легких будут соответствовать спонтанному дыханию испытуемого, однако уровень произвольного контроля дыхания со стороны коры больших полушарий будет существенно выше, чем в предыдущих условиях.

Таким образом, анализируя амплитудно-частотные характеристики ритмической структуры колебаний микроциркуляторного кровотока при различных уровнях произвольного контроля дыхания, мы предполагали выявить регулирующие влияния, опосредованные активностью коры больших полушарий.

В связи с тем, что распределение значений некоторых выборок данных не являлось нормальным (критерий Шапиро–Уилка), для анализа достоверности различий использовали непараметрический однофакторный дисперсионный анализ для повторных измерений (критерий Фридмана), с последующим множественным попарным сравнением по критерию Даннета. Статистически значимыми считались различия при  $p < 0.05$ . Данные в таблицах и на графиках представлены в виде средних значений и стандартной ошибки.

### Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены усредненные амплитудные спектры пневмограмм испытуемых. Показано, что в режимах спонтанного и контролируемого дыхания значения пиковой частоты и амплитуды достоверно не различаются. Это свидетельствует об успешном контроле участниками исследования частоты и глубины задаваемого профиля дыхания и соответствии параметров вентиляции легких для спонтанного и контролируемого дыхания в наших экспериментах. Необходимо отметить, что в условиях контролируемого дыхания (в особенности для дыхания по синусоидальному профилю) наблюдается большая регулярность дыхания по сравнению со спонтанным дыханием, на что указывает значимо меньшая амплитуда низкочастотных колебаний.



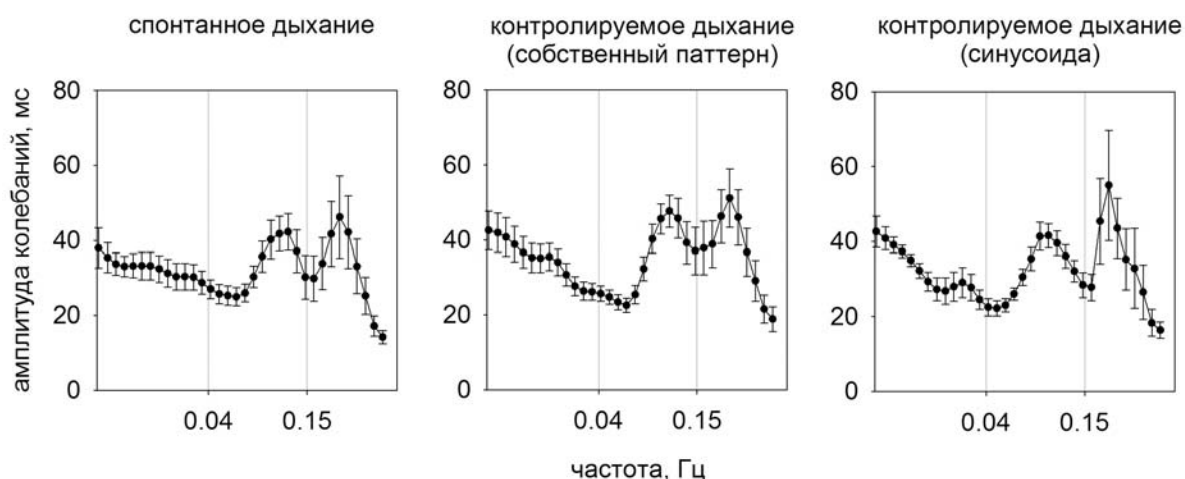
**Рис. 1. Усредненные амплитудные спектры пневмограмм при различных условиях дыхания**

На рис. 2 представлены усреднённые амплитудные спектры variability сердечного ритма испытуемых. Показано, что используемые режимы контроля дыхания не вызывают значимых изменений структуры сердечного ритма. Также (табл. 1) в наших условиях, не выявлено значимого изменения частоты сердечных сокращений (ЧСС) и индекса вагосимпатического взаимодействия (LF/HF).

**Таблица 1**  
**ЧСС и индекса вагосимпатического взаимодействия (LF/HF) испытуемых в условиях спонтанного и контролируемого дыхания**

Параметры	Спонтанное дыхание	Контролируемое дыхание (собственный паттерн)	Контролируемое дыхание (синусоида)
ЧСС, уд/мин	75.3±2.2	75.0±2.0	76.0±2.2
LF/HF	0.99±0.19	0.75±0.18	1.06±0.32

Представленные данные свидетельствуют об отсутствии значимых изменений параметров центральной гемодинамики в условиях контролируемого дыхания.



**Рис. 2. Усредненные амплитудные спектры кардиоритмограмм при различных условиях дыхания**

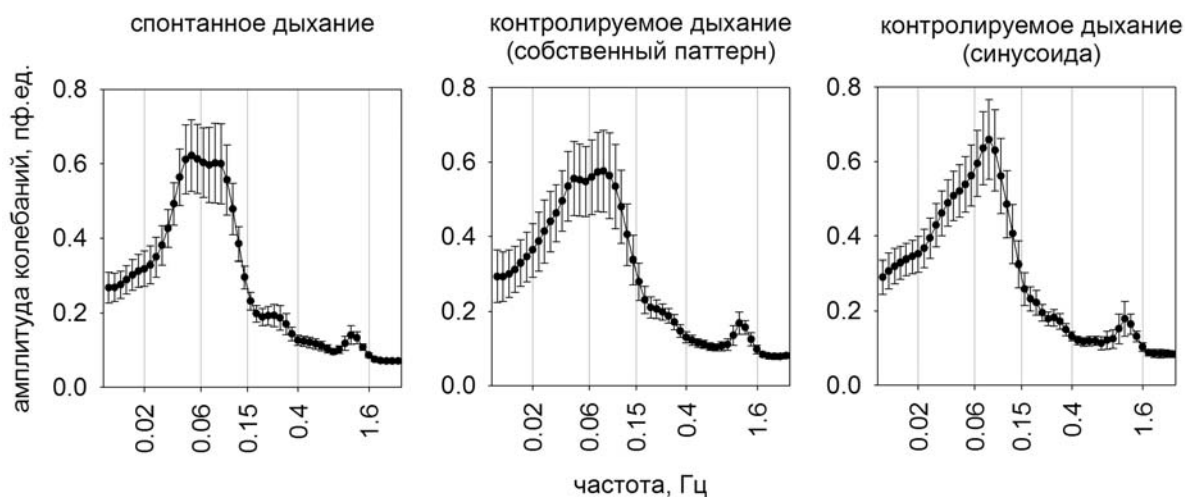
Усредненные данные базального уровня кровотока и пиковых амплитуд колебаний микроциркуляторного кровотока кожи предплечья и пальца представлены в табл. 2. На рис. 3 и 4 представлены усредненные амплитудные спектры ЛДФ-грамм испытуемых для предплечья и пальца.

**Таблица 2**

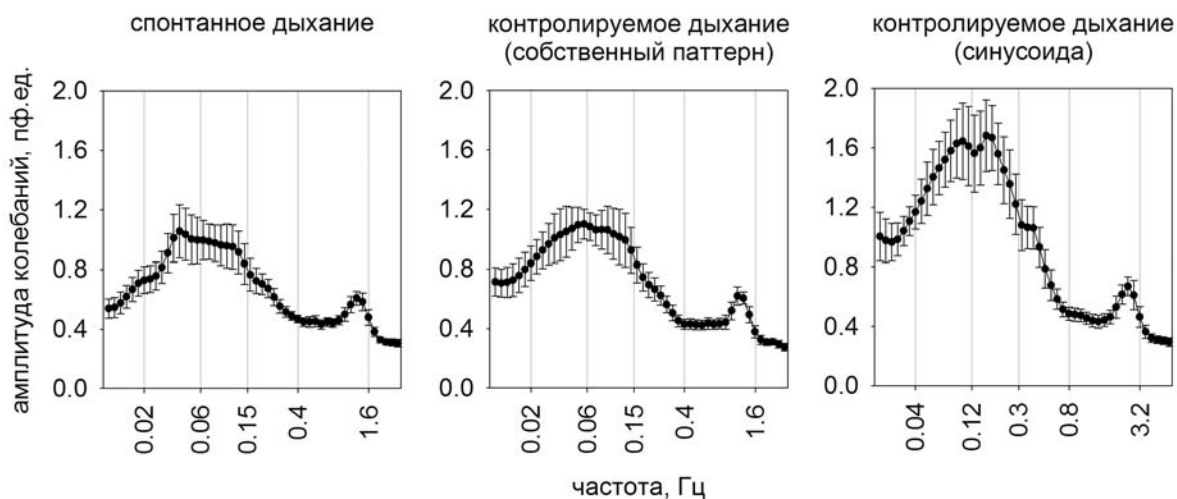
**Параметры микроциркуляторного кровотока кожи предплечья и пальца в условиях спонтанного и контролируемого дыхания**

Параметры	Предплечье			Палец		
	Спонтанное дыхание	Контролируемое дыхание (собственный паттерн)	Контролируемое дыхание (синусоида)	Спонтанное дыхание	Контролируемое дыхание (собственный паттерн)	Контролируемое дыхание (синусоида)
ПМ, пф.ед.	3.13±0.25	3.41±0.47	3.71±0.72	22.67±1.67	21.45±2.00	21.14±2.18
Ам (E), пф.ед.	0.17±0.02	0.19±0.05	0.17±0.02	0.34±0.04	0.37±0.05	0.57±0.06*
Ам (N), пф.ед.	0.32±0.05	0.30±0.06	0.26±0.04	0.55±0.09	0.50±0.05	0.89±0.15*
Ам (M), пф.ед.	0.35±0.06	0.31±0.06	0.33±0.06	0.54±0.07	0.57±0.07	0.90±0.12*
Ам (R), пф.ед.	0.11±0.02	0.11±0.01	0.13±0.01	0.35±0.04	0.32±0.04	0.46±0.07*
Ам (C), пф.ед.	0.08±0.01	0.08±0.01	0.10±0.02	0.36±0.02	0.32±0.02	0.39±0.05

Примечание: ПМ – показатель микроциркуляции. Ам – пиковая амплитуда колебаний кровотока. E, N, M, R, C – соответственно частотные диапазоны колебаний кровотока: эндотелий-зависимые (0.009-0.02 Гц), нейрогенные (0.02-0.06 Гц), миогенные (0.06-0.15 Гц), респираторно-зависимые (0.15-0.4 Гц) и пульсовые (0.6-1.5 Гц) колебания. Символом «\*» отмечены достоверные различия по сравнению со спонтанным дыханием ( $p < 0.05$ ).



**Рис. 3. Усредненные амплитудные спектры ЛДФ-граммкровотока кожи предплечья при различных условиях дыхания**



**Рис. 4. Усредненные амплитудные спектры ЛДФ-граммкровотока кожи пальца при различных условиях дыхания**

В условиях контролируемого дыхания не выявлено значимого изменения базального уровня и амплитудно-частотных характеристик колебаний кровотока кожи предплечья. Однако нами были обнаружены достоверные изменения амплитуды колебаний кровотока кожи пальца (табл. 2, рис. 4). В условиях контролируемого дыхания по



синусоидальному профилю амплитуда колебаний в диапазонах эндотелий-зависимой (0.001-0.02 Гц), нейрогенной (0.02-0.06 Гц), миогенной (0.06-0.15 Гц) и респираторно-зависимой (0.15-0.4 Гц) активности достоверно выше, чем при спонтанном дыхании (в 1.7, 1.6, 1.7, и 1.3 раза соответственно).

В данной работе предпринята попытка доказать значимость кортикальных влияний (в форме произвольно контролируемого дыхания) как фактора модуляции колебаний микроциркуляторного кровотока. Как известно, генерация дыхательных колебаний на уровне микроциркуляторного кровотока может осуществляться посредством пассивных (через динамику венозного давления) и активных (через дыхательную модуляцию тонуса симпатического отдела вегетативной нервной системы) механизмов [16, 19, 20]. Задачей исследования был подбор режима дыхания, который отличался существенной вовлеченностью коры больших полушарий, но при этом не значительно изменял параметры центральной гемодинамики и легочной вентиляции. Отсутствие значимых изменений пневмограммы и сердечного ритма демонстрирует успешность решения этой задачи и позволяет говорить, что показанные нами изменения ритмической структуры кровотока обусловлены деятельностью корковых структур. Продемонстрированное нами увеличение амплитуды колебаний кровотока в коже пальца – в зоне с высокой плотностью симпатической иннервации и отсутствие достоверных изменений в коже предплечья – зоне с относительно низкой плотностью симпатической иннервации, позволяет предположить, что основным механизмом, через который реализуется участие коры, является симпатический контроль тонуса микрососудов. Отсутствие значимых изменений амплитуды колебаний кровотока в условиях контролируемого дыхания по собственному паттерну может быть объяснено тем, что в этом случае режим дыхания был более комфортным по сравнению с дыханием по синусоидальному профилю и не требовал от испытуемых высокой степени сосредоточенности при произвольном контроле дыхания.

Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что произвольный контроль дыхания может выступать как фактор модуляции микроциркуляторного кровотока через влияние на уровень активности симпатической регуляции сосудистого тонуса.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Тульской области в рамках научного проекта 15-44-03260 р\_центр.

### **Список литературы**

1. Loewy, A. D. Forebrain nuclei involved in autonomic control // Prog. Brain Res. 1991. Vol. 87. P. 253-268.

2. Dampney R. A. L. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system // *Physiol. Rev.* 1994. Vol. 74. P. 321-363.

3. Verberne A. J., Owens N. C. Cortical modulation of the cardiovascular system // *Prog Neurobiol.* 1998. Vol. 54. №2. P. 149-168.

4. Nagai M., Hoshida S., Kario K. J. The insular cortex and cardiovascular system: a new insight into the brain-heart axis // *Am Soc Hypertens.* 2010. Vol. 4. №4. P. 174-182.

5. Данилова Н.Н., Астафьев С.В. Внимание человека как специфическая связь ритмов ЭЭГ с волновыми модулями ора мисердечногоритма. // *Журн. высш. нервн. деят.* 2000. Т. 50. вып. 5. С. 791-804.

6. Zhang J, Yu X, Xie D. Effects of mental tasks on the cardiorespiratory synchronization. *Respir Physiol Neurobiol.* 2010. Vol. 170(1). P. 91-95.

7. Vissing S. F., Scherrer U., Victor R. G. Stimulation of skin sympathetic nerve discharge by central command. Differential control of sympathetic outflow to skin and skeletal muscle during static exercise // *Circ. Res.* 1991. Vol. 69. P. 228-238.

8. Williamson J.W. The relevance of central command for the neural cardiovascular control of exercise. *Exp Physiol.* 2010. Vol.95(11). P.1043-1048.

9. Мачинская Р.И. Нейрофизиологические механизмы произвольного внимания (аналитический обзор). // *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова.* 2003. Т. 53. № 2. С. 133-150.

10. Critchley H.D. Neural mechanisms of autonomic, affective, and cognitive integration. // *J Comp Neurol.* 2005. Vol. 493. № 1. P. 154-166.

11. Vaschillo E. Characteristics of Resonance in Heart Rate Variability Stimulated by Biofeedback // *Appl Psychophysiol Biofeedback.* 2006. Vol. 31. №2. P. 129-142.

12. Tracy J., Goyal N., Flanders A. et al. Functional magnetic resonance imaging analysis of attention to one's heartbeat // *Psychosom Med.* 2007. Vol. 69. № 9. P. 952-960.

13. Bernardi L. Dynamic interactions between musical, cardiovascular, and cerebral rhythms in humans // *Circulation.* 2009. Vol. 30. P. 3171-3180.

14. Nakahara H. Emotion-related changes in heart rate and its variability during performance and perception of music // *Ann NY Acad Sci.* 2009. Vol. 1169. P. 359-362.

15. Cardiac vagal tone is correlated with selective attention to neutral distractors under load/G.Park, M.W.Vasey, J.J.Van Bavel et al // *Psychophysiology.* 2013. Vol. 50. №4. P. 398-406.

16. Stefanovska A., Bracic M., Kvernmo H. D. Wavelet analysis of oscillations in the peripheral blood circulation measured by laser Doppler technique // *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 1999. Vol. 46. P. 1230-1239.

17. Tankanag A.V., Chemeris N.K. Application of the adaptive wavelet transform for analysis of blood flow oscillations in the human skin // Phys. Med. Biol. 2008. Vol. 53. P. 5967.

18. Танканаг А.В., Чемерис Н.К. Адаптивный вейвлет-анализ колебаний периферического кровотока кожи человека // Биофизика. 2009. Т. 54. № 3. С. 537.

19. Respiratory-dependent laser-Doppler flux motion in different skin areas and its meaning to autonomic nervous control of the vessels of the skin / M.E.Muck-Weymann, H.P.Albrecht, D. Hageret al // Microvasc. Res. 1996. Vol. 52. P. 69-78.

20. Analysis of heart rate variability and skin blood flow oscillations under deep controlled breathing / G.V.Krasnikov, M.Y. Tyurina, A.V.Tankanag et al// Respir. Physiol. Neurobiol. 2013. Vol. 185. P. 562–570.

*Красников Геннадий Викторович, канд. биол. наук, доц., [gvkrasnikov@gmail.com](mailto:gvkrasnikov@gmail.com), Россия, Тула, Тульский государственный педагогический университет им. Л.Н. Толстого,*

*Ефимова Дарья Юрьевна, аспирант, [physiology@tspu.tula.ru](mailto:physiology@tspu.tula.ru), Россия, Тула, Тульский государственный педагогический университет им. Л.Н. Толстого,*

*Тюрина Миглена Йорданова, канд. биол. наук, научный сотрудник, [physiology@tspu.tula.ru](mailto:physiology@tspu.tula.ru), Россия, Тула, Тульский государственный педагогический университет им. Л.Н. Толстого,*

*Коняева Татьяна Николаевна, канд. биол. наук, доц., [physiology@tspu.tula.ru](mailto:physiology@tspu.tula.ru), Россия, Тула, Тульский государственный педагогический университет им. Л.Н. Толстого,*

*Красникова Инна Владимировна, канд. биол. наук, доц., [gvkrasnikov@gmail.com](mailto:gvkrasnikov@gmail.com), Россия, Тула, Тульский государственный педагогический университет им. Л.Н. Толстого,*

*Пискунова Галина Михайловна, канд. биол. наук, доц., [physiology@tspu.tula.ru](mailto:physiology@tspu.tula.ru), Россия, Тула, Тульский государственный педагогический университет им. Л.Н. Толстого*

## BREATHCONTROLASAFACTOROFMICROCIRCULATIONBLOODFLOW OSCILLATIONMODULATIONOFHUMANSKIN

*G.V. Krasnikov, D.Y. Efimova, M.J.Tyurina, T.N.Konyaeva,I.V.Krasnikova,  
G.M.Piskunova*

*Purpose - estimation of the importance of an arbitrary regulation of respiration component in the formation of the modulation of peripheral blood flow. A comparative study of voluntary breathing on the rhythmic structure of the skin blood flow.It showed a significant reduction of the amplitude fluctuations finger skin blood flow under conditions of controlled breathing sinusoidal profile in the endothelium-dependent ranges , neurogenic , myogenic and respiratory dependent activity when compared with the spontaneous breathing (1.7, 1.6, 1.7, and 1.3 times, respectively ). These data demonstratethat voluntary breath control can act as a modulation factor of microcirculatory blood flow through impact on the level of activity of sympathetic regulation of vascular tone.*

*Keywords: microcirculation, laser Doppler flowmetry, heart rate variability, blood flow oscillations, spectral analysis.*

*Krasnikov Gennady Viktorovich, candidate of biological science, docent, [gvkrasnikov@gmail.com](mailto:gvkrasnikov@gmail.com), Russia, Tula, Tula State Lev Tolstoy Pedagogical University,*

*Efimova Darya Yurievna, aspirant, [physiology@tspu.tula.ru](mailto:physiology@tspu.tula.ru), Russia, Tula, Tula State Lev Tolstoy Pedagogical University,*

*Tyurina Miglena Yordanova, candidate of biological science, researcher, [physiology@tspu.tula.ru](mailto:physiology@tspu.tula.ru), Russia, Tula, Tula State Lev Tolstoy Pedagogical University,*

*Konyaeva Tatiana Nikolaevna, candidate of biological science, docent, [physiology@tspu.tula.ru](mailto:physiology@tspu.tula.ru), Russia, Tula, Tula State Lev Tolstoy Pedagogical University,*

*Krasnikova Inna Vladimirovna, candidate of biological science, docent, [gvkrasnikov@gmail.com](mailto:gvkrasnikov@gmail.com), Russia, Tula, Tula State Lev Tolstoy Pedagogical University,*

*Piskunova Galina Michaylovna, candidate of biological science, docent, [physiology@tspu.tula.ru](mailto:physiology@tspu.tula.ru), Russia, Tula, Tula State Lev Tolstoy Pedagogical University*

## СОДЕРЖАНИЕ

### ***ХИМИЧЕСКИЕ НАУКИ***

- Бурмистрова Т.В., Лаврова Д.Г., Каманина О.А.,  
Мачулина А.В., Понаморева О.Н.*  
Клетки микроорганизмов как структурообразующие агенты  
в синтезе гибридных кремнийорганических материалов  
с применением золь-гель технологий ..... 3
- Матвейко Н.П., Садовский В.В., Носова Н.М.*  
Экологический аспект применения мыла ..... 12
- Устинов И.И., Блохин И.В., Атрощенко Ю.М.,  
Шахгельдян И.В., Арляпов В.А., Бойкова О.И.,  
Рябов М.А.*  
Молекулярная и электронная структура гидридного  $\sigma$ -аддукта  
5,7-динитро-8-оксихинолина по расчетам с помощью метода теории  
функционала плотности и экспериментальным данным ..... 29
- Асулян Л.Д., Камаева О.А., Арляпов В.А., Алферов В.А.*  
Получение стабильных рецепторных элементов на основе  
гидрогеля поливинилового спирта для создания  
БПК-биосенсора ..... 37
- Каманин С.С., Скворцова Л.С., Коина Е.А., Арляпов В.А.*  
Амперометрический биосенсор для определения глюкозы  
на основе глюкозооксидазы, иммобилизованной  
в электропроводящий гель ..... 46

### ***БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ***

- Акатова Е.В., Сайс-Хименас С., Хурадо В.*  
Бактериальные сообщества фиолетовых пятен,  
обнаруженных в круговом мавзолее римского  
некрополя города Кармона (Испания) ..... 58
- Короткова А.А., Дубинин М.С.*  
Зоогеографическая характеристика энтомофауны в районах  
линий электропередач в Тульской области ..... 72

<i>Минайчев В.В., Сиголаева Т.Е., Кузнецов Д.А., Иванищев В.В.</i> Влияние ионов цинка и никеля на водообеспеченность проростков гороха и образование пигментов фотосинтеза .....	77
<i>Нечаева И.А., Лыонг Т.М., Сатина В.Э., Понаморёва О.Н.</i> Влияние физиологических особенностей бактерий рода <i>Rhodococcus</i> на деградацию н-гексадекана .....	90
<i>Ширишков Н.В., Редикульцев Ю.В., Музафаров Е.Н., Гаврилов А.Б.</i> Культивирование <i>Bacillus subtilis</i> в структуре безотходной технологии получения пробиотического препарата ветеринарного назначения .....	99
<i>Мартынюк Ю.М., Хорун Л.В.</i> Проектирование региональной мониторинговой сети для контроля за внедрением и расселением инвазионных видов растений .....	108
<i>Красников Г.В., Ефимова Д.Ю., Тюрина М.И., Коняева Т.Н., Красникова И.В., Пискунова Г.М.</i> Контроль дыхания как фактор модуляции колебаний микроциркуляторного кровотока кожи человека .....	115

Научное издание

**ИЗВЕСТИЯ  
ТУЛЬСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА**

**ЕСТЕСТВЕННЫЕ НАУКИ**

**Выпуск 1**

*Редактор И.А. Есяян*

*Учредитель:*

*ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет»*

Изд. лиц. ЛР № 020300 от 12.02.97. Подписано в печать 10.03.16

Дата выхода в свет 22.03.16

Формат бумаги 70x100 1/16. Бумага офсетная.

Усл. печ. л. 7.9. Уч.-изд. л. 6.9.

Тираж 500 экз. Заказ 101

Цена свободная

Тульский государственный университет  
300012, г. Тула, просп. Ленина, 92

Отпечатано в Издательстве ТулГУ  
300012, г. Тула, просп. Ленина, 95