

Ученые записки Казанского университета.

Серия Естественные науки

рецензируемый научный журнал

2024

Т. 166, кн. 2

УЧЕННЫЕ ЗАПИСКИ КАЗАНСКОГО УНИВЕРСИТЕТА ОСНОВАНЫ В 1834 ГОДУ

Редакционная коллегия

Главный редактор

Д.А. Таюрский – д-р физ.-мат. наук, проф., Казанский федеральный университет, г. Казань, Россия

Члены редколлегии

Г.К. Зиятдинова (зам. гл. ред.) – д-р хим. наук, доц., Казанский федеральный университет, г. Казань, Россия

А.Д. Калмыкова (секретарь) – Казанский федеральный университет, г. Казань, Россия

Н.И. Акберова – канд. биол. наук, ст. науч. сотр., Казанский федеральный университет, г. Казань, Россия

И.С. Антисин – д-р хим. наук, проф., чл.-корр. РАН, Казанский федеральный университет, г. Казань, Россия

А.С. Борисов – д-р геол.-минерал. наук, проф., Казанский федеральный университет, г. Казань, Россия

Г.К. Будников – д-р хим. наук, проф., Казанский федеральный университет, г. Казань, Россия

А.С. Бяков – д-р геол.-минерал. наук, доц., Северо-Восточный комплексный научно-исследовательский институт им. Н.А. Шило ДВО РАН, г. Магадан, Россия

О.П. Ермолаев – д-р геогр. наук, проф., Казанский федеральный университет, г. Казань, Россия

А.А. Вартек – канд. хим. наук, д-р теоретической химии, проф., Страсбургский университет, г. Страсбург, Франция

Р.И. Жданов – д-р хим. наук, проф., Казанский федеральный университет, г. Казань, Россия

И.Б. Ившина – д-р биол. наук, акад. РАН, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь, Россия

С.В. Костров – д-р биол. наук, проф., чл.-корр. РАН, Институт молекулярной генетики РАН, г. Москва, Россия

Я. Лабуда – д-р наук, проф., Словацкий технологический университет в Братиславе, г. Братислава, Словацкая Республика

М. Либонати – д-р мед. наук, почётный проф., Университет Вероны, г. Верона, Италия

В.В. Малахов – д-р биол. наук, акад. РАН, Московский государственный университет, г. Москва, Россия

А.И. Мелентьев – д-р биол. наук, проф., Институт биологии УНЦ РАН, г. Уфа, Россия

Д.К. Нургалиев – д-р геол.-минер. наук, проф., Казанский федеральный университет, г. Казань, Россия

А.А. Паутов – д-р биол. наук, проф., Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург, Россия

Ю.П. Переведенцев – д-р геогр. наук, проф., Казанский федеральный университет, г. Казань, Россия

Р.М. Сабиров – канд. биол. наук, доц., Казанский федеральный университет, г. Казань, Россия

С.Ю. Селивановская – д-р биол. наук, проф., Казанский федеральный университет, г. Казань, Россия

В.В. Силантьев – д-р геол.-минер. доцент, Казанский федеральный университет, г. Казань, Россия

О.Г. Синяшин – д-р хим. наук, акад. РАН, Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова ФИЦ КазНЦ РАН, г. Казань, Россия

Н.Ю. Степанова – д-р биол. наук, проф., Казанский федеральный университет, г. Казань, Россия

Р.Н. Хазипов – д-р мед. наук, Средиземноморский институт нейробиологии, г. Марсель, Франция; Казанский федеральный университет, г. Казань, Россия

Ф. Хеллер – д-р наук, почётный проф., Швейцарская высшая техническая школа Цюриха, г. Цюрих, Швейцария

Редактор английского текста *А.О. Кармазина*

Учредитель и издатель: ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций
Свидетельство о регистрации ПИ № ФС77-41874 от 27 августа 2010 г.

Журнал реферируется/индексируется в Scopus, DOAJ, EBSCO, eLIBRARY.RU, Emerging Sources Citation Index, Google Scholar, CAB Abstracts and Global Health, CAS Source Index, GeoRef, Ulrich's Periodicals Directory, WorldCat, КиберЛенинка

Подписной индекс 19422. Цена свободная

Адрес издателя и редакции «Ученые записки Казанского университета»:
420008, Российская Федерация, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18
Телефон: (843) 233-73-01; e-mail: uz.ku@kpfu.ru; сайт: <https://uzakuesc.elpub.ru>

Дата выхода в свет 02.07.2024. Формат 70×108/16.
Бумага офсетная. Усл. печ. л. 15,15.
Уч.-изд. л. 12,93. Тираж 300 экз. Заказ 98/6

Отпечатано в типографии Издательства
Казанского университета
420008, Российская Федерация, Республика Татарстан,
Казань, ул. проф. Нужина, д. 1/37

Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta.

Seriya Estestvennye Nauki (Proceedings of Kazan University. Natural Sciences Series)

Peer-Reviewed Scientific Journal

2024
Vol. 166,
no. 2

UCHENYE ZAPISKI KAZANSKOGO UNIVERSITETA FOUNDED IN 1834

Editorial Board

Editor-in-Chief

Dmitrii A. Tayurskii – Doctor of Physics and Mathematics, Professor, Kazan Federal University, Kazan, Russia

Members of Editorial Board

Guzel K. Ziyadinova (Deputy Editor-in-Chief) – Doctor of Chemistry, Associate Professor, Kazan Federal University, Kazan, Russia

Alena D. Kalmykova (Secretary) – Kazan Federal University, Kazan, Russia

Natalya I. Akberova – PhD in Biology, Associate Professor, Senior Research Fellow, Kazan Federal University, Kazan, Russia

Igor S. Antipin – Doctor of Chemistry, Professor, Corresponding Member of Russian Academy of Sciences, Kazan Federal University, Kazan, Russia

Aleksander S. Biakov – Doctor of Geology and Mineralogy, Associate Professor, North-East Interdisciplinary Scientific Research Institute
n. a. N.A. Shilo, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Magadan, Russia

Anatolij S. Borisov – Doctor of Geology and Mineralogy, Professor, Kazan Federal University, Kazan, Russia

Herman C. Budnikov – Doctor of Chemistry, Professor, Kazan Federal University, Kazan, Russia

Oleg P. Ermolaev – Doctor of Geography, Professor, Kazan Federal University, Kazan, Russia

Renad I. Zhdanov – Doctor of Chemistry, Professor, Kazan Federal University, Kazan, Russia

Friedrich Heller – Doctor of Science, Professor Emeritus, Swiss Federal Institute of Technology in Zürich, Zürich, Switzerland

Irina B. Ivshina – Doctor of Biology, Member of Russian Academy of Sciences, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of
Russian Academy of Sciences, Perm, Russia

Roustem N. Khazipov – Doctor of Medicine, Mediterranean Institute of Neurobiology, Marseille, France; Kazan Federal University, Kazan, Russia

Sergey V. Kostrov – Doctor of Biology, Professor, Corresponding Member of Russian Academy of Sciences, Institute of Molecular Genetics of Russian
Academy of Sciences, Moscow, Russia

Jan Labuda – Doctor of Science, Professor, Slovak University of Technology in Bratislava, Bratislava, Slovak Republic

Massimo Libonati – Doctor of Medicine, Emeritus Professor, Verona University, Verona, Italy

Vladimir V. Malakhov – Doctor of Biology, Member of Russian Academy of Sciences, Moscow State University, Moscow, Russia

Aleksandr I. Melentiev – Doctor of Biology, Professor, Institute of Biology, Ufa Research Center of Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

Danis K. Nurgaliev – Doctor of Geology and Mineralogy, Professor, Kazan Federal University, Kazan, Russia

Anatolii A. Pautov – Doctor of Biology, Professor, Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

Jurij P. Perevedentsev – Doctor of Geography, Professor, Kazan Federal University, Kazan, Russia

Rushan M. Sabirov – PhD in Biology, Associate Professor, Kazan Federal University, Kazan, Russia

Svetlana Ju. Selivanovskaya – Doctor of Biology, Professor, Kazan Federal University, Kazan, Russia

Vladimir V. Silantev – Doctor of Geology and Mineralogy, Associate Professor, Kazan Federal University, Kazan, Russia

Oleg G. Sinyashin – Doctor of Chemistry, Member of Russian Academy of Sciences, Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, FRC Kazan
Scientific Center of RAS, Kazan, Russia

Nadezhda Yu. Stepanova – Doctor of Biology, Professor, Kazan Federal University, Kazan, Russia

Alexandre Varnek – PhD in Chemistry, Professor, Habilitation in Theoretical Chemistry, University of Strasbourg, Strasbourg, France

English Editor: *A.O. Karmazina*

Founder and Publisher: Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "Kazan (Volga Region) Federal University"

The journal is registered by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technologies and Mass Media

Registration certificate PI No. FS77-41874 dated August 27, 2010

The journal is abstracted and/or indexed in Scopus, DOAJ, EBSCO, eLIBRARY.RU, Emerging Sources Citation Index, Google Scholar,
CAB Abstracts and Global Health, CAS Source Index, GeoRef, Cyberleninka, Ulrich's Periodicals Directory, WorldCat

Subscription index: 19422. Free price

Contacts: Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta, ul. Kremlevskaya 18, Kazan, Republic of Tatarstan, 420008 Russia

Phone: (843) 233-73-01; e-mail: uz.ku@kpfu.ru; website: <https://uzakuesc.elpub.ru>

Date of publication: July 02, 2024. Page size: 70×108/16.
Offset printing. Conventional printing sheet: 15.15. Publisher's
signature: 12.93. Circulation: 300 copies. Order: 98/6

Printed in KFU Publishing House
ul. Prof. Nuzhina 1/37, Kazan,
Republic of Tatarstan, 420008 Russia

СОДЕРЖАНИЕ

<i>Юшкин А.А., Небеская А.П., Грушевенко Е.А., Малахов А.О., Анохина Т.С., Волков А.В.</i> Мембраны на основе целлофана для очистки водных сред от загрязнителей различной природы.....	187
<i>Khamidullin T.L., Lounev I.V., Sattarov S.A., Dimiev A.M.</i> Anomalous conductive properties of polymer composites with carbon nanotubes: Why power laws are not universal.....	210
<i>Anh H.N.Q., Quoc L.P.T.</i> Evaluation of the physicochemical properties of spray-dried coconut flower nectar powder	229
<i>Abd Elgadir M., Bakar J., Abdul Rahman R., Karim R., Mariod A.A.</i> Effect of protein–starch interaction on rheological, textural, and sensory properties of <i>keropok lekor</i>	238
<i>Бондарь О.В., Карут Р., Мостовая О.А., Пугачев М.В., Иксанова А.Г., Штырлин Ю.Г.</i> Аффинность к эстрогеновому рецептору α (ER α) производного <i>транс</i> -стильбена, содержащего фрагмент пиридоксина	255
<i>Тунакова Ю.А., Новикова С.В., Валиев В.С., Файзуллин Р.И.</i> Способ количественной оценки накопления металлов в организме человека при полиметаллическом загрязнении компонентов урбоэкосистемы	266
<i>Фаттахова А.Н., Евтюгин В.Г., Бушмелева К.Н.</i> Биохимическая характеристика индуцированного фармакологического паралича задних конечностей у мышей стока CD-1.....	283
<i>Агабекян И.А., Сабаяева Д.Ю., Абдулкина Л.Р.</i> Влияние гипертермии на изменение длины теломер растений <i>Arabidopsis thaliana</i>	297
<i>Дегтярева Л.В.</i> Рекомендации к применению метода эталонов для биоиндикационных исследований Северного Каспия.....	312
<i>Митракова Н.В., Меньшикова Е.А., Хайрулина Е.А., Порошина Н.В.</i> Диагностика кислых сульфатных почв в угледобывающем районе в таежной зоне	324
<i>Толоконникова З.А., Федоров П.В., Михненко Д.М.</i> Классификация защитных структур ископаемых мшанок.....	342

CONTENTS

<i>Yushkin A.A., Nebesskaya A.P., Grushevenko E.A., Malakhov A.O., Anokhina T.S., Volkov A.V.</i> Cellophane-based membranes for purification of aqueous media from various pollutants.....	187
<i>Khamidullin T.L., Lounev I.V., Sattarov S.A., Dimiev A.M.</i> Anomalous conductive properties of polymer composites with carbon nanotubes: Why power laws are not universal.....	210
<i>Anh H.N.Q., Quoc L.P.T.</i> Evaluation of the physicochemical properties of spray-dried coconut flower nectar powder	229
<i>M. Abd Elgadir, Bakar J., Abdul Rahman R., Karim R., Mariod A.A.</i> Effect of protein–starch interaction on rheological, textural, and sensory properties of <i>keropok lekor</i>	238
<i>Bondar O.V., Karut R., Mostovaya O.A., Pugachev M.V., Iksanova A.G., Shtyrlin Yu.G.</i> Affinity for estrogen receptor α (ER α) in a <i>trans</i> -stilbene derivative containing a pyridoxine fragment	255
<i>Tunakova Yu.A., Novikova S.V., Valiev V.S., Faizullin R.I.</i> A method for quantitative assessment of metal accumulation in the human body during polymetallic pollution of urban ecosystem components.....	266
<i>Fattakhova A.N., Evtugyn V.G., Bushmeleva K.N.</i> Biochemical characteristics of pharmacologically induced hind limb paralysis in CD-1 mice.....	283
<i>Agabekian I.A., Sabaeva D.Y., Abdulkina L.R.</i> Effects of hyperthermia on telomere length changes in <i>Arabidopsis thaliana</i> plants.....	297
<i>Degtyareva L.V.</i> Recommendations for using the method of standards in bioindication studies of the Northern Caspian Sea	312
<i>Mitrakova N.V., Menshikova E.A., Khayrulina E.A., Poroshina N.V.</i> Diagnostics of acid sulfate soils in a coal mining area of the taiga zone.....	324
<i>Tolokonnikova Z.A., Fedorov P.V., Mikhnenko D.M.</i> A classification of protective structures in fossil bryozoans	342

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

УДК 66.081.63

doi: 10.26907/2542-064X.2024.2.187-209

МЕМБРАНЫ НА ОСНОВЕ ЦЕЛЛОФАНА ДЛЯ ОЧИСТКИ ВОДНЫХ СРЕД ОТ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ

*А.А. Юшкин, А.П. Небеская, Е.А. Грушевенко, А.О. Малахов,
Т.С. Анохина, А.В. Волков*

*Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева Российской академии наук,
г. Москва, 119991, Россия*

Аннотация

В работе исследован процесс нанофильтрационной очистки воды от органических загрязнителей различной природы. В качестве мембраны в работе использована целлофановая пленка – материал на основе дешевого природного сырья. В качестве модельных веществ, от которых очищали воду, рассмотрены красители сафранин О, оранжевый П и ремазол бриллиантовый синий Р, характеризующиеся различной молекулярной массой, химическим составом и зарядом, а также антибиотик цефтриаксон. Показано, что проницаемость целлофана по воде составляет 0.145 ± 0.017 кг/(м²·ч·атм). При этом мембраны из целлофана хорошо задерживают из водных сред растворенные органические вещества анионного типа, содержащие кислотные группы. При выделении из воды анионных красителей оранжевый П и ремазол бриллиантовый синий Р коэффициенты задержания составили 97 ± 2 и $99 \pm 1\%$ соответственно. В случае катионного красителя сафранин О наблюдали отрицательные значения коэффициентов задержания на уровне $-7 \pm 3\%$. В то же время, для антибиотика цефтриаксона коэффициент задержания составил всего $41 \pm 5\%$, что обусловлено его высоким сродством к целлофану и стерическими ограничениями.

Ключевые слова: мембрана, целлофан, антибиотик, цефтриаксон, краситель, фильтрация, фракционирование.

Введение

В настоящее время многие водные ресурсы оказываются в той или иной степени загрязненными компонентами антропогенного происхождения, включая бытовые, сельскохозяйственные и промышленные сточные воды [1], объемы которых постоянно увеличиваются [2]. При этом далеко не всегда системы очистки стоков модернизируются согласно возникающей дополнительной нагрузке. Поэтому в окружающую среду попадает широкий ряд загрязнителей различной природы: соли тяжелых металлов, поверхностно-активные вещества, нефтепродукты, красители, органические растворители и т. д. [3]. Присутствие этих соединений в источниках питьевой воды, таких как реки и грунтовые воды, ухудшает качество воды и создает серьезные проблемы в работе существующих систем очистки воды [4].

Среди большого числа загрязнителей водной среды одни из лидирующих позиций занимают синтетические красители и антибиотики. Высокая устойчивость синтетических красителей к воздействию света, температуры, моющих средств и микробов [5, 6] приводит к их накоплению в окружающей среде и негативному воздействию на состояние экосистемы [7, 8]. Появление в XX в. антибиотиков и их активное применение в медицине, животноводстве и рыбоводстве привело к мировому росту объемов производства, что, в свою очередь, привело к попаданию антибиотиков в окружающую среду и накоплению в ней. Присутствие антибиотиков установлено в поверхностных и грунтовых водах, почвах и даже живых организмах [9]. Эта проблема актуальна для всего мира, что подтверждается исследованиями состояния окружающей среды в разных странах и регионах [10–12]. В большинстве случаев накопление антибиотиков приводит к возникновению резистентности у микроорганизмов, что снижает эффективность медикаментозной терапии при лечении различных заболеваний [13].

Таким образом, водоочистка от токсичных органических веществ, в частности синтетических красителей и антибиотиков, является важной задачей настоящего времени. Методы очистки промышленных сточных вод могут различаться в зависимости от их состава, происхождения и конкретного предприятия [4]. Для решения этой задачи применяют сорбцию [14–17], фотодеградацию [18–20], биodeградацию [21–26], коагуляцию и флокуляцию [27–29], ультразвуковое облечение [30, 31] и химическую очистку [32].

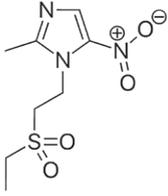
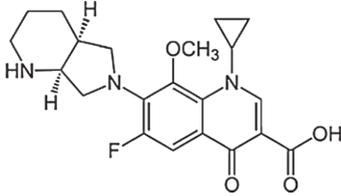
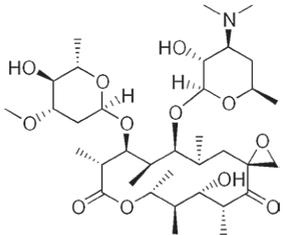
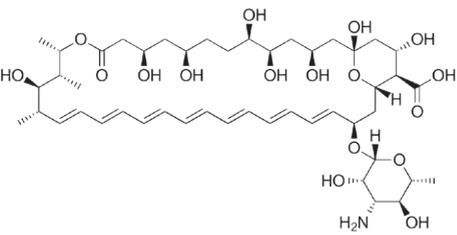
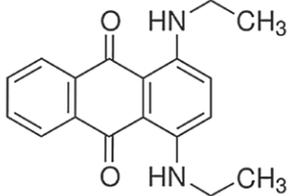
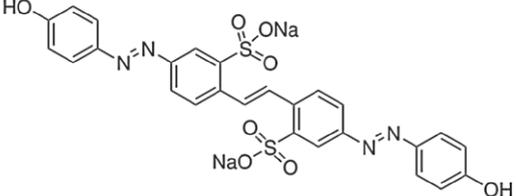
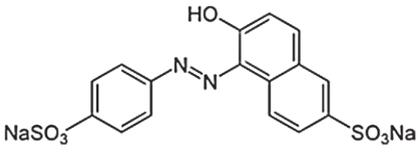
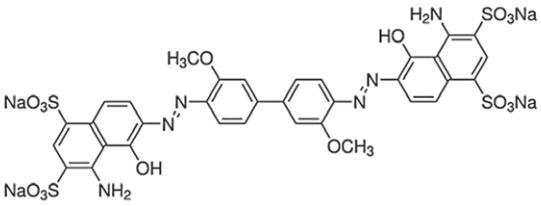
В последнее время большое внимание уделяют энергоэффективным и энергосберегающим технологиям [33]. В этой связи значительный интерес представляют баромембранные методы разделения [34]. Они не требуют реагентов, характеризуются низкими энергетическими затратами, нечувствительны к условиям окружающей среды, отличаются высокой эффективностью, модульностью и экономичностью [21, 35]. Кроме того, широкие возможности масштабирования баромембранных установок позволяют использовать их как на крупных предприятиях, так и на небольших заводах.

В зависимости от размеров загрязнителей, подлежащих удалению, различают следующие баромембранные процессы: микрофльтрация, ультрафльтрация, нанофльтрация и обратный осмос. Исходя из того, что молекулярная масса большинства красителей и антибиотиков находится в диапазоне 250–1000 г/моль (табл. 1), баромембранный процесс их выделения относится к области нанофльтрации. В научной литературе имеется ряд работ, которые свидетельствуют о высокой эффективности процесса нанофльтрации при очистке воды от красителей [36, 37] и антибиотиков [38–40].

В то же время большинство существующих нанофльтрационных мембран изготавливается из синтетических полимеров. Например, в работе [41] были получены нанофльтрационные мембраны из полиимида. Мембраны обладали повышенной устойчивостью к загрязнениям. Для удаления сульфамеризина предложены композиционные мембраны из полиэтиленimina и полиэфирэфиркетона [42]. Однако использование синтетических полимеров само по себе является источником проблем, так как в этом случае возникает проблема накопления и утилизации использованных мембран. С этой точки зрения более экологически безопасным подходом представляется использование мембран на основе природных материалов.

Табл. 1

Структурные формулы и молярные массы некоторых антибиотиков и красителей

Антибиотики	
	
Тинидазол 247 г/моль	Моксифлоксацин 438 г/моль
	
Олеандомицин 688 г/моль	Амфотерицин В 924 г/моль
Красители	
	
Solvent Blue 59 294 г/моль	Бриллиантовый желтый 625 г/моль
	
Желтый «солнечный закат» FCF 452 г/моль	Эванса (голубой) 960 г/моль

Самым распространенным и недорогим природным полимером является целлюлоза. Она хорошо зарекомендовала себя в мембранных разделительных процессах [43–46]. Однако на этапе формовки из нее мембран возникают определенные трудности, связанные со сложностью подбора растворителя для полимера [47–49]. Поэтому интересной альтернативой является использование для изготовления мембран других полимеров, но происходящих из того же природного сырья, к числу которых относятся вискоза и целлофан.

Целлофан (ксантогенат целлюлозы) является важным промышленным полимером, который представляет собой прозрачный, гибкий и прочный листовый материал, содержащий 12–16% глицерина в качестве пластификатора. Целлофан используют в различных отраслях – от упаковки продуктов до медицины и косметологии. В ряде работ [50–53] показано, что целлофан можно применять в качестве мембраны для разделения газов и жидкостей. Этот полимер хорошо изучен в процессе переработки [54, 55]. Показана эффективность целлофана для удаления из воды спиртов [56] и уксусной кислоты [57], а также применимость в диализе [58]. Известно, что целлофан является проницаемым для аминокислот [59, 60].

Цель данной работы заключается в оценке возможности применения целлофановых пленок в качестве нанофильтрационных мембран для очистки водных сред от загрязнителей разной природы, а именно от красителей и антибиотиков. Использование в качестве мембран недорогого промышленного материала – целлофана, производимого из природного сырья, отвечает последним тенденциям в области охраны окружающей среды и снижения нагрузки на нее.

1. Материалы и методы

В качестве мембранного материала в работе использовали промышленную целлофановую пленку толщиной 31 мкм (изготовлена согласно ГОСТ 7730-89, Россия). В качестве растворенных веществ в работе рассмотрены три распространенных красителя – сафранин О, оранжевый II и ремазол бриллиантовый синий Р, а также антибиотик цефтриаксон (6R-[6 α ,7 β (Z)]-7-[[[2-амино-4-тиазолил](метоксиимино)ацетил]амино]-8-оксо-3-[[[1,2,5,6-тетрагидро-2-метил-5,6-диоксо-1,2,4-триазин-3-ил]тио]метил]-5-тиа-1-азабицикло[4.2.0]окт-2-ен-2-карбоновая кислота в виде динатриевой соли). Структурные формулы и некоторые характеристики растворенных веществ, используемых в работе, представлены в табл. 2.

При помещении целлофановой пленки в воду происходило увеличение ее размеров в результате сорбции воды (набухание). Как было показано ранее [61–63], это приводит к увеличению межцепных расстояний, что положительно сказывается на проницаемости. Набухание материала характеризуется степенью набухания S_D . Для определения степени набухания образцов пленок целлофана в воде вырезали прямоугольные образцы, для которых определяли их начальные геометрические параметры (длину, ширину, толщину). Как было отмечено ранее, обычно в промышленно производимом целлофане содержится 12–16% глицерина, добавляемого в качестве пластификатора. С целью удаления глицерина целлофановые образцы вымачивали в течение ночи в дистиллированной воде, после чего помещали в новую порцию дистиллированной воды еще на 24 ч. После этого снова измеряли геометрические размеры образцов. Степень набухания целлофана в воде рассчитывали по уравнению 1:

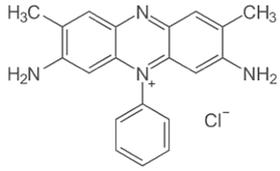
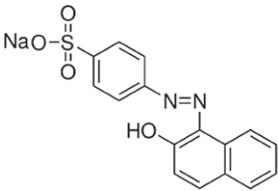
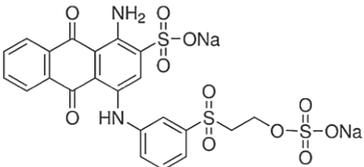
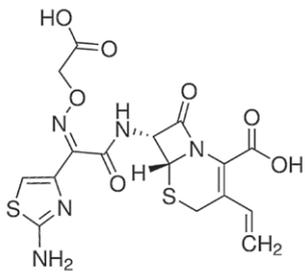
$$S_D = \frac{lbh - l_0 b_0 h_0}{l_0 b_0 h_0} \times 100\%, \quad (1)$$

где l , b , h – длина, ширина и толщина исходных (l_0 , b_0 , h_0) и набухших (l , b , h) образцов соответственно.

Толщина использованной в работе целлофановой пленки в сухом состоянии равна 31 ± 1 мкм. Измерения проводились на микрометре Mitutoyo 273 Quick Step (Mitutoyo, Япония).

Табл. 2

Некоторые характеристики органических соединений, используемых в работе

Краситель	Тип	Молекулярная масса, г/моль	λ , нм	Структурная формула
Сафранин О	Катионный	351	530	
Оранжевый II	Анионный	350	483	
Ремазол бриллиантовый синий Р	Анионный	626	592	
Цефтриаксон	Анионный	599	355	

Для количественного описания взаимодействия в системе вода–растворенное вещество–целлофан в работе был использован коэффициент распределения (K) растворенного вещества между водой и мембраной [64, 65], который выражали как отношение равновесных концентраций вещества в растворе ($[\text{Вещество}]_0$) и в целлофане ($[\text{Вещество}]_m$) (уравнение 2):

$$K = \frac{[\text{Вещество}]_m}{[\text{Вещество}]_0} = \frac{m_s / V}{[\text{Вещество}]_0}, \quad (2)$$

где m_s – масса сорбированного вещества, V – объем набухшего образца.

Объем набухшего образца определяли аналогично методике определения степени набухания. Представленные в статье значения коэффициентов распределения представлены как среднее значение из как минимум трех независимых экспериментов с использованием различных образцов.

Для этого предварительно измеряли вес и размеры исходного сухого образца целлофана, после чего помещали его в дистиллированную воду на 24 ч. Затем образец помещали в емкость с определенным объемом исследуемого раствора с концентрацией растворенного вещества 10 мг/л. Емкость герметично запечатывали и оставляли на 24 ч. Для расчета массы сорбированного растворенного вещества определяли его концентрацию в растворе до (c_0) и после (c_1) экспозиции в нем образца. Концентрацию вещества в растворе определяли спектрофотометрически при длине волны, соответствующей максимальному поглощению (данные указаны в табл. 1), на спектрофотометре ПЭ-5400УФ (Экохим, Россия).

Массу сорбированного вещества определяли по уменьшению его концентрации в окружающем растворе согласно уравнению 3:

$$m_s = \frac{c_0 m_0 - c_1 m_1}{\rho}, \quad (3)$$

где m_0 – масса раствора в начале эксперимента, m_1 – масса раствора в конце эксперимента, ρ – плотность раствора.

Процесс фильтрации через целлофан проводили с использованием установки тупикового типа. Ячейки, используемые для исследования процесса фильтрации, были оснащены системой перемешивания с магнитным приводом. Активная площадь мембраны в ячейке составляла 33.2 см². Перед установкой в ячейку пленку целлофана вымачивали в воде в течение 24 ч, после чего из набухшей пленки вырезали образец нужного размера и помещали в ячейку. В процессе вырезания и помещения в ячейку целлофан постоянно смачивали небольшим количеством дистиллированной воды, чтобы предотвратить его высыхание. Объем раствора, помещаемого в фильтрационную ячейку, составлял 900 мл. В качестве разделяемой среды в работе исследовали растворы красителей, указанных в табл. 1, и цефтриаксона с концентрацией 10 мг/л в дистиллированной воде. Фильтрацию проводили при комнатной температуре и трансмембранном давлении до 30 атм. Давление над мембраной создавали подачей в ячейку гелия. Все эксперименты проводили не менее чем на трех образцах целлофановых пленок.

Количество пермеата (жидкость, прошедшая через целлофановую пленку) измеряли весовым методом. Бюкс для сбора пермеата крепили к выходному патрубку ячейки таким образом, чтобы, с одной стороны, минимизировать испарение собираемой жидкости, а с другой – не допустить увеличения давления в подмембранном пространстве. Эффективность мембраны характеризовали ее проницаемостью (P), которую рассчитывали по уравнению 4:

$$P = \frac{m}{S \times \Delta t \times \Delta p}, \quad (4)$$

где m – масса пермеата (кг), прошедшего через мембрану с площадью S (м²) за промежуток времени Δt (ч) и при перепаде давления Δp .

Эффективность разделения характеризовали коэффициентом задержания R (%), который рассчитывали по уравнению 5:

$$R = \left(1 - \frac{c_0}{c_p}\right) \times 100\%, \quad (5)$$

где c_0 и c_p – концентрация растворенного вещества в исходной смеси и пермеате соответственно.

2. Результаты и обсуждение

Согласно результатам измерений геометрических размеров образцов целлофана, степень его набухания в воде составляет $76 \pm 5\%$. Это значение ниже, чем для каучуков в органических растворителях [62], но существенно выше, чем для таких стеклообразных полимеров, как полиакрилонитрил или полиимид, и сопоставимо со значениями для высокопроницаемых стеклообразных полимеров, таких как поли[1-(триметилсилил)-1-пропин] [91]. Такие значения степени набухания позволяют рассчитывать на то, что целлофан может обеспечить неплохую проницаемость материала в процессе фильтрации.

Несмотря на большие значения степени набухания, пленки целлофана сохраняют механические свойства, достаточные для использования в качестве фильтрующего элемента. На первом этапе работы были проведены фильтрационные эксперименты с использованием дистиллированной воды для определения проницаемости. Как можно видеть на рис. 1, наблюдается выполнение закона Дарси, т. е. линейная зависимость изменения потока жидкости от приложенного давления при перепаде давлений на мембране до значений 30 атм. Рассчитанное значение проницаемости по воде составило 0.145 ± 0.017 кг/(м²·ч·атм).

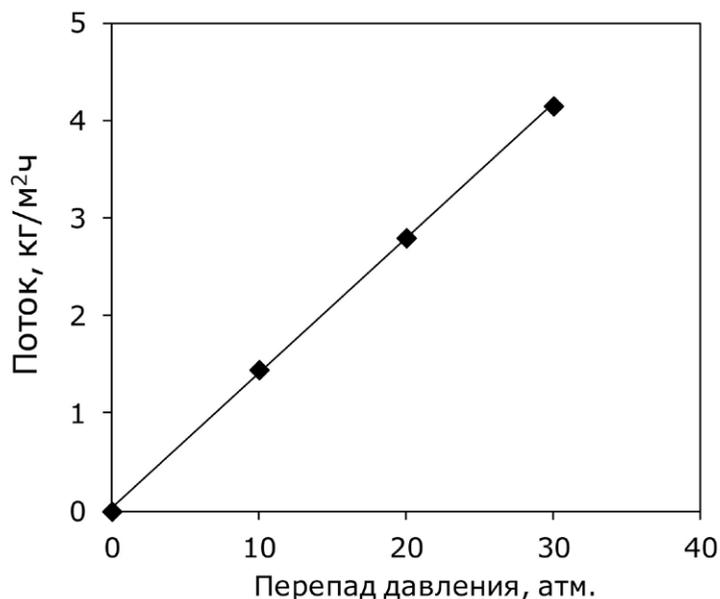


Рис. 1. Зависимость потока дистиллированной воды через пленку из целлофана от приложенного трансмембранного давления

Исследование влияния растворенного вещества на разделительные характеристики мембран на основе коммерческого целлофана проведено на ряде органических соединений катионной или анионной природы с молекулярной массой в диапазоне от 350 до 626 г/моль (табл. 2). Следует отметить, что при переходе от воды к водным растворам, содержащим выбранные растворенные органические вещества, значения проницаемости снижались на 5–12%. Такое снижение не связано с появлением в системе осмотического давления или засорением мембраны, так как использованные в работе концентрации слишком малы для оказания заметного влияния. В ходе проведения фильтрации выбранных соединений

были получены зависимости коэффициентов задержания от времени с момента начала эксперимента (рис. 2).

Как можно видеть на рис. 2, коэффициенты задержания R для двух анионных красителей – оранжевый II ($R = 97 \pm 2\%$) и ремазол бриллиантовый синий Р ($R = 99 \pm 1\%$) – демонстрировали стабильно высокие значения с начала эксперимента. Для антибиотика цефтриаксон требуется чуть больше 2 ч для достижения стационарных значений, а также наблюдается снижение значения коэффициента задержания с 83 до 41%. Максимальное время выхода на стационарные значения получено в случае катионного красителя сафранин О, для которого коэффициент задержания снижался с 84% до отрицательных значений в течение более 10 ч.

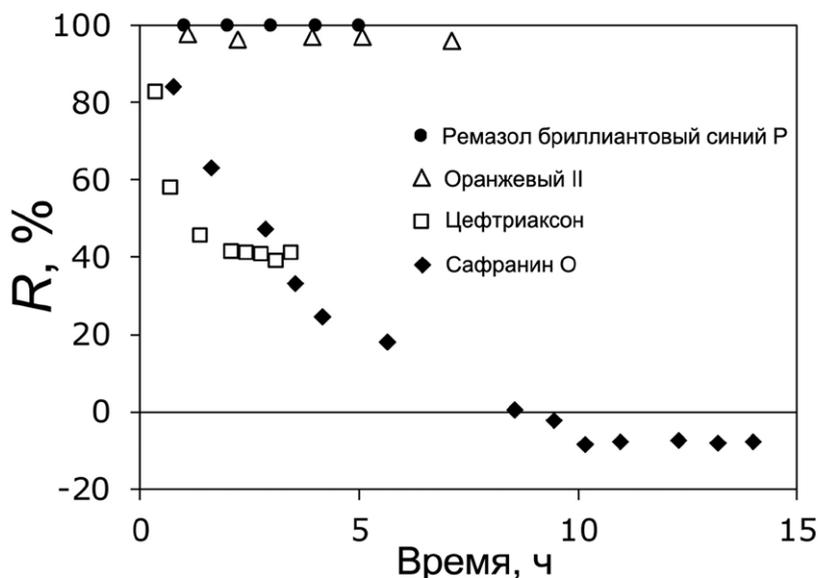


Рис. 2. Изменение коэффициента задержания R во времени (трансmemбранное давление 20 атм.)

В случае катионного красителя сафранин О получены коэффициенты задержания на уровне -7% (табл. 3). Другими словами, при фильтрации водного раствора данного красителя через целлофан происходило обогащение водного раствора более крупным растворенным соединением (возрастание концентрации на 7%). Явление «отрицательного задержания» достаточно распространено в процессе нанофильтрации водных и органических сред [64, 66, 67] и может реализоваться в случае, когда растворенное соединение имеет большее сродство к материалу мембраны по сравнению с растворителем. При переходе от катионного красителя сафранин О (351 г/моль) к анионному красителю оранжевый II (350 г/моль), значения коэффициента задержания достигают 97% , т. е. оно практически полностью отсекается целлофаном при прохождении раствора через мембрану.

Табл. 3

Значения коэффициента задержания (R) растворенных веществ с помощью пленки на основе целлофана, коэффициента распределения (K) между водой и целлофаном, а также параметра гидрофобности/гидрофильности соединений ($\log K_{ow}$)

Растворенное вещество	K	$\log K_{ow}$	R , %
Сафранин О	650 ± 50	-1.35	-7 ± 3
Оранжевый II	0.58 ± 0.05	0.56	97 ± 2
Ремазол бриллиантовый синий Р	0.08 ± 0.04	-1.85	99 ± 1
Цефтриаксон	0.42 ± 0.05	0.025	41 ± 5

Как было показано ранее в работе [66], средство растворенного соединения с материалом мембраны и растворителем может вносить заметный вклад в эффективность его задержания. Для описания взаимодействия растворенного вещества с мембранным материалом в литературе предложено использование коэффициента распределения K . Коэффициент распределения K представляет собой эмпирический параметр, который характеризует взаимодействие между компонентами фильтрационной разделительной смеси.

Значения коэффициентов распределения рассматриваемых красителей в системе вода–целлофан в данном случае хорошо согласуются с рассчитанными величинами коэффициента задержания. Для красителя сафранин О параметр K составил 650 (табл. 3). Это означает, что равновесная концентрация красителя в целлофане в 650 раз выше, чем в окружающем растворе, что свидетельствует о сильном сродстве между данным красителем и целлофаном. С другой стороны, для красителя оранжевый II значение $K < 1$, что свидетельствует о низком сродстве между красителем и целлофаном. Для ремазола бриллиантового синего Р (626 г/моль) значение K было еще ниже. Из этого можно сделать вывод, что целлофан предпочтительно использовать для выделения из водных сред растворенных веществ анионного типа (органические соединения, содержащие кислотные группы).

Действительно, при переходе к более крупному анионному красителю ремазол бриллиантовый синий Р коэффициент задержания увеличивается до $99 \pm 1\%$. Кроме того, при увеличении молекулярной массы растворенного вещества можно говорить об увеличении вклада стерических затруднений при транспорте растворенного вещества через мембрану. В то же время значение коэффициента задержания цефтриаксона составило $41 \pm 5\%$, несмотря на то, что данное соединение содержит карбоксильную группу в виде натриевой соли и обладает близкой молекулярной массой (599 г/моль), а величина коэффициента распределения составила 0.42 ± 0.05 . Исходя из данных табл. 3, сорбция компонентов в целлофан изменяется в следующем ряду: сафранин О \gg оранжевый II $>$ цефтриаксон $>$ ремазол бриллиантовый синий Р. Полученные закономерности хорошо коррелируют с полученными ранее данными по разделению красителей нанопористыми мембранами [64, 66].

Представленные на рис. 2 результаты в случае красителей могут быть интерпретированы с точки зрения различий во взаимодействии растворенных соединений с целлофаном. При более сильном взаимодействии, как в случае сафранина О,

на начальном участке времени происходит сорбция соединения и удержание самим материалом мембраны, что и обеспечивает высокую эффективность мембраны. Снижение числа свободных сорбционных центров в мембране сопровождается уменьшением значений коэффициентов задержания с последующим выходом на стационарную величину при достижении равновесных значений сорбции компонентов в целлофане в режиме фильтрации.

В то же время в случае цефтриаксона параметр K не может объяснить наблюдаемые значения коэффициентов задержания. Еще один параметр, который можно использовать для интерпретации полученных результатов, это параметр гидрофобности/гидрофильности соединения ($\log K_{ow}$), представляющий собой коэффициент распределения соединения в системе вода–октанол. Однако и этот параметр не позволяет в полной мере объяснить наблюдаемые для мембран на основе целлофана значения коэффициентов задержания, исходя из предположения, что более гидрофильное органическое соединение будет иметь большее сродство с водой. Как можно видеть из табл. 3, наиболее гидрофильными органическими соединениями в выбранном ряду являются ремазол бриллиантовый синий Р ($\log K_{ow} = -1.85$) и сафранин О ($\log K_{ow} = -1.35$), которые концентрируются в воде в 71 и 22 раза выше по сравнению с контактирующей органической фазой (n -октанол) соответственно. При этом цефтриаксон практически равномерно распределяется между водной и органической фазами, тогда как оранжевый II будет концентрироваться в n -октаноле.

Помимо экспериментально определяемых коэффициентов распределения для описания сродства также используются параметры растворимости Хансена [68], которые состоят из параметра дисперсии δ_D , параметра полярности δ_p и параметра водородной связи δ_H и вычисляются по уравнениям 6–8 соответственно:

$$\delta_D = \frac{\sum_i n_i F_{D,i}}{V}, \quad (6)$$

$$\delta_p = \frac{\sqrt{\sum_i n_i F_{p,i}^2}}{V}, \quad (7)$$

$$\delta_H = \sqrt{\frac{\sum_i n_i E_{H,i}}{V}}, \quad (8)$$

где $F_{D,i}$ и $F_{p,i}$ – константы молярного притяжения, $E_{H,i}$ – молярная энергия водородной связи; V – молярный объем соединения; n_i – номер каждой структурной единицы (группы) в соединении, V_i – молярный объем группы i .

Общий параметр растворимости вычисляется согласно уравнению 9:

$$\delta_t = (\delta_D^2 + \delta_p^2 + \delta_H^2)^{1/2} \quad (9)$$

При этом сопоставление параметра растворимости δ_t выбранных соединений (табл. 4) с аналогичными значениями для воды ($\delta_t = 47.8 \text{ МПа}^{1/2}$) и целлофана ($\delta_t = 42.1 \text{ МПа}^{1/2}$) также не позволяет в полной мере выявить общую взаимосвязь. Ожидается, что сродство двух компонентов увеличится при уменьшении абсолютной разницы между их параметрами растворимости.

В исследованных системах абсолютная разница в параметрах растворимости целлофана и растворенных веществ уменьшалась в следующем ряду: ремазол бриллиантовый синий Р ($|\Delta\delta| = 17.9 \text{ МПа}^{1/2}$) > оранжевый II ($|\Delta\delta| = 11.5 \text{ МПа}^{1/2}$) > сафранин О ($|\Delta\delta| = 9.3 \text{ МПа}^{1/2}$) > Цефтриаксон ($|\Delta\delta| = 0.9 \text{ МПа}^{1/2}$). Нетрудно заметить, что для слабо задерживаемых соединений (сафранин О и цефтриаксон) разница была меньше. Так как молекулы цефтриаксона имеют больший размер по сравнению с молекулами сафранина О, можно предположить, что в случае антибиотика частичное задержание и низкая сорбция связаны со стерическими затруднениями.

Табл. 4

Параметры растворимости Хансена для исследуемых соединений

Растворенное вещество	Функциональные группы	Параметры растворимости Хансена, МПа ^{1/2}			
		δ_D	δ_p	δ_H	δ_t
Сафранин О	$-\text{CH}_3-(2)$, $=\text{CH}-(4)$, $=\text{C} < (8)$, Фенил, $-\text{NH}_2-(2)$, $-\text{N} < *$, $-\text{N} =$	19.4	25.1	8.3	32.8
Оранжевый II	$=\text{CH}-(6)$, $=\text{C} < (4)$, Фенилен, $-\text{O}-$, $-\text{OH}$, $-\text{N}=(2)$, $-\text{SO}_2-$	12.9	26.8	7.0	30.6
Ремазол бриллиантовый синий Р	$-\text{CH}_2-(2)$, $=\text{CH}-(5)$, $=\text{C} < (9)$, Фенилен, $-\text{O}^*(2)$, $-\text{O}-(3)$, $-\text{NH}_2-$, $-\text{NH}-$, $-\text{SO}_2-(3)$	19.1	9.3	11.6	24.2
Цефтриаксон	$-\text{CH}_3-(2)$, $-\text{CH}_2-(2)$, $-\text{CH} < (2)$, $=\text{CH}-$, $=\text{C} < (10)$, $-\text{CO}_2-$, $-\text{O}^*(3)$, $-\text{O}-(2)$, $-\text{NH}_2-$, $-\text{NH}-$, $-\text{N} <$, $-\text{N} =$, $-\text{S}-$	37.6	15.5	13.9	43.0

Интересно отметить, что такое принципиальное отличие в значениях коэффициентов задержания двух соединений схожей молекулярной массы 350 г/моль может быть использовано для фракционирования этих соединений из одного раствора, как было показано на примере нейтрального и анионных красителей в процессе нанофильтрации органических сред с применением мембран на основе поли[1-(триметилсилил)-1-пропина] [64]. В нашем случае водный раствор, содержащий два органических соединения, при прохождении через целлофан будет обогащаться сафранином О (351 г/моль), тогда как оранжевый II будет задерживаться целлофаном и, следовательно, концентрироваться в водном растворе над мембраной. Если предположить сохранение значений коэффициентов задержания сафранина О ($R = -7 \pm 3\%$) и оранжевого II ($R = 97 \pm 2\%$) в широком диапазоне концентраций данных веществ в воде, то, как можно видеть на рис. 3 (раствор над мембраной), весовое соотношение оранжевого II к сафранину О может быть увеличено от 1:1 до 11:1 при степени отбора раствора 0.9 (90% раствора профильтровано через мембрану). В случае пермеата (раствор под мембраной) максимальное соотношение сафранина О и оранжевого II при малых степенях отбора будет на уровне 36:1. В дальнейшем это соотношение будет уменьшаться до 14:1 (степень отбора 0.9), так как коэффициент задержания оранжевого II меньше 100%.

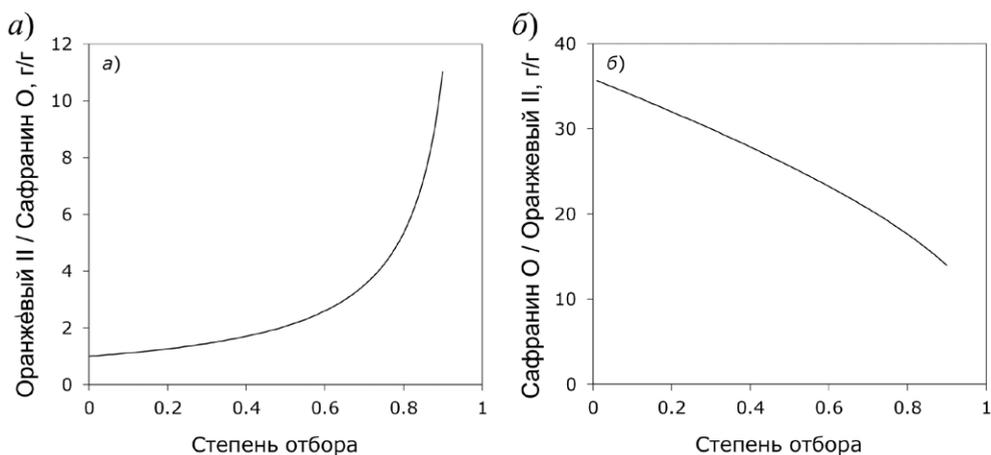


Рис. 3. Эффективность фракционирования пары сафранин О/оранжевый II при фильтрации общего водного раствора через целлофан в зависимости от степени отбора раствора через мембрану: а) соотношение оранжевый II/сафранин О в растворе над мембраной; б) соотношение сафранин О/оранжевый II в растворе под мембраной

Полученные фильтрационные характеристики мембран на основе целлофана по проницаемости несколько уступают промышленным синтетическим нанофильтрационным мембранам, таким как, например, мембрана ОПМН-II фирмы Владипор [69, 70]. Это связано в первую очередь с тем, что использовали сплошные целлофановые пленки толщиной 31 мкм, в то время как промышленные синтетические мембраны, как правило, имеют асимметричную структуру. С другой стороны, в рамках данной работы основной акцент сделан на использовании полимера из недорогого природного сырья. Сравнение полученных значений коэффициента задержания с аналогичными показателями для мембран на основе природных полимеров, представленных в литературе, показывает, что целлофан превосходит другие полимеры при выделении красителей (табл. 5).

Табл. 5

Нанофильтрационные характеристики некоторых мембран на основе природных полимеров

Полимер	Задерживаемое вещество (молярная масса, г/моль)	R, %	Источник
Целлофан	Оранжевый II (350)	97	Данная работа
	Ремазол бриллиантовый синий Р (626)	99	
	Цефтриаксон (599)	41	
Альгинат + поливиниловый спирт	Полиэтиленгликоль (600)	80	[71]
Хитозан + поливиниловый спирт		98	
Альгинат серебра	Оранжевый II (350)	80	[72]
Альгинат алюминия		80	
Альгинат кальция		60	
Полисахарид из мантии асцидий	Полиэтиленгликоль (600)	>90	[73]
Ацетат целлюлозы	Поллюанты сточных вод	62	[74]
Целлокон	Полиэтиленгликоль (600)	>90	[75]

Заключение

В работе исследован процесс выделения красителей и антибиотиков с молекулярными массами 350–600 г/моль из водных растворов с использованием мембран из целлофана как дешевого материала. На примере красителей оранжевый П и ремазол бриллиантовый синий Р показано, что мембраны из целлофана хорошо задерживают из водных сред растворенные вещества анионного типа, в то время как для катионного красителя сафранин О наблюдаются отрицательные значения коэффициентов задержания. Данный эффект может быть использован для фракционирования растворенных веществ с близкой молекулярной массой, но отличающихся зарядом. Наблюдаемые разделительные свойства показывают, что полученные нанофильтрационные мембраны на основе целлофана выдерживают конкуренцию с другими мембранами на основе природных полимеров.

Благодарности. Результаты получены при финансовой поддержке Российской Федерации в лице Министерства науки и высшего образования Российской Федерации. Проект 13.2251.21.0166 (идентификатор проекта RF----2251.61322X0044). Соглашение МНТС БРИКС 075-15-2022-1218.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. *Dhote J., Ingole S., Chavhan A.* Review on wastewater treatment technologies // *Int. J. Eng. Res. Technol.* 2012. V. 1, No 5. P. 1–10.
2. *Ezugbe E.O., Rathilal S.* Membrane technologies in wastewater treatment: A review // *Membranes.* 2020. V. 10, No 5. Art. 89. <https://doi.org/10.3390/membranes10050089>.
3. *Rathi B.S., Kumar P.S., Vo D.-V.N.* Critical review on hazardous pollutants in water environment: Occurrence, monitoring, fate, removal technologies and risk assessment // *Sci. Total Environ.* 2021. V. 797. Art. 149134. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149134>.
4. *Viktoryová N., Szarka A., Hrouzková S.* Recent developments and emerging trends in paint industry wastewater treatment methods // *Appl. Sci.* 2022. V. 12, No 20. Art. 10678. <https://doi.org/10.3390/app122010678>.
5. *Gül Ü.D.* A green approach for the treatment of dye and surfactant contaminated industrial wastewater // *Braz. J. Biol.* 2019. V. 80, No 3. P. 615–620. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.218064>.
6. *Rodríguez Couto S.* Dye removal by immobilized fungi // *Biotechnol. Adv.* 2009. V. 27, No 3. P. 227–235. <https://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.12.001>.
7. *Nair K S., Manu B., Azhoni A.* Sustainable treatment of paint industry wastewater: Current techniques and challenges // *J. Environ. Manage.* 2021, V. 296. Art. 113105. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113105>.
8. *Aniyikaiye T.E., Oluseyi T., Odiyo J.O., Edokpayi J.N.* Physico-chemical analysis of wastewater discharge from selected paint industries in Lagos, Nigeria // *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2019. V 16, No 7. Art. 1235. <https://doi.org/10.3390/ijerph16071235>.
9. *Martínez J.L.* Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments // *Science.* 2008. V. 321, No 5887. P. 365–367. <https://doi.org/10.1126/science.1159483>.
10. *Anh H.Q., Le T.P.Q., Da Le N., Lu X.X., Duong T.T., Garnier J., Rochelle-Newall E., Zhang S., Oh N.-H., Oeurng C., Ekkawatpanit C., Nguyen T.D., Nguyen Q.T., Nguyen T.D., Nguyen T.N., Tran T.L., Kunisue T., Tanoue R., Takahashi S., Minh T.B., Le H.T.,*

- Pham T.N.M., Nguyen T.A.H.* Antibiotics in surface water of East and Southeast Asian countries: A focused review on contamination status, pollution sources, potential risks, and future perspectives // *Sci. Total Environ.* 2021. V. 764. Art. 142865. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142865>.
11. *Liu X., Lu S., Guo W., Xi B., Wang W.* Antibiotics in the aquatic environments: A review of lakes, China // *Sci. Total Environ.* 2018. V. 627. P. 1195–1208. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.271>.
 12. *Sta Ana K.M., Madriaga J., Espino M.P.* β -Lactam antibiotics and antibiotic resistance in Asian lakes and rivers: An overview of contamination, sources and detection methods // *Environ. Pollut.* 2021. V. 275. Art. 116624. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116624>.
 13. *Косенко И.М.* Резистентность бактерий к антибиотикам – старая проблема. Есть ли решения? // *Лечение и профилактика.* 2019. Т. 9, № 4. С. 56–62.
 14. *Sulbarán Rangel B.C., Madrigal Oliveira A.E., Romero Arellano V.H., Guzmán González C.A.* Nanomateriales celulósicos para la adsorción de contaminantes emergentes // *Tecnura.* 2019. V. 23, No 62. P. 13–20. <https://doi.org/10.14483/22487638.15451>.
 15. *Meneau-Hernández R.I., Millán-Arrieta J.A., Borrego-Morales K., Alba-Carranza M.D., Fariás-Piñeira T.* Adsorción de ciprofloxacina en materiales zeolíticos // *Rev. Cubana Quim.* 2021. V. 33, No 1. P. 167–190.
 16. *Афонина А.П., Бурькина О.В.* Изучение кинетики сорбции промышленного красителя катионного розового 2С глинистым материалом // *Изв. вузов. Химия и хим. технология.* 2023. Т. 66, Вып. 9. С. 123–128. <https://doi.org/10.6060/ivkkt.20236609.6775>.
 17. *Казначеева А.А., Ставропольцева А.С., Меньшова И.И.* Сорбенты на основе нетканых материалов в очистке промышленных стоков // *Успехи в химии и химической технологии.* 2023. Т. 37, Вып. 4 (266). С. 123–125.
 18. *Gothwal R., Shashidhar T.* Antibiotic pollution in the environment: A review // *Clean: Soil, Air, Water.* 2015. V. 43, No 4. P. 479–489. <https://doi.org/10.1002/clen.201300989>.
 19. *Di J., Xia J., Ge Y., Li H., Ji H., Xu H., Zhang Q., Li H., Li M.* Novel visible-light-driven CQDs/Bi₂WO₆ hybrid materials with enhanced photocatalytic activity toward organic pollutants degradation and mechanism insight // *Appl. Catal., B: Environ.* 2015. V. 168–169. P. 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2014.11.057>.
 20. *Царенко А.Д., Яценко А.Н., Ульяновкина А.А.* Оптимизация технологических параметров фотодegradации красителя метиленового синего в присутствии наноразмерного оксида цинка // *Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Технические науки.* 2022. № 4. С. 90–95. <http://dx.doi.org/10.17213/1560-3644-2022-4-90-95>.
 21. *Huang B., Wang H.-C., Cui D., Zhang B., Chen Z.-B., Wang A.-J.* Treatment of pharmaceutical wastewater containing β -lactams antibiotics by a pilot-scale anaerobic membrane bioreactor (AnMBR) // *Chem. Eng. J.* 2018. V. 341. P. 238–247. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.01.149>.
 22. *Prado N., Ochoa J., Amrane A.* Biodegradation by activated sludge and toxicity of tetracycline into a semi-industrial membrane bioreactor // *Bioresour. Technol.* 2009. V. 100, No 15. P. 3769–3774. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.11.039>.
 23. *Li B., Zhang T.* Biodegradation and adsorption of antibiotics in the activated sludge process // *Environ. Sci. Technol.* 2010. V. 44, No 9. P. 3468–3473. <https://doi.org/10.1021/es903490h>.
 24. *Joss A., Keller E., Alder A.C., Göbel A., McArdell, C.S., Ternes T., Siegrist H.* Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment // *Water Res.* 2005. V. 39, No 14. P. 3139–3152. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.05.031>.

25. Yang S.-F., Lin C.-F., Lin A.-Y.C., Hong P.-K.A. Sorption and biodegradation of sulfonamide antibiotics by activated sludge: Experimental assessment using batch data obtained under aerobic conditions // *Water Res.* 2011. V. 45, No 11. P. 3389–3397. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.03.052>.
26. Джубару М.Л., Алексеева Н.В., Базияни Г.И., Таха В.С. Методы удаления пигментов из сточных вод // *Известия ТПУ. Инжиниринг георесурсов.* 2021, Т. 332, № 7. С. 54–64. <https://doi.org/10.18799/24131830/2021/7/3263>.
27. Suarez S., Lema J.M., Omil F. Pre-treatment of hospital wastewater by coagulation–flocculation and flotation // *Bioresour. Technol.* 2009. V. 100, No 7. P. 2138–2146. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.11.015>.
28. Choi K.-J., Kim S.-G., Kim S.-H. Removal of antibiotics by coagulation and granular activated carbon filtration // *J. Hazard. Mater.* 2008. V. 151, No 1. P. 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.05.059>.
29. Ульрих Е.В., Баркова А.С. Использование флокулянтов для очистки сточных вод // *Трансформация экосистем.* 2023. Т. 6, № 1. С. 168–187.
30. Naddeo V., Meriç S., Kassinos D., Belgiorno V., Guida M. Fate of pharmaceuticals in contaminated urban wastewater effluent under ultrasonic irradiation // *Water Res.* 2009. V. 43, No 16. P. 4019–4027. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.05.027>.
31. Lu X., Qiu W., Peng J., Xu H., Wang D., Cao Y., Zhang W., Ma J. A review on additives-assisted ultrasound for organic pollutants degradation // *J. Hazard. Mater.* 2021. V. 403. Art. 123915. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123915>.
32. Srivastava V. Grand challenges in chemical treatment of hazardous pollutants // *Front. Environ. Chem.* 2021. V. 2. Art. 792814. <https://doi.org/10.3389/fenvc.2021.792814>.
33. Алоян Р.М., Федосеев В.Н., Виноградова Н.В., Зайцева И.А. Возможности и проблемы энергоэффективных и энергосберегающих технологий в строительстве и текстильной промышленности // *Известия высших учебных заведений. Технология текстильной промышленности.* 2017. № 5 (371). С. 196–198.
34. Осадчий Ю.П., Блиничев В.Н. Баромембранная очистка сточных вод, содержащих пигменты и кислотные красители // *Известия высших учебных заведений. Технология текстильной промышленности.* 2007. № 5 (301). С. 64–66.
35. Апель П.Ю., Бобрешова О.В., Волков А.В., Волков В.В., Никоненко В.В., Стенина И.А., Филиппов А.Н., Ямпольский Ю.П., Ярославцев А.Б. Перспективы развития мембранной науки // *Мембраны и мембранные технологии.* 2019. Т. 9, № 2. С. 59–80. <https://doi.org/10.1134/S2218117219020020>.
36. Feng X., Peng D., Zhu J., Wang Y., Zhang Y. Recent advances of loose nanofiltration membranes for dye/salt separation // *Sep. Purif. Technol.* 2022. V. 285. Art. 120228. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2021.120228>.
37. Chauhan P., Sharma M., Nehra S., Sharma R., Kumar D. Dye removal from industrial water using nanofiltration membrane // Ahmad A., Alshammari M.B. (Eds.) *Nanofiltration Membrane for Water Purification. Ser.: Sustainable Materials and Technology.* Singapore: Springer, 2023. P. 83–117. https://doi.org/10.1007/978-981-19-5315-6_6.
38. Yang L., Xia C., Jiang J., Chen X., Zhou Y., Yuan C., Bai L., Meng S., Cao G. Removal of antibiotics and estrogens by nanofiltration and reverse osmosis membranes // *J. Hazard. Mater.* 2024. V. 461. Art. 132628. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.132628>.
39. Zheng F., Wang Y. Removal of antibiotics and antibiotic resistance genes by self-assembled nanofiltration membranes with tailored selectivity // *J. Membr. Sci.* 2022. V. 659. Art. 120836. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2022.120836>.
40. Guo X., Zhao B., Wang L., Zhang Z., Li J., Gao Z. High flux nanofiltration membrane via surface modification using spirocyclic quaternary ammonium diamine for ef-

- efficient antibiotics/salt separation // *Sep. Purif. Technol.* 2023. V. 325. Art. 124736. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2023.124736>.
41. *Cheng X.Q., Liu Y., Guo Z., Shao L.* Nanofiltration membrane achieving dual resistance to fouling and chlorine for “green” separation of antibiotics // *J. Membr. Sci.* 2015. V. 493. P. 156–166. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2015.06.048>.
 42. *Zhao S., Yao Y., Ba C., Zheng W., Economy J., Wang P.* Enhancing the performance of poly-ethylenimine modified nanofiltration membrane by coating a layer of sulfonated poly(ether ether ketone) for removing sulfamerazine // *J. Membr. Sci.* 2015. V. 492. P. 620–629. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2015.03.017>.
 43. *Thakur V.K., Voicu S.I.* Recent advances in cellulose and chitosan-based membranes for water purification: A concise review // *Carbohydr. Polym.* 2016. V. 146. P. 148–165. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.03.030>.
 44. *Fan J., Zhang S., Li F., Yang Y., Du M.* Recent advances in cellulose-based membranes for their sensing applications // *Cellulose.* 2020. V. 27, No 16. P. 9157–9179. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03445-7>.
 45. *Rana A.K., Gupta V.K., Saini A.K., Voicu S.I., Abdellattifaand M.H., Thakur V.K.* Water desalination using nanocelluloses/cellulose derivatives-based membranes for sustainable future // *Desalination.* 2021. V. 520. Art. 115359. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2021.115359>.
 46. *Тепляков В.В., Шалыгин М.Г., Козлова А.А., Чистяков А.В., Цодиков М.В., Непрусов А.И.* Мембранные технологии в биопереработке лигноцеллюлозы в компоненты моторных топлив // *Мембраны и мембранные технологии.* 2017. Т. 7, № 4. С. 228–246. <https://doi.org/10.1134/S2218117217040083>.
 47. *Medronho B., Lindman B.* Competing forces during cellulose dissolution: From solvents to mechanisms // *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2014. V. 19, No 1. P. 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2013.12.001>.
 48. *Medronho B., Lindman B.* Brief overview on cellulose dissolution/regeneration interactions and mechanisms // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2015. V. 222. P. 502–508. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2014.05.004>.
 49. *Acharya S., Liyanage S., Parajuli P., Rumi S.S., Shamshina J.L., Abidi N.* Utilization of cellulose to its full potential: A review on cellulose dissolution, regeneration, and applications // *Polymers.* 2021. V. 13, No 24. Art. 4344. <https://doi.org/10.3390/polym13244344>.
 50. *Loftsson T., Masson M., Sigurdsson H.H.* Cyclodextrins and drug permeability through semi-permeable cellophane membranes // *Int. J. Pharm.* 2002. V. 232, No 1–2. P. 35–43. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00895-X](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00895-X).
 51. *Tomé L.C., Gonçalves C.M.B., Boaventura M., Brandão L., Mendes A.M., Silvestre A.J.D., Neto C.P., Gandini A., Freire C.S.R., Marrucho I.M.* Preparation and evaluation of the barrier properties of cellophane membranes modified with fatty acids // *Carbohydr. Polym.* 2011. V. 83, No 2. P. 836–842. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.08.060>.
 52. *Craddock P.R., Fehr J., Dalmaso A.P., Brigham K.L., Jacob H.S.* Hemodialysis leukopenia. Pulmonary vascular leukostasis resulting from complement activation by dialyzer cellophane membranes // *J. Clin. Invest.* 1977. V. 59, No 5. P. 879–888. <https://doi.org/10.1172/JCI108710>.
 53. *Wu J., Yuan Q.* Gas permeability of a novel cellulose membrane // *J. Membr. Sci.* 2002. V. 204, No 1–2. P. 185–194. [https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(02\)00037-6](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(02)00037-6).
 54. *Кокоулина Е.В., Лихтендалер Р.Н.* Сорбционные свойства органических растворителей в непористых полимерных мембранах // *Вестник СПбГУ. Сер. 4.* 2007. № 2. С. 114–120.
 55. *Кузнецов В.М., Тойкка А.М., Кузнецов Ю.П.* Зависимость селективности первапорации от давления и сорбционные свойства пленочной полимерной мембраны // *Журн. прикл. хим.* 2007. Т. 80, № 6. С. 928–931.

56. Кузнецов В.М., Кокоулина Е.В., Тойка А.М. Влияние давления пермеата на селективность первапорационного разделения водно-этанольных смесей с использованием пленочной целлофановой мембраны // Вестник СПбГУ. Сер. 4. 2005. № 3. С. 68–71.
57. Кузнецов В.М., Тойка А.М., Кокоулина Е.В. Фазовые переходы в процессе испарения через непористую полимерную мембрану // Вестник СПбГУ. Сер. 4. 2004. № 3. С. 52–59.
58. Левенкова И.О. Мембраны в практике программного диализа // Медицинская сестра. 2008. № 2. С. 11–12.
59. Рыбакова А.И., Саутина Н.В., Головешкина Д.Ю., Галяметдинов Ю.Г. Кинетика массопереноса аминокислот различной структуры в обратных микроэмульсиях // Вестник Технологического университета. 2020. Т. 23, № 4. С. 38–43.
60. Eliseeva T., Kharina A. Desalination of neutral amino acid solutions in an electromembrane system // Membranes. 2022. V. 12, No 7. Art. 665. <https://doi.org/10.3390/membranes12070665>.
61. Liu J., Xu Q., Jiang J. A molecular simulation protocol for swelling and organic solvent nanofiltration of polymer membranes // J. Membr. Sci. 2019. V. 573. P. 639–646. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2018.12.035>.
62. Soltane H.B., Roizard D., Favre E. Effect of pressure on the swelling and fluxes of dense PDMS membranes in nanofiltration: An experimental study // J. Membr. Sci. 2013. V. 435. P. 110–119. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2013.01.053>.
63. Volkov A., Yushkin A., Grekhov A., Shutova A., Bazhenov S., Tsarkov S., Khotimsky V., Vlugt T.J.H., Volkov V. Liquid permeation through PTMSP: One polymer for two different membrane applications // J. Membr. Sci. 2013. V. 440. P. 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2013.03.067>.
64. Volkov A., Yushkin A., Kachula Y., Khotimsky V., Volkov V. Application of negative retention in organic solvent nanofiltration for solutes fractionation // Sep. Purif. Technol. 2014. V. 124. P. 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2013.12.044>.
65. Gevers L.E., Meyen G., de Smet K., van de Velde P., Du Prez F., Vankelecom I.F., Jacobs P.A. Physico-chemical interpretation of the SRNF transport mechanism for solutes through dense silicone membranes // J. Membr. Sci. 2006. V. 274, No 1–2. P. 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2005.08.009>.
66. Tsarkov S., Khotimskiy V., Budd P.M., Volkov V., Kukushkina J., Volkov A. Solvent nanofiltration through high permeability glassy polymers: effect of polymer and solute nature // J. Membr. Sci. 2012. V. 423–424. P. 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2012.07.026>.
67. Schlackl K., Bischof R.H., Samhaber W. Negative retention by the nanofiltration of aqueous biomass hydrolysates derived from wood pulping // Sep. Purif. Technol. 2020. V. 242. Art. 116773. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.116773>.
68. Hansen C.M. Hansen Solubility Parameters: A User's Handbook. 2 ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2007. 544 p. <https://doi.org/10.1201/9781420006834>.
69. Владипор. Мембраны из Полиамида марки ОПМН-П. URL: <https://vladipor.ru/katalog/laboratornaja-filtracija/membrany-iz-poliamida-marki-opmn-p/>
70. Мирончук В.Г., Грушевская И.О., Кучерук Д.Д., Змиевский Ю.Г. Экспериментальное исследование влияния высокого давления на эффективность процесса наночистки молочной сыворотки при использовании мембран ОПМН-П // Мембраны и мембранные технологии. 2013. Т. 3, № 1. С. 3–6. <https://doi.org/10.1134/S2218117212040062>.
71. Jegal J., Lee K.-H. Nanofiltration membranes based on poly (vinyl alcohol) and ionic polymers // J. Appl. Polym. Sci. 1999. V. 72, No 13. P. 1755–1762. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19990624\)72:13<1755::AID-APP11>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19990624)72:13<1755::AID-APP11>3.0.CO;2-R).

72. *Anokhina T., Dmitrieva E., Volkov A.* Recovery of model pharmaceutical compounds from water and organic solutions with alginate-based composite membranes // *Membranes*. 2022. V. 12, No 2. Art. 235. <https://doi.org/10.3390/membranes12020235>.
73. *Кононова С.В., Хрипунов А.К.* Мембрана для нанофильтрации в водных, спиртовых и водно-спиртовых средах. Патент РФ на изобретение № 2650670. 2018. Бюл. ФИПС № 11.
74. *Фазуллин Д.Д., Маврин Г.В.* Селективность и задерживающая способность композиционных мембран при нанофильтрации сильно загрязненных сточных вод // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2022. Т. 22, № 1. С. 69–78. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/9026>.
75. *Сапегин Д.А., Кононова С.В., Хрипунов А.К., Потокин И.Л.* Нанофильтрационная мембрана целлокон. Селективно-транспортные свойства // *Междисциплинарный молодежный научный форум «Новые материалы. Дни науки. Санкт-Петербург 2015»* (Санкт-Петербург, 20–22 октября 2015 г.). СПб.: Буки Веди, 2015. С. 112–114.

Поступила в редакцию 13.12.2023

Принята к публикации 30.03.2024

Юшкин Алексей Александрович, кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории полимерных мембран

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ордена Трудового Красного Знамени Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева Российской академии наук

Ленинский просп., д. 29, ГСП-1, г. Москва, 119991, Россия

E-mail: Halex@ips.ac.ru

Небеская Александра Павловна, младший научный сотрудник лаборатории полимерных мембран

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ордена Трудового Красного Знамени Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева Российской академии наук

Ленинский просп., д. 29, ГСП-1, г. Москва, 119991, Россия

E-mail: nebesskaya@ips.ac.ru

Грушевенко Евгения Александровна, кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории полимерных мембран

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ордена Трудового Красного Знамени Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева Российской академии наук

Ленинский просп., д. 29, ГСП-1, г. Москва, 119991, Россия

E-mail: evgrushevenko@ips.ac.ru

Малахов Александр Олегович, кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории полимерных мембран

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ордена Трудового Красного Знамени Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева Российской академии наук

Ленинский просп., д. 29, ГСП-1, г. Москва, 119991, Россия

E-mail: malakhov@ips.ac.ru

Анохина Татьяна Сергеевна, кандидат химических наук, и.о. заведующего лабораторией полимерных мембран

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ордена Трудового Красного Знамени Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева Российской академии наук

Ленинский просп., д. 29, ГСП-1, г. Москва, 119991, Россия

E-mail: tsanokhina@ips.ac.ru

Волков Алексей Владимирович, доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории полимерных мембран, советник директора

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ордена Трудового Красного Знамени Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева Российской академии наук

Ленинский просп., д. 29, ГСП-1, г. Москва, 119991, Россия

E-mail: avolkov@ips.ac.ru

ORIGINAL ARTICLE

doi: 10.26907/2542-064X.2024.2.187-209

**Cellophane-Based Membranes for Purification
of Aqueous Media from Various Pollutants***A.A. Yushkin**, *A.P. Nebesskaya***, *E.A. Grushevenko****, *A.O. Malakhov*****,*T.S. Anokhina******, *A.V. Volkov*******A.V. Topchiev Institute of Petrochemical Synthesis,
Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*E-mail: **Hallex@ips.ac.ru*, ***nebesskaya@ips.ac.ru*, ****evgrushevenko@ips.ac.ru*, *****malakhov@ips.ac.ru*, ******tsanokhina@ips.ac.ru*, ******avolkov@ips.ac.ru*

Received December 13, 2023; Accepted March 30, 2024

Abstract

The process of nanofiltration purification of water from various organic pollutants was examined. Cellophane film made from cheap natural raw materials was used as a membrane. The model substances targeted for removal were dyes (Safranin O, Orange II, and Remazol Brilliant Blue R, each differing in molecular weight, chemical composition, and charge) and ceftriaxone. The obtained cellophane permeability to water was 0.145 kg/(m²·h·atm). Cellophane membranes were found to be effective in retaining dissolved anionic substances containing acid groups. When Orange II and Remazol Brilliant Blue R were removed from the water, the retention coefficients were 97 ± 2 and 99 ± 1%, respectively. For the cationic dye Safranin O, the retention coefficient values were negative, -7 ± 3%. At the same time, ceftriaxone had the retention coefficient of only 41 ± 5%, which can be attributed to a combination of factors, such as its high affinity for cellophane and steric restrictions.

Keywords: membrane, cellophane, antibiotic, ceftriaxone, dye, filtration, fractionation**Acknowledgements.** This study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (project 13.2251.21.0166, project ID RF---2251.61322X0044; agreement ISTC BRICS 075-15-2022-1218).**Conflicts of Interest.** The authors declare no conflicts of interest.**Figure Captions**

Fig. 1. Dependence of the distilled water flux through a cellophane film on the applied transmembrane pressure.

Fig. 2. Changes in the retention coefficient *R* over time (transmembrane pressure 20 bar).Fig. 3. Effectiveness of Safranin O/Orange II fractionation during the filtration of the common water solution through the cellophane depending on the degree of permeate selection: *a*) Orange II/Safranin O ratio in the solution above the membrane; *b*) Safranin O/Orange II ratio in the solution under the membrane.**References**

1. Dhote J., Ingole S., Chavhan A. Review on wastewater treatment technologies. *Int. J. Eng. Res. Technol.*, 2012, vol. 1, no. 5, pp. 1–10.
2. Ezugbe E.O., Rathilal S. Membrane technologies in wastewater treatment: A review. *Membranes*, 2020, vol. 10, no. 5, art. 89. <https://doi.org/10.3390/membranes10050089>.

3. Rathi B.S., Kumar P.S., Vo D.-V.N. Critical review on hazardous pollutants in water environment: Occurrence, monitoring, fate, removal technologies and risk assessment. *Sci. Total Environ.*, 2021, vol. 797, art. 149134. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149134>.
4. Viktoriyová N., Szarka A., Hrouzková S. Recent developments and emerging trends in paint industry wastewater treatment methods. *Appl. Sci.*, 2022, vol. 12, no. 20, art. 10678. <https://doi.org/10.3390/app122010678>.
5. Gül Ü.D. A green approach for the treatment of dye and surfactant contaminated industrial wastewater. *Braz. J. Biol.*, 2019, vol. 80, no. 3, pp. 615–620. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.218064>.
6. Rodríguez Couto S. Dye removal by immobilized fungi. *Biotechnol. Adv.*, 2009, vol. 27, no. 3, pp. 227–235. <https://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.12.001>.
7. Nair K S., Manu B., Azhoni A. Sustainable treatment of paint industry wastewater: Current techniques and challenges. *J. Environ. Manage.*, 2021, vol. 296, art. 113105. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113105>.
8. Aniyikaiye T.E., Oluseyi T., Odiyo J.O., Edokpayi J.N. Physico-chemical analysis of wastewater discharge from selected paint industries in Lagos, Nigeria. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2019, vol. 16, no. 7, art. 1235. <https://doi.org/10.3390/ijerph16071235>.
9. Martínez J.L. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science*, 2008, vol. 321, no. 5887, pp. 365–367. <https://doi.org/10.1126/science.1159483>.
10. Anh H.Q., Le T.P.Q., Da Le N., Lu X.X., Duong T.T., Garnier J., Rochelle-Newall E., Zhang S., Oh N.-H., Oeurng C., Ekkawatpanit C., Nguyen T.D., Nguyen Q.T., Nguyen T.D., Nguyen T.N., Tran T.L., Kunisue T., Tanoue R., Takahashi S., Minh T.B., Le H.T., Pham T.N.M., Nguyen T.A.H. Antibiotics in surface water of East and Southeast Asian countries: A focused review on contamination status, pollution sources, potential risks, and future perspectives. *Sci. Total Environ.*, 2021, vol. 764, art. 142865. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142865>.
11. Liu X., Lu S., Guo W., Xi B., Wang W. Antibiotics in the aquatic environments: A review of lakes, China. *Sci. Total Environ.*, 2018, vol. 627, pp. 1195–1208. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.271>.
12. Sta Ana K.M., Madriaga J., Espino M.P. β -Lactam antibiotics and antibiotic resistance in Asian lakes and rivers: An overview of contamination, sources and detection methods. *Environ. Pollut.*, 2021, vol. 275, art. 116624. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116624>.
13. Kosenko I.M. Antibiotic resistance of bacteria is an old problem. Is there a solution? *Lech. Profil.*, 2019, vol. 9, no. 4, pp. 56–62. (In Russian)
14. Sulbarán Rangel B.C., Madrigal Oliveira A.E., Romero Arellano V.H., Guzmán González C.A. Nanomateriales celulósicos para la adsorción de contaminantes emergentes. *Tecnura*, 2019, vol. 23, no. 62, pp. 13–20. <https://doi.org/10.14483/22487638.15451>. (In Spanish)
15. Meneau-Hernández R.I., Millán-Arrieta J.A., Borrego-Morales K., Alba-Carranza M.D., Fariás-Piñeira T. Adsorción de ciprofloxacina en materiales zeolíticos. *Rev. Cubana Quím.*, 2021, vol. 33, no. 1, pp. 167–190. (In Spanish)
16. Afonina A.P., Burykina O.V. Study of the kinetics of sorption of industrial dye cationic pink 2C by clay material. *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved., Khim. Khim. Tekhnol.*, 2023, vol. 66, no. 9, pp. 123–128. <https://doi.org/10.6060/ivkkt.20236609.6775>. (In Russian)
17. Stavropoltseva A.S., Kaznacheeva A.A., Menshova I.I. Nonwoven-based sorbents in industrial wastewater treatment. *Usp. Khim. Khim. Tekhnol.*, 2023, vol. 37, no. 4 (266), pp. 123–125. (In Russian)
18. Gothwal R., Shashidhar T. Antibiotic pollution in the environment: A review. *Clean: Soil, Air, Water*, 2015, vol. 43, no. 4, pp. 479–489. <https://doi.org/10.1002/clen.201300989>.
19. Di J., Xia J., Ge Y., Li H., Ji H., Xu H., Zhang Q., Li H., Li M. Novel visible-light-driven CQDs/Bi₂WO₆ hybrid materials with enhanced photocatalytic activity toward organic pollutants degradation and mechanism insight. *Appl. Catal., B: Environ.*, 2015, vols. 168–169, pp. 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2014.11.057>.
20. Tsarenko A.D., Yatsenko A.N., Ulyankina A.A. Optimization of operating parameters for methylene blue photodegradation using nanosized zinc oxide. *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved., Sev.-Kavk. Reg., Tekh. Nauki*, 2022, no. 4, pp. 90–95. <http://dx.doi.org/10.17213/1560-3644-2022-4-90-95>. (In Russian)
21. Huang B., Wang H.-C., Cui D., Zhang B., Chen Z.-B., Wang A.-J. Treatment of pharmaceutical wastewater containing β -lactams antibiotics by a pilot-scale anaerobic membrane bioreactor (AnMBR). *Chem. Eng. J.*, 2018, vol. 341, pp. 238–247. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.01.149>.
22. Prado N., Ochoa J., Amrane A. Biodegradation of activated sludge and toxicity of tetracycline into a semi-industrial membrane bioreactor. *Bioresour. Technol.*, 2009, vol. 100, no. 15, pp. 3769–3774. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.11.039>.

23. Li B., Zhang T. Biodegradation and adsorption of antibiotics in the activated sludge process. *Environ. Sci. Technol.*, 2010, vol. 44, no. 9, pp. 3468–3473. <https://doi.org/10.1021/es903490h>.
24. Joss A., Keller E., Alder A.C., Göbel A., McArdell, C.S., Ternes T., Siegrist H. Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment. *Water Res.*, 2005, vol. 39, no. 14, pp. 3139–3152. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.05.031>.
25. Yang S.-F., Lin C.-F., Lin A.-Y.C., Hong P.-K.A. Sorption and biodegradation of sulfonamide antibiotics by activated sludge: Experimental assessment using batch data obtained under aerobic conditions. *Water Res.*, 2011, vol. 45, no. 11, pp. 3389–3397. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.03.052>.
26. Gubari M.Q., Alekseeva N.V., Baziyani G.I., Taha B.S. Methods for removing pigments from waste water. *Izv. TGPU. Inzh. Resur.*, 2021, vol. 332, no. 7, pp. 54–64. <https://doi.org/10.18799/24131830/2021/7/3263>. (In Russian)
27. Suarez S., Lema J.M., Omil F. Pre-treatment of hospital wastewater by coagulation–flocculation and flotation. *Bioresour. Technol.*, 2009, vol. 100, no. 7, pp. 2138–2146. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.11.015>.
28. Choi K.-J., Kim S.-G., Kim S.-H. Removal of antibiotics by coagulation and granular activated carbon filtration. *J. Hazard. Mater.*, 2008, vol. 151, no. 1, pp. 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.05.059>.
29. Ulrich E.V., Barkova A.S. Use of flocculants for wastewater treatment. *Transform. Ekosist.*, 2023, vol. 6, no. 1, pp. 168–187. (In Russian)
30. Naddeo V., Merić S., Kassinos D., Belgiorno V., Guida M. Fate of pharmaceuticals in contaminated urban wastewater effluent under ultrasonic irradiation. *Water Res.*, 2009, vol. 43, no. 16, pp. 4019–4027. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.05.027>.
31. Lu X., Qiu W., Peng J., Xu H., Wang D., Cao Y., Zhang W., Ma J. A review on additives-assisted ultrasound for organic pollutants degradation. *J. Hazard. Mater.*, 2021, vol. 403, art. 123915. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123915>.
32. Srivastava V. Grand challenges in chemical treatment of hazardous pollutants. *Front. Environ. Chem.*, 2021, vol. 2, art. 792814. <https://doi.org/10.3389/fenvc.2021.792814>.
33. Aloyan R.M., Fedoseev V.N., Vinogradova N.V., Zaytseva I.A. Opportunities and challenges of energy efficient and energy saving technologies in the construction and textile industry. *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved., Tekhnol. Tekstil'noi Prom-sti.*, 2017, no. 5 (371), pp. 196–198. (In Russian)
34. Osadchy Yu.P., Blinichev V.N. Baromembrane purification of wastewater containing pigments and acid dyes. *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved., Tekhnol. Tekstil'noi Prom-sti.*, 2007, no. 5 (301), pp. 64–66. (In Russian)
35. Apel P.Yu., Bobreshova O.V., Volkov A.V., Volkov V.V., Nikonenko V.V., Stenina I.A., Filippov A.N., Yampolskii Yu.P., Yaroslavtsev A.B. Prospects of membrane science development. *Membr. Membr. Technol.*, 2019, vol. 1, no. 2, pp. 45–63. <https://doi.org/10.1134/S2517751619020021>.
36. Feng X., Peng D., Zhu J., Wang Y., Zhang Y. Recent advances of loose nanofiltration membranes for dye/salt separation. *Sep. Purif. Technol.*, 2022, vol. 285, art. 120228. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2021.120228>.
37. Chauhan P., Sharma M., Nehra S., Sharma R., Kumar D. Dye removal from industrial water using nanofiltration membrane. In: Ahmad A., Alshammari M.B. (Eds.) *Nanofiltration Membrane for Water Purification*. Ser.: Sustainable Materials and Technology. Singapore, Springer, 2023, pp. 83–117. https://doi.org/10.1007/978-981-19-5315-6_6.
38. Yang L., Xia C., Jiang J., Chen X., Zhou Y., Yuan C., Bai L., Meng S., Cao G. Removal of antibiotics and estrogens by nanofiltration and reverse osmosis membranes. *J. Hazard. Mater.*, 2024, vol. 461, art. 132628. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.132628>.
39. Zheng F., Wang Y. Removal of antibiotics and antibiotic resistance genes by self-assembled nanofiltration membranes with tailored selectivity. *J. Membr. Sci.*, 2022, vol. 659, art. 120836. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2022.120836>.
40. Guo X., Zhao B., Wang L., Zhang Z., Li J., Gao Z. High flux nanofiltration membrane via surface modification using spirocyclic quaternary ammonium diamine for efficient antibiotics/salt separation. *Sep. Purif. Technol.*, 2023, vol. 325, art. 124736. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2023.124736>.
41. Cheng X.Q., Liu Y., Guo Z., Shao L. Nanofiltration membrane achieving dual resistance to fouling and chlorine for “green” separation of antibiotics. *J. Membr. Sci.*, 2015, vol. 493, pp. 156–166. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2015.06.048>.

42. Zhao S., Yao Y., Ba C., Zheng W., Economy J., Wang P. Enhancing the performance of polyethylenimine modified nanofiltration membrane by coating a layer of sulfonated poly(ether ether ketone) for removing sulfamerazine. *J. Membr. Sci.*, 2015, vol. 492, pp. 620–629. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2015.03.017>.
43. Thakur V.K., Voicu S.I. Recent advances in cellulose and chitosan based membranes for water purification: A concise review. *Carbohydr. Polym.*, 2016, vol. 146, pp. 148–165. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.03.030>.
44. Fan J., Zhang S., Li F., Yang Y., Du M. Recent advances in cellulose-based membranes for their sensing applications. *Cellulose*, 2020, vol. 27, no. 16, pp. 9157–9179. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03445-7>.
45. Rana A.K., Gupta V.K., Saini A.K., Voicu S.I., Abdellattifaand M.H., Thakur V.K. Water desalination using nanocelluloses/cellulose derivatives based membranes for sustainable future. *Desalination*, 2021, vol. 520, art. 115359. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2021.115359>.
46. Teplyakov V.V., Shalygin M.G., Kozlova A.A., Chistyakov A.V., Tsodikov M.V., Netrusov A.I. Membrane technology in bioconversion of lignocellulose to motor fuel components. *Pet. Chem.*, 2017, vol. 57, no. 9, pp. 747–762. <https://doi.org/10.1134/S0965544117090080>.
47. Medronho B., Lindman B. Competing forces during cellulose dissolution: From solvents to mechanisms. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2014, vol. 19, no. 1, pp. 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2013.12.001>.
48. Medronho B., Lindman B. Brief overview on cellulose dissolution/regeneration interactions and mechanisms. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2015, vol. 222, pp. 502–508. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2014.05.004>.
49. Acharya S., Liyanage S., Parajuli P., Rumi S.S., Shamshina J.L., Abidi N. Utilization of cellulose to its full potential: A review on cellulose dissolution, regeneration, and applications. *Polymers*, 2021, vol. 13, no. 24, art. 4344. <https://doi.org/10.3390/polym13244344>.
50. Loftsson T., Masson M., Sigurdsson H.H. Cyclodextrins and drug permeability through semi-permeable cellophane membranes. *Int. J. Pharm.*, 2002, vol. 232, nos. 1–2, pp. 35–43. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00895-X](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00895-X).
51. Tomé L.C., Gonçalves C.M.B., Boaventura M., Brandão L., Mendes A.M., Silvestre A.J.D., Neto C.P., Gandini A., Freire C.S.R., Marrucho I.M. Preparation and evaluation of the barrier properties of cellophane membranes modified with fatty acids. *Carbohydr. Polym.*, 2011, vol. 83, no. 2, pp. 836–842. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.08.060>.
52. Craddock P.R., Fehr J., Dalmasso A.P., Brighan K.L., Jacob H.S. Hemodialysis leukopenia. Pulmonary vascular leukostasis resulting from complement activation by dialyzer cellophane membranes. *J. Clin. Invest.*, 1977, vol. 59, no. 5, pp. 879–888. <https://doi.org/10.1172/JCI1108710>.
53. Wu J., Yuan Q. Gas permeability of a novel cellulose membrane. *J. Membr. Sci.*, 2002, vol. 204, nos. 1–2, pp. 185–194. [https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(02\)00037-6](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(02)00037-6).
54. Kokoulina E.V., Lichtenthaler R.N. Sorption properties of organic solvents in nonporous polymeric membranes. *Vestn. SPbGU. Ser. 4*, 2007, no. 2, pp. 114–120. (In Russian)
55. Kuznetsov V.M., Toikka A.M., Kuznetsov Yu.P. Pervaporation selectivity as a function of pressure and sorption properties of a polymeric film membrane. *Russ. J. Appl. Chem.*, 2007, vol. 80, no. 6, pp. 904–908. <https://doi.org/10.1134/S1070427207060109>.
56. Kuznetsov V.M., Kokoulina E.V., Toikka A.M. The influence of permeate pressure on the selectivity of pervaporation of ethanol–water mixtures using cellophane film membrane. *Vestn. SPbGU. Ser. 4*, 2005, no. 3, pp. 68–71. (In Russian)
57. Kuznetsov V.M., Toikka A.M., Kokoulina E.V. Phase transitions in the process of evaporation through nonporous polymer membrane. *Vestn. SPbGU. Ser. 4*, 2004, no. 3, pp. 52–59. (In Russian)
58. Levenkova I.O. Membranes in the practice of program dialysis. *Med. Sestra*, 2008, no. 2, pp. 11–12. (In Russian)
59. Rybakova A.I., Sautina N.V., Goloveshkina D.Yu., Galyametdinov Yu.G. Kinetics of the mass transfer of amino acids with varying structures in reverse microemulsions. *Vestn. Tekhnol. Univ.*, 2020, vol. 23, no. 4, pp. 38–43. (In Russian)
60. Eliseeva T., Kharina A. Desalination of neutral amino acid solutions in an electromembrane system. *Membranes*, 2022, vol. 12, no. 7, art. 665. <https://doi.org/10.3390/membranes12070665>.
61. Liu J., Xu Q., Jiang J. A molecular simulation protocol for swelling and organic solvent nanofiltration of polymer membranes. *J. Membr. Sci.*, 2019, vol. 573, pp. 639–646. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2018.12.035>.

62. Soltane H.B., Roizard D., Favre E. Effect of pressure on the swelling and fluxes of dense PDMS membranes in nanofiltration: An experimental study. *J. Membr. Sci.*, 2013, vol. 435, pp. 110–119. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2013.01.053>.
63. Volkov A., Yushkin A., Grekhov A., Shutova A., Bazhenov S., Tsarkov S., Khotimsky V., Vlugt T.J.H., Volkov V. Liquid permeation through PTMSP: One polymer for two different membrane applications. *J. Membr. Sci.*, 2013, vol. 440, pp. 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2013.03.067>.
64. Volkov A., Yushkin A., Kachula Y., Khotimsky V., Volkov V. Application of negative retention in organic solvent nanofiltration for solutes fractionation. *Sep. Purif. Technol.*, 2014, vol. 124, pp. 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2013.12.044>.
65. Gevers L.E., Meyen G., de Smet K., van de Velde P., Du Prez F., Vankelecom I.F., Jacobs P.A. Physico-chemical interpretation of the SRNF transport mechanism for solutes through dense silicone membranes. *J. Membr. Sci.*, 2006, vol. 274, nos. 1–2, pp. 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2005.08.009>.
66. Tsarkov S., Khotimskiy V., Budd P.M., Volkov V., Kukushkina J., Volkov A. Solvent nanofiltration through high permeability glassy polymers: Effect of polymer and solute nature. *J. Membr. Sci.*, 2012, vols. 423–424, pp. 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2012.07.026>.
67. Schlackl K., Bischof R.H., Samhaber W. Negative retention by the nanofiltration of aqueous biomass hydrolysates derived from wood pulping. *Sep. Purif. Technol.*, 2020, vol. 242, art. 116773. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.116773>.
68. Hansen C.M. *Hansen Solubility Parameters: A User's Handbook*. 2 ed. Boca Raton, FL, CRC Press, 2007, 544 p. <https://doi.org/10.1201/9781420006834>.
69. Vladipor. OPMN-P polyamid membranes. URL: <https://vladipor.ru/katalog/laboratornaja-filtracija/membrany-iz-poliamida-marki-opmn-p/>. (In Russian)
70. Myronchuk V.G., Grushevskaya I.O., Kucheruk D.D., Zmievskiy Yu.G. Experimental study of the effect of high pressure on the efficiency of whey nanofiltration process using an OPMN-P membrane. *Pet. Chem.*, 2013, vol. 53, no. 7, pp. 439–443. <https://doi.org/10.1134/S0965544113070116>.
71. Jegal J., Lee K.-H. Nanofiltration membranes based on poly (vinyl alcohol) and ionic polymers. *J. Appl. Polym. Sci.*, 1999, vol. 72, no. 13, pp. 1755–1762. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19990624\)72:13<1755::AID-APP11>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19990624)72:13<1755::AID-APP11>3.0.CO;2-R).
72. Anokhina T., Dmitrieva E., Volkov A. Recovery of model pharmaceutical compounds from water and organic solutions with alginate-based composite membranes. *Membranes*, 2022, vol. 12, no. 2, art. 235. <https://doi.org/10.3390/membranes12020235>.
73. Kononova S.V., Khripunov A.K. Membrane for nanofiltration in water, alcohol, and water–alcohol media. Patent RF no. 2650670. *Byull. FIPS*, 2018, no. 11. (In Russian)
74. Fazullin D.D., Mavrin G.V. Selectivity and retention capacity of composite membranes for nanofiltration of heavily polluted wastewater. *Sorbts. Khromatogr. Protsessy*, 2022, vol. 22, no. 1, pp. 69–78. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/9026>. (In Russian)
75. Sapegin D.A., Kononova S.V., Khripunov A.K., Potokin I.L. Cellocon nanofiltration membrane. Selective transport properties. *Mezhdistsiplinaryni molodezhnyi nauchnyi forum "Novye materialy. Dni nauki. Sankt-Peterburg 2015" (Sankt-Peterburg, 20–22 oktyabrya 2015 g.)* [Proc. Interdiscip. Youth Sci. Forum "New Materials. Science Days. Saint Petersburg 2015" (St. Petersburg, Oct. 20–22, 2015)]. St. Petersburg, Buki Vedi, 2015, pp. 112–114. (In Russian)

Для цитирования: Юшкин А.А., Небеская А.П., Грушевенко Е.А., Малахов А.О., Анохина Т.С., Волков А.В. Мембраны на основе целлофана для очистки водных сред от загрязнителей различной природы // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2024. Т. 166, кн. 2. С. 187–209. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2024.2.187-209>.

For citation: Yushkin A.A., Nebesskaya A.P., Grushevenko E.A., Malakhov A.O., Anokhina T.S., Volkov A.V. Cellophane-based membranes for purification of aqueous media from various pollutants. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2024, vol. 166, no. 2, pp. 187–209. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2024.2.187-209>. (In Russian)

ORIGINAL ARTICLE

UDC 546.05

doi: 10.26907/2542-064X.2024.2.210-228

Anomalous Conductive Properties of Polymer Composites with Carbon Nanotubes: Why Power Laws Are Not Universal

T.L. Khamidullin^a, I.V. Lounev^a, S.A. Sattarov^b, A.M. Dimiev^a

^aKazan Federal University, Kazan, 420008 Russia

^bJizzakh Polytechnical Institute, Jizzakh, 130100 Republic of Uzbekistan

Abstract

The conductive properties of CNT/polymer composites have been extensively studied. However, the impact of CNT distribution in the matrix on the composite polarization remains underexplored and poorly understood. Since it is difficult to achieve a uniform distribution of CNTs in polymers, most researchers have focused only on indiscriminately aggregated states. In this article, a new blending method was suggested to prepare a series of epoxy resin-based composite samples with varying levels of CNT uniformity/aggregation and the same filling fractions. Notably, the permittivity values turned out to be inversely related to the composite uniformity: the lowest permittivity values were obtained in the most uniform formulation, and vice versa. With 0.1% CNT, the real part values of the most uniform and aggregated samples were 6.6 and 16.2 at 10^7 Hz and 11.6 and 370.5 at 10^1 Hz, respectively. For the filler content of 0.1–0.5%, the conductive properties were largely determined by the distribution of CNTs and not their content. Within the entire frequency range, the uniform sample with 0.2% CNT exhibited significantly lower permittivity than the aggregated sample with 0.1% CNT. These findings emphasize the importance of the aggregation factor and underscore the non-universality and limitations of the percolation theory and power laws. The observed phenomenon is best explained by the micro-capacitor model, or the Maxwell–Wagner polarization, and suggests that a significant portion of the literature in the field needs to be reconsidered.

Keywords: epoxy resin composites, carbon nanotubes, interfacial polarization, permittivity, aggregation, microcapacitor model

Introduction

The permittivity of dielectric materials is their ability to interact with electromagnetic radiation, which must be controlled and adjusted for various applications, such as electromagnetic shielding, remote sensing, antennas, high-density energy storage, antistatic protection, self-heating, etc. Introducing conductive inclusions into the otherwise nonconductive polymer host is one of the simplest ways to enhance the permittivity of dielectric materials [1]. Among various types of conductive fillers, carbon nanostructures stand out for their unique properties and thus have gained a great deal of attention from the research community [2–4]. This is especially true for carbon nanotubes (CNTs) and graphene nanoribbons (GNRs) distinguished by high electrical conductivity and aspect ratio [5–13]. The latter property is the main reason for relatively low filling fractions needed to reach high permittivity values. However, despite

all advantages, CNTs have one inherent limitation when used as a filler: characterized by a very low affinity for most known polymers, they tend to aggregate in the polymer matrix [14], and, as a result, the properties of carbon/polymer composites become degraded. There is a strong consensus in the field that a more uniform distribution of CNTs yields better mechanical and conductive properties [14–16].

The underlying physics behind the electromagnetic behavior of dielectric composites remains elusive. Researchers have been trying to interpret their conductive properties through multiple theories and models. The percolation theory and power laws, which explain the macroscopic parameters of composites based on the statistical distribution of inclusions and predict a sharp increase in the tested property near the percolation threshold, are among the most widely employed ones [17–20]. They have proven to be a valuable tool in understanding the conductivity and permittivity of complex systems [17, 20, 21]. Although the power laws are popular and relatively accurate in describing certain complex materials, experiments have failed to verify their universality. Hence, the percolation threshold values for CNTs in composites are still a matter of debate. The reported values range from 0.002% to over 4% depending on CNT type, matrix composition, and processing techniques [22]. The problem is that the percolation theory ignores the chemical nature of the two phases, i.e., the cohesive forces between the host material and inclusions. In actual systems, when a liquid resin has a strong affinity for the inclusion material, it always wets the surface of the inclusion particles, creating a thin polymer layer between the neighboring particles, even at high filling fractions. Formally, the system will never reach true percolation in terms of DC conductivity. In modern literature, the term “percolation threshold” refers to the filling fractions at which the AC conductivity and/or permittivity exhibit a non-monotonous behavior with respect to the filler fraction [5, 23–27].

Alongside the percolation theory, the “microcapacitor model” has been recently introduced to explain the dielectric behavior of composites [9, 26–28]. This model considers composites as a network of microcapacitors distributed randomly in the dielectric host. In its essence this model is another wording for the interfacial polarization, often referred to as the Maxwell–Wagner polarization. Unlike the power laws, it provides a physical explanation for the observed phenomena with experimental support. For example, in our earlier study [29], we fabricated an anisotropic graphene/epoxy composite with the graphene layers arranged parallel to each other, resembling a battery of microcapacitors within the entire macroscopic sample. The permittivity values were significantly higher when measured in the direction where the 2D microcapacitor plates were arranged perpendicular to the applied electromagnetic field, i.e., similarly to the classical capacitor, compared to when they were aligned parallel. In case of the 1D CNTs, such anisotropy is less pronounced but detectable [15].

Several recent publications have emphasized the importance of the interface between CNTs and the matrix. In [9, 30], the CNT/polymer interfacial structure was modified using the covalent and non-covalent functionalization, resulting in the changes in conductivity/permittivity. The interface structure influences the charge accumulation and transfer through the interface, suggesting the need for more in-depth investigation. Nevertheless, in the available literature, the debates over this issue often lack scientific rigor [31, 32] and simply mention some “interface effect”, which does not help in understanding the physical mechanisms of polarization.

There is not much research on how the aggregation of CNTs affects the conductive properties of composites. On the one hand, the aggregation has been actively discussed, and the common opinion is that a more uniform distribution is necessary to achieve higher permittivity values [9, 33], often through CNT functionalization. On the other hand, very few studies, if any, provide a direct comparison between samples with different levels of CNT aggregation at the same filler content. For example, Li et al. [22] examined the correlation between the degree of CNT aggregation and the percolation threshold. They developed a mathematical model for the relationship between the percolation threshold and the following two distribution parameters: “localized volume content of CNTs in an agglomerate” and “volume fraction of agglomerated CNTs.” According to their model, the percolation threshold increases with the second parameter, but no straightforward conclusions were made about whether CNT aggregation leads to higher or lower permittivity values.

Many publications in the field ignore the impact of CNT aggregation on their results, and the vast majority of researchers explore materials containing CNTs in an indiscriminately aggregated state. One reason for this oversight may be the absence of straightforward methods to precisely control the degree of CNT aggregation while keeping all other parameters constant. Whereas aggregated samples are relatively easy to prepare, obtaining a non-aggregated uniform distribution is challenging.

In this study, we develop a method for controlling the distribution of CNTs in the epoxy resin matrix. Based on this method, we prepare a series of samples with varying but controlled degrees of uniformity/aggregation of CNTs in the polymer matrix at the same filler content. The resulting composites demonstrated significant differences in their permittivity values.

1. Material and Methods

1.1. Material. Tuball CNTs (batch #01RW02.N1.208) with a purity of > 80% and a catalyst content of < 15% were purchased from OCSiAl. The epoxy resin (NPEL-128, epoxy value 22.6, epoxide equivalent weight 186.2 g eq.⁻¹) from bisphenol-A and epichlorohydrin was obtained from Rus Chemicals Group (Russia). The hardener, polyethylene polyamine, was provided by Resurs Group (Russia). Isopropyl alcohol (IPA), graphite (the GL-1 grade), sulfuric acid, and potassium permanganate were supplied by TatKhimProduct (Russia). All commercial reagents and solvents were used as received without further purification.

1.2. Preparation of modified CNTs/epoxy composites

1.2.1. Oxidative modification of CNTs. CNTs (110.6 mg) were dispersed in 56.3 mL of concentrated sulfuric acid and stirred overnight using a magnetic stirrer. Then, 77.42 mg of potassium permanganate were added and stirred for 8 h. The reaction was quenched with ice made from deionized (DI) water. The mixture was centrifuged at 4000 rpm for 30 min in order to separate CNTs from the diluted acid. The precipitated CNTs were redispersed in a new portion of DI water, stirred for 1 h, and centrifuged again. These steps constituted one purification cycle. Four more purification cycles were performed consecutively. After the final precipitation, the as-washed CNTs were dried at ambient conditions. The as-obtained CNTs were denoted as modified CNTs (mCNTs).

1.2.2. Preparation of mCNT/epoxy formulations. mCNTs were dispersed in IPA using an ultrasonic bath. The temperature in the bath was maintained at 25–35 °C. It took about 3 h of sonication to achieve homogeneous dispersion with no particles discernible to the naked eye. The critical factor was the very low (0.015%) content of mCNTs in IPA. At this concentration, a homogeneous solution with no visible aggregates was obtained, which was not possible with higher concentrations. This solution was used to prepare samples with the “best” and “good” mCNT distribution. To prepare the formulations with the “bad” mCNT distribution, the initial diluted homogeneous solution was evaporated to reach the mCNT content of 0.5%. For the “worst” mCNT distribution, IPA was evaporated to reach the mCNT content of 3%. Subsequently, the as-prepared mCNT/IPA dispersions were blended with epoxy resin in certain proportions to reach the mCNT contents of 0.1, 0.2, and 0.5%. IPA was removed by evaporation at elevated temperature and reduced pressure with continuous stirring until constant weight. The formulations were sonicated in an ultrasonic bath at 80 °C for varying periods of time: 2 h for the best mCNT distribution, 30 min for the good mCNT distribution, and 5 min for the bad mCNT distribution. For the sample with the worst mCNT distribution, the formulation was not sonicated.

1.2.3. Curing the formulations. The curing was performed immediately after the sonication. First, the still hot formulation was degassed in a desiccator under reduced pressure for 20 min. Then, the hardener (polyethylene polyamine) was added in a weight ratio 10 : 1, and the mixture was blended manually and degassed again for 10 min. The degassed mixture was poured into molds and cured for 1 h at 60 °C followed by 2 h at 80 °C. For each tested formulation, three samples were prepared, and the measured permittivity values were almost the same for all of them.

1.3. Characterization of mCNTs and mCNT/epoxy formulations. The thermogravimetric analysis (TGA) of CNTs was performed with an STA 449 F5 Jupiter analyzer (Netzsch, Germany) in the argon atmosphere. Raman spectra of CNTs were acquired from the compressed powder sample using an ARS-3000 Raman microscope (Nano Scan Technology, Russia) equipped with the 532 nm excitation laser. The scanning electron microscopy (SEM) images were acquired with a Merlin high-resolution field-emission scanning electron microscope (Carl Zeiss, Germany) at an accelerating voltage of incident electrons of 5 kV and a current probe of 300 pA. The transmission electron microscopy (TEM) images were taken with a Hitachi HT7700 Excellence transmission electron microscope (Hitachi, Japan) at an accelerating voltage of 100kV in the TEM mode. The optical microscopy images were acquired from thin layers of the mCNT/epoxy formulations, sandwiched between a microscope slide and a cover slip, before adding the curing agent.

1.4. Dielectric measurements. The permittivity values were calculated from the capacitance measured with a Novocontrol BDS Concept-80 impedance analyzer (Novocontrol Technologies GmbH & Co. KG, Germany), with the automatic temperature control provided by the QUATRO cryo-system (temperature uncertainty ± 0.5 °C). The samples were placed between two gold-plated electrodes of the capacitor. The capacitor was attached to the thermostated testing head. The measurements were conducted in the frequency range from 10^{-1} to 10^7 Hz.

2. Results and Discussion

Most carbon-based materials, as stated above, have extremely low affinity for polymer matrices. The graphene oxide (GO)/epoxy resin system is a rare exception due to the high number of oxygen functional groups in the GO structure. Considering this property, the method of homogeneous liquid phase transfer (HLPT) of GO into epoxy resins has been introduced to ensure uniform distribution and fully exfoliated state of GO in the matrix [34]. The resulting GO distribution in epoxy resin leads to a significant transformation of the properties of both liquid formulations and solid polymer composites at extremely low filling fractions [35–37]. The strong affinity between GO and epoxy resin is the factor enabling it. To make carbon-based nanostructured materials compatible with epoxy resin, one needs to incorporate oxygen atoms into their structure. This was the strategy adopted in the present study to uniformly disperse CNTs in epoxy resin.

The oxidative modification of CNTs was performed with a $\text{KMnO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$ mixture, which is utilized in the Hummers graphite oxidation method. Complete oxidation, as outlined in the Hummers recipe, converts CNTs into a non-conductive material [38]. Hence, only a small amount of the oxidizer was added, i.e., 0.7 wt% eq. KMnO_4 relative to CNTs, as compared to 3–4 wt% eq. KMnO_4 used for the synthesis of GO and graphene oxide nanoribbons [39–41]. This oxidizer quantity was found to be optimal for achieving sufficient dispersibility of CNTs in epoxy resin and for simultaneously preserving their electrical conductivity. The characteristics of the modified CNTs (mCNTs) are shown in Fig. 1.

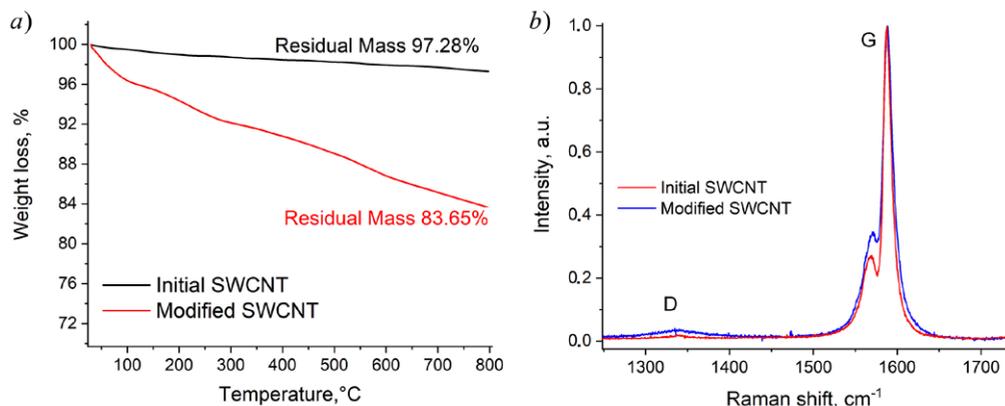


Fig. 1. Characteristics of mCNTs as compared to the original CNTs. *a*) TGA curves acquired in the argon atmosphere, *b*) Raman spectra acquired with a 533 nm excitation laser

The TGA of mCNTs revealed a weight loss of 16.3% at 800 °C (Fig. 1, *a*), which is much less than that for GO or oxidized graphene nanoribbons losing up to 55–60% of their original weight under similar conditions [38–42]. Notably, the TGA curve for mCNTs does not show a weight loss in the temperature range of 160–200 °C, which is characteristic of GO [43, 44]. The weight loss observed at the temperature above 300 °C is most likely associated with the removal of residual sulfuric acid trapped in the CNT bundles [38, 45], as well as with the decomposition of the catalyst-derived impurities, rather than with the decomposition of the oxygen groups. The Raman spectrum of mCNTs is very similar to that of the original CNTs (Fig. 1, *b*). The D-band is

only slightly enhanced, suggesting that the quantity of the introduced oxygen groups, serving as defects, was relatively low [46–48].

The Tuball CNTs analyzed in this study are very long and bundle with one another [49–52]. In the raw CNTs powder, there were CNT bundles with a diameter of 10–50 nm, consisting of tens of individual CNTs. The bundles could further twist to form secondary belt-like structures with a width up to 1 μm (Fig. 2, *a*). After the sonication in IPA, the secondary structures were easily untwisted to the primary bundles (Fig. 2, *b*). The primary CNT bundles are stable enough to resist isolation into individual CNTs until prolonged sonication of the dispersions with a low CNT content in aqueous surfactant solutions [51, 52]. Following the simple sonication in IPA, CNTs remained bundled (Fig. 2, *b*). After the oxidative modification, mCNTs retained their bundled state as well (Fig. 2, *c*). Thus, the smallest structural unit of CNTs in epoxy resin is a bundle with a diameter of 10–30 nm.

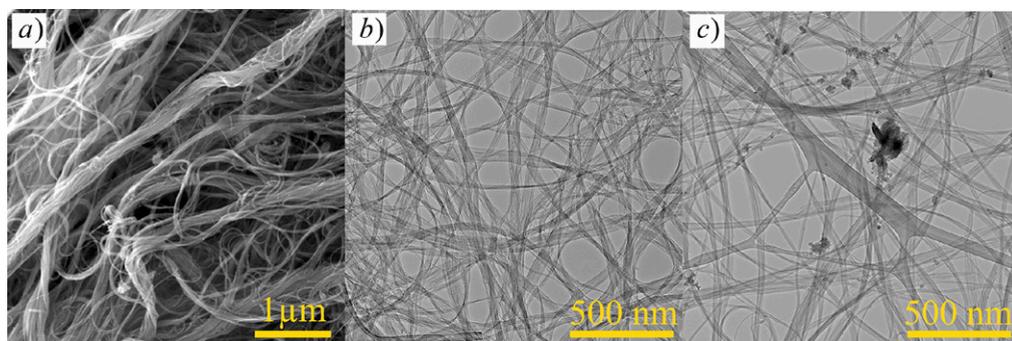


Fig. 2. Electron microscopy images of the original CNTs (*a*, *b*) and mCNTs (*c*). SEM image (*a*) and TEM images (*b*, *c*).

To incorporate mCNTs into epoxy resin, the HLPT method [34] was used. The degree of mCNT aggregation was controlled through the concentration of the mCNT/IPA dispersion and the time of sonication of the dispersion in hot epoxy resin after the blending. Overall, composites with three different mCNT contents in the matrix were obtained: 0.1, 0.2, and 0.5%, respectively. The mCNT content is hereinafter expressed as a weight percentage. For 0.1% mCNT, four types of composites with varying degrees of mCNT aggregation, from the most uniform distribution to the most aggregated state, were prepared. The respective samples were labeled as 0.1-best, 0.1-good, 0.1-bad, and 0.1-worst, in ascending order of the aggregation degree.

In Fig. 3, the optical microscopy images of the four uncured liquid CNT/epoxy formulations are given. The 0.1-best sample looks like clear epoxy resin (Fig. 3, *a*). However, even in this sample, mCNTs were thin bundles, as they appear in Fig. 2, *c*. These bundles were < 30 nm thick and thus undetectable by optical microscopy. Despite being invisible, mCNTs were still present in the resin. When the liquid formulation was left to stay for 30 min at 80 °C, mCNTs began to gradually agglomerate in the resin in the form of foggy patches (Fig. 4). The 0.1-good sample (Fig. 3, *b*) looked similar to 0.1-best sample after standing for 30 min at 80 °C. In addition to foggy agglomerates, the 0.1-bad sample contained large aggregates (up to 200 μm) comprising multiple CNT bundles (Fig. 3, *c*). The 0.1-worst sample prepared without sonication had numerous large aggregates (Fig. 3, *d*).

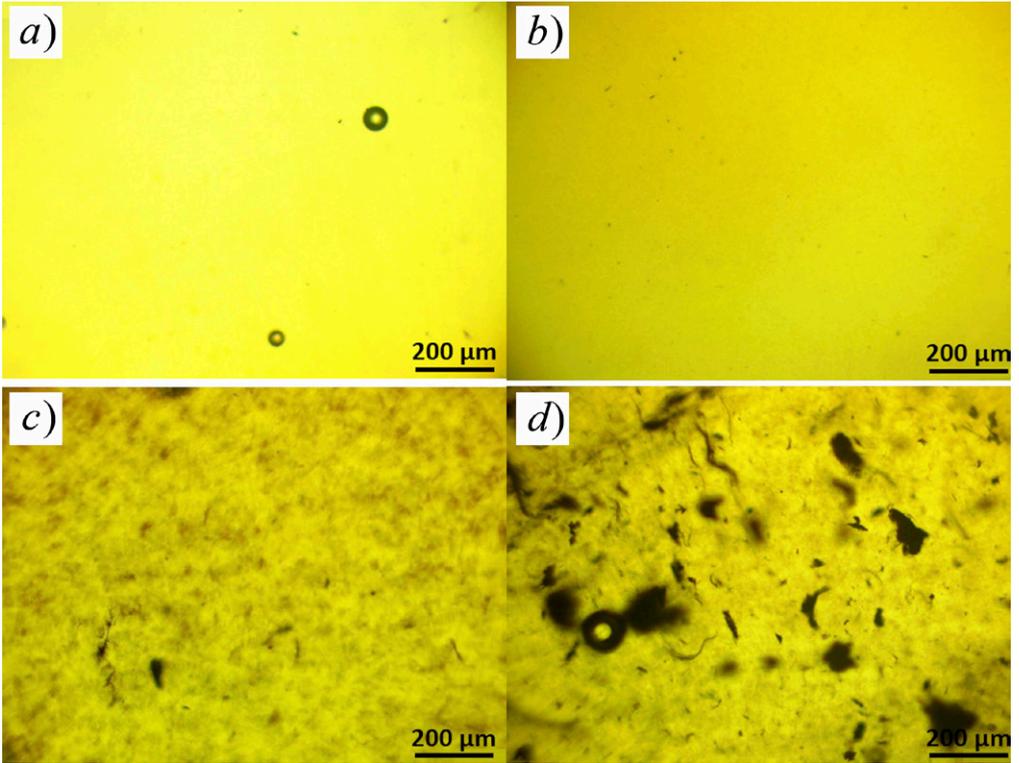


Fig. 3. Optical microphotographs of the four liquid mCNT/epoxy resin formulations with 0.1% CNT: for the best mCNT distribution (*a*), for the good CNT distribution (*b*), for the bad CNT distribution (*c*), and for the worst CNT distribution (*d*). The images were acquired in transmitted light mode from thin layers of the liquid formulations sandwiched between a microscope slide and a cover slip

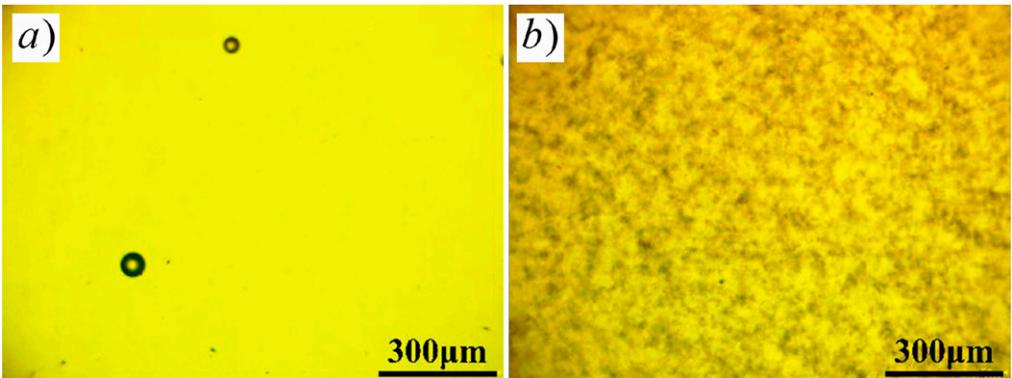


Fig. 4. Optical microphotographs of the liquid mCNT/epoxy resin formulation with 0.1% CNT (with the best CNT distribution): *a* – the as-prepared formulation immediately after the sonication; *b* – the same formulation after standing for 30 min at 80 °C. The images were acquired in transmitted light from thin layers of the liquid formulations sandwiched between a microscope slide and a cover slip

The optical microscopy findings are confirmed by the SEM images taken from the fracture surfaces of the solid polymer composites (Fig. 5). The 0.1-best sample had single CNT bundles (Fig. 5, *a*) protruding from the polymer matrix. The bundles did not split into individual CNTs. These observations further validate that a mCNT bundle is the

fundamental unit of the conductive inclusions in the composite. Besides single bundles (Fig. 4, *a*), many small-sized aggregates consisting of 3–5 bundles were detected. The 0.1-worst sample had numerous large aggregates, each comprising numerous bundles (Fig. 5, *b*). The bundles were located at different angles and distances from each other. Some of them merged with each other at certain points and diverged at others, thus constituting a percolated network. The aggregate visible in Fig. 4, *b* is most likely only the tip of the iceberg, with the main part lying under the fracture surface.

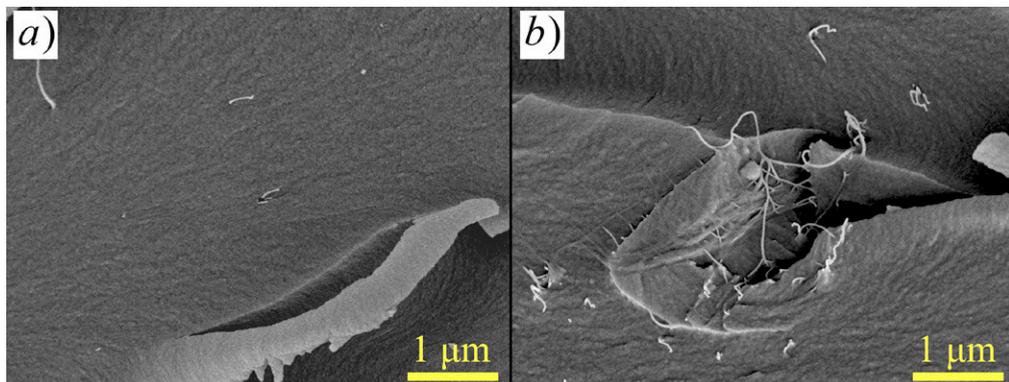


Fig. 5. SEM images of the fracture surfaces in the mCNT/epoxy composites: the samples with the best 0.1% CNT (*a*) and worst 0.1% CNT (*b*) distributions

The permittivity of the solid composites prepared from the four liquid formulations (Fig. 6) differs dramatically, even though they had the same content (0.1%) of the conductive filler. The obtained permittivity values were contrary to what one might expect: the samples with better CNT distribution had a lower permittivity, and vice versa. For the 0.1-best sample, the real part of the complex permittivity (Fig. 6, *a*) changed from 6.5 Hz at the high-frequency end through 17 Hz at the low-frequency end, i.e., it was only slightly higher than the permittivity of the neat epoxy polymer, which is ~ 3 in the full tested frequency range. At the same time, the permittivity of the 0.1% worst sample with large aggregates varied from 15.6 through 482 Hz. The curves for the 0.1-good and 0.1-bad samples are positioned between the curves of the two extreme samples.

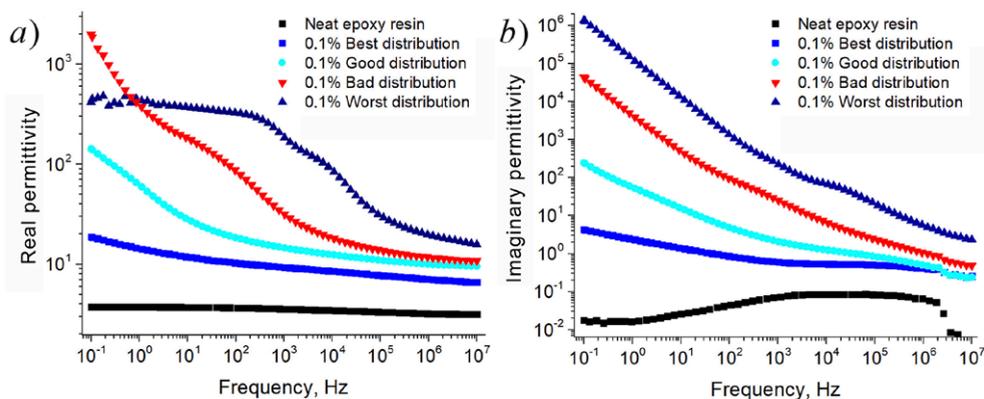


Fig. 6. Real (*a*) and imaginary (*b*) parts of the complex permittivity for the four samples with different level of CNT aggregation (CNT content 0.1%)

It is important that the differences between the samples are more pronounced in the low-frequency part of the tested region. In the high-frequency end, the differences are not that distinct: the real part values for the samples with the best and worst mCNT distributions were 6.5 and 15.6, respectively (Fig. 6, *a*). Nevertheless, at a frequency of 10^3 Hz, the respective values were 9.2 and 194, with a 21-fold difference between the two samples. Finally, at a frequency of 10^1 Hz, the permittivity values for the 0.1-best, 0.1-good, 0.1-bad, and 0.1-worst samples were 11.6, 27.3, 179.5, and 370.5, respectively.

The real part curve for the 0.1-best sample is almost flat, with only a slight increase towards frequencies lower than 10 Hz. In contrast, the 0.1-good sample has a more pronounced increase. The 0.1-bad sample exhibits an additional permittivity dispersion within the frequencies of 10^3 – 10^2 Hz. For the 0.1-worst sample, there are two permittivity dispersion ranges in the middle of the tested frequency interval. Therefore, the permittivity dispersion range gradually shifts toward higher frequencies in the 0.1-best to 0.1-worst samples.

The imaginary part of complex permittivity (Fig. 6, *b*) increases notably toward the low-frequency end of the spectra, which is especially evident in the aggregated samples. For these samples at frequencies $< 10^3$ Hz, the imaginary part surpasses the real part. The loss peaks are distinguishable, but they are partially obscured by the strong contribution of DC conductivity.

At higher mCNT loadings, it becomes more difficult to precisely control the mCNTs distribution in the matrix, if compared with 0.1% mCNT. Even at 0.2% mCNT, a sample completely free from aggregates cannot be obtained. As mCNT loadings increase, the difficulties scale up. Thus, for 0.2% and 0.5% mCNT, only two (not four) types of samples, with more and less uniform distribution, were prepared: the ones with “good” and “bad” mCNT distribution. At 0.5% mCNT, the uniform non-aggregated state cannot be achieved. Here, “0.5-good” means “intended good,” i.e., prepared according to the procedures for uniform samples. The measured permittivity values for the two 0.2% mCNT and two 0.5% mCNT samples are shown in Fig. 7.

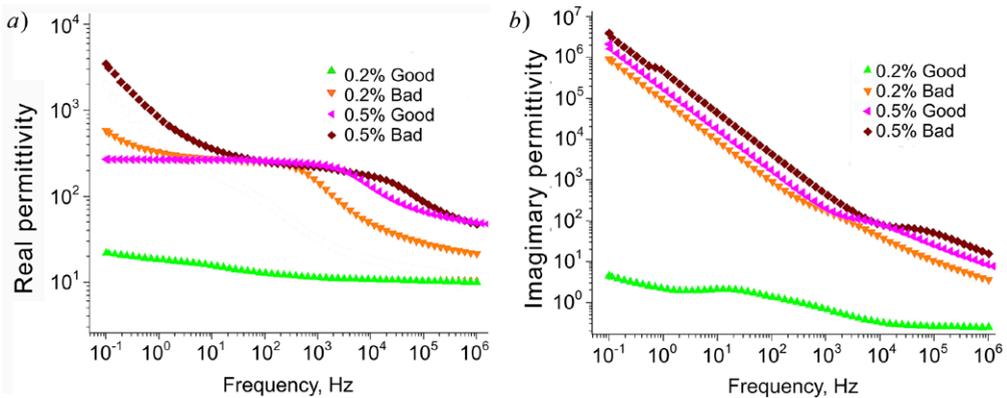


Fig. 7. Real (*a*) and imaginary (*b*) parts of the complex permittivity for the samples with 0.2% and 0.5% CNT content with two different levels of aggregation for each

For the samples with 0.2% mCNT, the same trend was observed as for 0.1% mCNT. In the 0.2-good samples, the real part of permittivity gradually changes from 10.2 to 21.4 (Fig. 7, *a*), which is similar to what was observed in the 0.1-best sample. The permittivity values of the 0.2-bad sample lie in the range of 23–286. Thus, at 0.2% loading, the two samples with different aggregation degree still differ significantly. However, at 0.5% mCNT, the difference between the two samples is minimal. In the frequency range of 10^2 – 10^6 Hz, the two curves almost overlap (Fig. 7, *a*). This is because mCNTs inevitably aggregate at 0.5% loading. This is why the samples with the filler content higher than 0.5% were not considered.

In our previous work [53], composites prepared from the raw non-modified Tuball CNTs and a silicon elastomer as a non-conductive matrix were tested. The CNTs in these composites were highly aggregated due to the low affinity toward the matrix. The size and shape of the CNT aggregates were similar to those in Fig. 3, *c* and *d*. The permittivity matched the values registered in this study for the highly aggregated samples. The following two conclusions were made based on the above results: first, the oxidative modification of CNTs does not significantly degrade their conductivity; second, the choice of the polymer matrix is not essential for the conductive properties of composites. The second conclusion is particularly important. The interfacial structures in the two systems, mCNT/epoxy and CNT/silicon, must be different. However, both composites exhibit similar permittivity values, which depend only on the distribution of nanotubes in the matrix. So, an “interface effect” described by some researchers has no significant influence on permittivity.

In Fig. 8, the data collected for the samples with uniform and non-uniform mCNT distribution are presented separately. For the samples (Fig. 8, *a*, *b*) with a uniform mCNT distribution, the permittivity values differ considerably between the 0.2% and 0.5% loadings. In the light of the percolation theory, it could be interpreted as a threshold between the two filling fractions. However, the new findings suggest that this sharp increase stems from the different uniformity of the two samples: the non-aggregated state in the 0.2-good sample and the aggregated state in the 0.5-good sample. The difference between the 0.1% and 0.2% mCNT samples is minimal. With a more or less uniform dispersion of mCNTs, a 2x increase in the filler content only slightly affects the permittivity values. The 0.2-good sample demonstrates significantly lower values in the real part than the 0.1-worst and 0.1-bad samples throughout the entire frequency range. Thus, the sample with a higher conductive filler content is less conductive than the samples with a lower filler content.

For the aggregated samples (Fig. 8, *c*, *d*), the difference between all the three loadings is not very pronounced, thereby indicating that the number or density of the aggregates in the matrix does not strongly affect the permittivity in the tested frequency range. The difference between the three aggregated samples intensifies toward the high-frequency end of the tested range, demonstrating the role of the overall filler content.

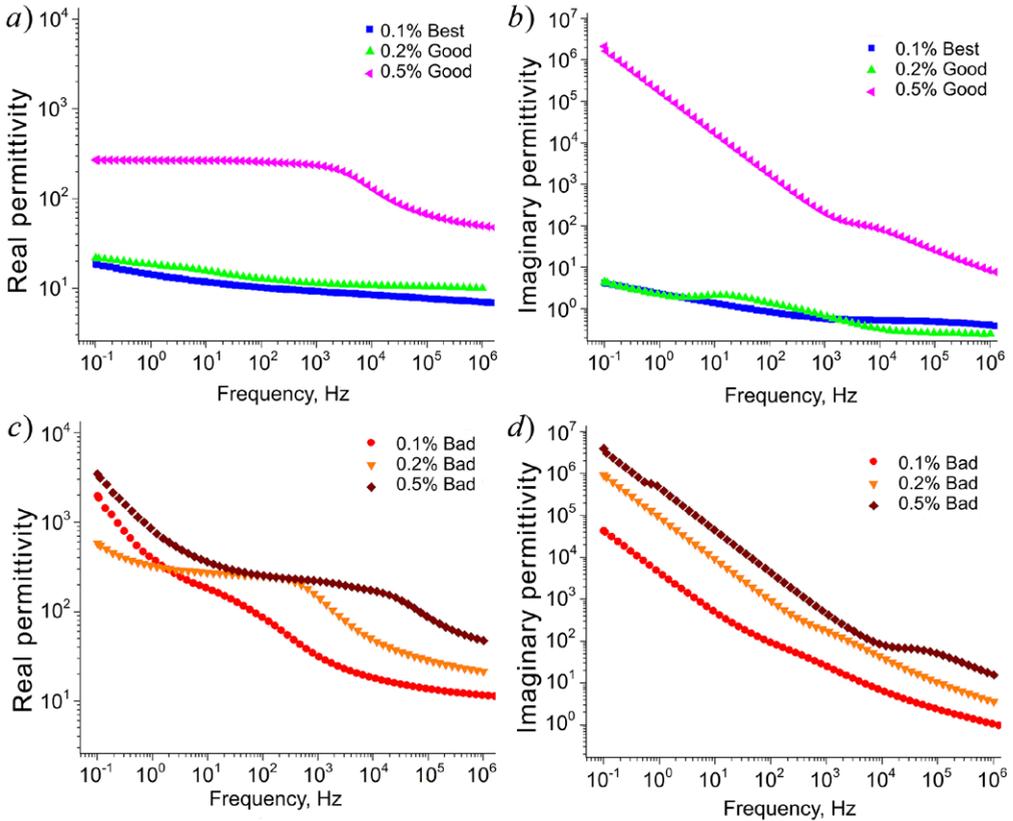


Fig. 8. Permittivity values for the samples with good (*a, b*) and bad (*c, d*) mCNT distribution at three different loadings. (*a, c*) The real and (*b, d*) the imaginary parts of the complex permittivity

The leading experts in the field admit that the actual physics behind the polarization mechanism in composite materials remains poorly understood [1]. This is especially true for systems where the filler particles are not uniform in size and shape to be easily modeled mathematically. The problem is even more challenging for systems like CNT/polymer, in which the values of many geometrical parameters (the size of CNT aggregates, the thickness of the insulator layer between CNT bundles, the shape of the percolative network within CNT aggregates, etc.) vary widely. This study limits its scope to the most straightforward and obvious observations concerning the polarization mechanism. The loss peaks of the imaginary part curves can signify an interfacial capacitance in the series with resistance, i.e., the bulk polymer regions, which constitutes the basis of interfacial polarization, often referred to as the Maxwell–Wagner polarization [1]. The strong permittivity dispersion observed in the aggregated composites at frequencies < 10 Hz points to long relaxation times, which in turn can be interpreted as the hindered charge transfer within a polarizable conductive inclusion. The difficulty of the charge transfer can be explained by the presence of a thin polymer layer between the two conductors. In our systems, such a layer is likely to be present within the CNT aggregates due to the strong adhesion of epoxy resin to mCNTs. The significant permittivity dispersion in the low-frequency end of the tested region can be tentatively attributed to the polarization between the two separated parts of the same large aggregate. This explanation is indirectly con-

firmed by the notable increase of the imaginary part in the low-frequency end due to the contribution of DC conductivity.

The dispersion of permittivity at relatively high frequencies in the middle of the tested frequency range arised from the polarization within the CNT aggregates. However, the distinction between polarizable units is rather arbitrary. The size of the CNT aggregates, the distance between the bundles within the CNT aggregate, and the distance between the neighboring CNT aggregates within the same sample varied in a broad continuous range. These variations determined the frequencies at which the permittivity dispersion occurred.

Regardless of the mechanistic explanations, our findings reliably indicate that the polarization observed in the tested frequency range occurred predominantly due to the presence of the CNT aggregates. Additionally, the permittivity values, higher than those for the neat resin, recorded for the 0.1-best sample, are most likely due to the presence of small CNT aggregates, each comprising 3–5 bundles, which were observed based on the SEM images of the fracture surfaces. Single CNT bundles separated from each other by thick insulator layer would not contribute to the permittivity values within the tested frequency range because of the capacitance being inversely proportional to the distance between the capacitor plates. In other words, when the insulator layer between the two conductors is thin, an aggregate functions as a microcapacitor. Thus, our results further validate the microcapacitor model and should be discussed in terms of the Maxwell–Wagner polarization.

The role played by CNTs aggregates in the polarization process implies that the size of the dielectric polymer components can be reduced, in theory, to the size of a few CNTs, i.e., to tens of micrometers. This paves the way for the potential miniaturization of the components. An ideal microcapacitor would consist of two parallel CNTs arranged at a properly calculated distance.

The conductive properties of composite materials have been described using various approaches (see Introduction). Our data prove that the permittivity of CNT/polymer composites (at all the studied frequencies) depends mostly on the distribution of CNTs in the matrix. The aggregation of CNTs in the matrix should be considered as the key factor influencing the conductive properties of CNT/polymer composites. As a short example, in [30], relatively low permittivity values (69.7 for the 4% CNT content, measured at 1 kHz) were registered for the MWCNT/PVDF composite, while similar systems normally exhibit much higher permittivity values up to 10 000 [27, 32]. The lower permittivity registered in [30] can be explained by the uniform distribution of CNTs in the matrix, attained by the non-covalent functionalization, but not via an “interface effect” as one might suggest.

The perlocation theory is only valid for ideal composites with the filler having completely uniform particles. Otherwise, models based on the geometrical and statistical considerations make little sense. In reality, samples with a lower filler content (such as the 0.1-worst sample) might have higher permittivity values than those with a larger filler content (such as the 0.2-good sample). Thus, mathematical approaches like the power laws are of little help here or at least have some critical limitations. The revealed “aggregation effect” explains the inconsistencies in the available literature data on the conductive properties of CNT/polymer composites. Many earlier results, especially those concerning the percolation threshold values, may require a reconsideration in the light of the findings of this study.

Conclusions

A new method for manufacturing CNT/epoxy resin composites with a completely uniform distribution of CNTs in the matrix was developed. With the Tuball CNTs used in this study, this is possible up to the CNT content of 0.2%. The method allows to control the levels of uniformity/aggregation in a broad range, while the CNT content of composites remains constant. The conductive properties of the obtained composites were measured at frequencies from 10^{-1} to 10^7 Hz. Depending on the levels of CNT aggregation, the permittivity values varied widely, even though the content of the conductive filler did not change. In addition, they were inversely related to the degree of CNT uniformity in the matrix. The aggregated sample with 0.1% CNT content was characterized by the highest permittivity (up to 482 at the low-frequency end), and the sample with CNTs distributed uniformly had a very low permittivity (< 17). At a frequency of 10^1 Hz, the permittivity values for the 0.1-best, 0.1-good, 0.1-bad, and 0.1-worst samples were 11.6, 27.3, 179.5, and 370.5, respectively. The same trend was observed with 0.2% CNT. At higher loadings, it is impossible to prepare non-aggregated samples, and the difference between the samples with a more or less uniform CNT distribution is minimal. For the aggregated samples within the 0.1–0.5% filling fractions, the permittivity is determined more by their aggregation than the overall CNT content. Thus, the sample with 0.2% CNTs distributed uniformly exhibited a significantly lower permittivity compared to the aggregated sample with 0.1% CNT throughout the entire tested frequency range. Our data strongly suggest that the degree of CNT aggregation is the key factor to be taken into account when interpreting the conductive properties of CNT/polymer composites. Other factors, such as non-covalent functionalization of CNTs, might only contribute to the uniformity/aggregation of composites, which in turn affects their permittivity. Therefore, although the power laws can be effective, using them to study and manufacture CNT/polymer composites is associated with critical limitations.

Acknowledgments. This study was supported by Russian Science Foundation (project no. 21-73-20024).

Conflicts of Interest. The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Jonscher A.K. Dielectric relaxation in solids. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 1999, vol. 32, no. 14, pp. R57–R70. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/32/14/201>.
2. Ajayan P.M., Tour J.M. Nanotube composites. *Nature*, 2007, vol. 447, no. 7148, pp. 1066–1068. <https://doi.org/10.1038/4471066a>.
3. Terrones M., Martín O., González M., Pozuelo J., Serrano B., Cabanelas J.C., Vega-Díaz S.M., Baselga J. Interphases in graphene polymer-based nanocomposites: Achievements and challenges. *Adv. Mater.*, 2011, vol. 23, no. 44, pp. 5302–5310. <https://doi.org/10.1002/adma.201102036>.
4. Baughman R.H., Zakhidov A.A., de Heer W.A. Carbon nanotubes – the route toward applications. *Science*, 2002, vol. 297, no. 5582, pp. 787–792. <https://doi.org/10.1126/science.1060928>.
5. Coleman J., Curran S., Dalton A.B., Davey A.P., McCarthy B., Blau W., Barklie R.C. Percolation-dominated conductivity in a conjugated-polymer-car-

- bon-nanotube composite. *Phys. Rev. B*, 1998, vol. 58, no. 12, pp. R7492–R7495. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.58.R7492>.
6. Grimes C.A., Mungle C., Kouzoudis D., Fang S., Eklund P.C. The 500 MHz to 5.50 GHz complex permittivity spectra of single-wall carbon nanotube-loaded polymer composites. *Chem. Phys. Lett.*, 2000, vol. 319, nos. 5–6, pp. 460–464. [https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(00\)00196-2](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(00)00196-2).
 7. Wu J., Kong L. High microwave permittivity of multiwalled carbon nanotube composites. *Appl. Phys. Lett.*, 2004, vol. 84, no. 24, pp. 4956–4958. <https://doi.org/10.1063/1.1762693>.
 8. Logakis E., Pandis Ch., Peoglos V., Pissis P., Pionteck J., Pötschke P., Mičušík M., Omastová M. Electrical/dielectric properties and conduction mechanism in melt processed polyamide/multi-walled carbon nanotubes composites. *Polymer*, 2009, vol. 50, no. 21, pp. 5103–5111. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2009.08.038>.
 9. Dang Z.-M., Wang L., Yin Y., Zhang Q., Lei Q.-Q. Giant dielectric permittivities in functionalized carbon-nanotube/electroactive-polymer nanocomposites. *Adv. Mater.*, 2007, vol. 19, no. 6, pp. 852–857. <https://doi.org/10.1002/adma.200600703>.
 10. Yuan J.-K., Yao S.-H., Dang Z.-M., Sylvestre A., Genestoux M., Bai J. Giant dielectric permittivity nanocomposites: Realizing true potential of pristine carbon nanotubes in polyvinylidene fluoride matrix through an enhanced interfacial interaction. *J. Phys. Chem. C*, 2011, vol. 115, no. 13, pp. 5515–5521. <https://doi.org/10.1021/jp1117163>.
 11. Dimiev A., Lu W., Zeller K., Crowgey B., Kempel L.C., Tour J.M. Low-loss, high-permittivity composites made from graphene nanoribbons. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2011, vol. 3, no. 12, pp. 4657–4661. <https://doi.org/10.1021/am201071h>.
 12. Dimiev A., Zakhidov D., Genorio B., Oladimeji K., Crowgey B., Kempel L., Rothwell E.J., Tour J.M. Permittivity of dielectric composite materials comprising graphene nanoribbons. The effect of nanostructure. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2013, vol. 5, no. 15, pp. 7567–7573. <https://doi.org/10.1021/am401859j>.
 13. Lounev I.V., Musin D.R., Dimiev A.M. New details to relaxation dynamics of dielectric composite materials comprising longitudinally opened carbon nanotubes. *J. Phys. Chem. C*, 2017, vol. 121, no. 41, pp. 22995–23001. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b08406>.
 14. Dang Z.-M., Wu J.-P., Xu H.-P., Yao S.-H., Jiang M.-J., Bai J. Dielectric properties of upright carbon fiber filled poly(vinylidene fluoride) composite with low percolation threshold and weak temperature dependence. *Appl. Phys. Lett.*, 2007, vol. 91, no. 7, art. 072912. <https://doi.org/10.1063/1.2770664>.
 15. Liu C., Zheng L., Yuan L., Guan Q., Gu A., Liang G. Origin of increasing dielectric constant at lower percolation threshold through controlling spatial distribution of carbon nanotubes in epoxy resin with microwave-assisted thermal curing technique. *J. Phys. Chem. C*, 2016, vol. 120, no. 50, pp. 28875–28885. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b10567>.
 16. Bal S., Samal S.S. Carbon nanotube reinforced polymer composites—a state of the art. *Bull. Mater. Sci.*, 2007, vol. 30, no. 4, pp. 379–386. <https://doi.org/10.1007/s12034-007-0061-2>.
 17. Bergman D.J., Imry Y. Critical behavior of the complex dielectric constant near the percolation threshold of a heterogeneous material. *Phys. Rev. Lett.*, 1977, vol. 39, no. 19, pp. 1222–1225. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.39.1222>.
 18. Bánhegyi G. Comparison of electrical mixture rules for composites. *Colloid Polym. Sci.*, 1986, vol. 264, no. 12, pp. 1030–1050. <https://doi.org/10.1007/BF01410321>.
 19. Nan C.-W. Physics of inhomogeneous inorganic materials. *Prog. Mater. Sci.*, 1993, vol. 37, no. 1, pp. 1–116. [https://doi.org/10.1016/0079-6425\(93\)90004-5](https://doi.org/10.1016/0079-6425(93)90004-5).
 20. Feldman Y., Puzenko A., Ryabov Y. Dielectric relaxation phenomena in complex materials. In: Coffey W.T., Kalmykov Y.P. (Eds.) *Fractals, Diffusion, and Relaxation in*

- Disordered Complex Systems*. Hoboken, NJ, Wiley-Interscience, 2006, pp. 1–125. <http://dx.doi.org/10.1002/0471790265.ch1>.
21. Cametti C. Dielectric spectra of ionic water-in-oil microemulsions below percolation: Frequency dependence behavior. *Phys. Rev. E*, 2010, vol. 81, no. 3, art. 031403. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.81.031403>.
 22. Li J., Ma P.C., Chow W.S., To C.K., Tang B.Z., Kim J.-K. Correlations between percolation threshold, dispersion state, and aspect ratio of carbon nanotubes. *Adv. Funct. Mater.*, 2007, vol. 17, no. 16, pp. 3207–3215. <https://doi.org/10.1002/adfm.200700065>.
 23. Wang D., Zhang X., Zha J.W., Zhao J.-W., Zhao J., Dang Z.-M., Hu G.-H. Dielectric properties of reduced graphene oxide/polypropylene composites with ultralow percolation threshold. *Polymer*, 2013, vol. 54, no. 7, pp. 1916–1922. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2013.02.012>.
 24. Moharana S., Mahaling R.N. Silver (Ag)-graphene oxide (GO) – poly (vinylidene fluoride-co-hexafluoropropylene) (PVDF-HFP) nanostructured composites with high dielectric constant and low dielectric loss. *Chem. Phys. Lett.*, 2017, vol. 680, pp. 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2017.05.018>.
 25. He F., Lau S., Chan H.L., Fan J. High dielectric permittivity and low percolation threshold in nanocomposites based on poly(vinylidene fluoride) and exfoliated graphite nanoplates. *Adv. Mater.*, 2009, vol. 21, no. 6, pp. 710–715. <https://doi.org/10.1002/adma.200801758>.
 26. Wan Y.-J., Yang W.-H., Yu S.-H., Sun R., Wong C.-P., Liao W.-H. Covalent polymer functionalization of graphene for improved dielectric properties and thermal stability of epoxy composites. *Compos. Sci. Technol.*, 2016, vol. 122, pp. 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2015.11.005>.
 27. Yuan J.-K., Li W.-L., Yao S.-H., Lin Y.-Q., Sylvestre A., Bai J. High dielectric permittivity and low percolation threshold in polymer composites based on SiC-carbon nanotubes micro/nano hybrid. *Appl. Phys. Lett.*, 2011, vol. 98, no. 3, art. 032901. <https://doi.org/10.1063/1.3544942>.
 28. Tong W., Zhang Y., Zhang Q., Luan X., Duan Y., Pan S., Lv F., An Q. Achieving significantly enhanced dielectric performance of reduced graphene oxide/polymer composite by covalent modification of graphene oxide surface. *Carbon*, 2015, vol. 94, pp. 590–598. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2015.07.005>.
 29. Khamidullin T., Lounev I., Solodov A., Vakhitov I., Hashemi S.A., Dimiev A.M. Graphene oxide–epoxy composites with induced anisotropy of electrical properties. *J. Phys. Chem. C*, 2021, vol. 125, no. 48, pp. 26823–26831. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.1c07645>.
 30. Luo H., Wu Z., Chen C., Ma C., Zhou K., Zhang D. Methoxypolyethylene glycol functionalized carbon nanotube composites with high permittivity and low dielectric loss. *Composites, Part A*, 2016, vol. 86, pp. 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2016.04.001>.
 31. Li Q., Xue Q., Hao L., Gao X., Zheng Q. Large dielectric constant of the chemically functionalized carbon nanotube/polymer composites. *Compos. Sci. Technol.*, 2008, vol. 68, nos. 10–11, pp. 2290–2296. <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2008.04.019>.
 32. Shang S., Tang C., Jiang B., Song J., Jiang B., Zhao K., Liu Y., Wang X. Enhancement of dielectric permittivity in carbon nanotube/polyvinylidene fluoride composites by constructing of segregated structure. *Compos. Commun.*, 2021, vol. 25, art. 100745. <https://doi.org/10.1016/j.coco.2021.100745>.
 33. Sun D., Zhou Z., Chen G.-X., Li Q. Regulated dielectric loss of polymer composites from coating carbon nanotubes with a cross-linked silsesquioxane shell through free-radical polymerization. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2014, vol. 6, no. 21, pp. 18635–18643. <https://doi.org/10.1021/am503633t>.

34. Amirova L., Surnova A., Balkaev D., Musin D., Amirov R., Dimiev A.M. Homogeneous liquid phase transfer of graphene oxide into epoxy resins. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2017, vol. 9, no. 13, pp. 11909–11917. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b02243>.
35. Dimiev A.M., Surnova A., Lounev I., Khannanov A. Intrinsic insertion limits of graphene oxide into epoxy resin and the dielectric behavior of composites comprising truly 2D structures. *J. Phys. Chem. C*, 2019, vol. 123, no. 6, pp. 3461–3468. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b07450>.
36. Surnova A., Balkaev D., Musin D., Amirov R., Dimiev A.M. Fully exfoliated graphene oxide accelerates epoxy resin curing, and results in dramatic improvement of the polymer mechanical properties. *Composites, Part B*, 2019, vol. 162, pp. 685–691. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2019.01.020>.
37. Dimiev A.M., Lounev I., Khamidullin T., Surnova A., Valimukhametova A., Khannanov A. Polymer composites comprising single-atomic-layer graphenic conductive inclusions and their unusual dielectric properties. *J. Phys. Chem. C*, 2020, vol. 124, no. 25, pp. 13715–13725. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c02208>.
38. Dimiev A.M., Khannanov A., Vakhitov I., Kiiamov A., Shukhina K., Tour J.M. Revisiting the mechanism of oxidative unzipping of multiwall carbon nanotubes to graphene nanoribbons. *ACS Nano*, 2018, vol. 12, no. 4, pp. 3985–3993. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.8b01617>.
39. Hummers W.S.Jr., Offeman R.E. Preparation of graphitic oxide. *J. Am. Chem. Soc.*, 1958, vol. 80, no. 6, p. 1339. <https://doi.org/10.1021/ja01539a017>.
40. Feicht P., Biskupek J., Gorelik T.E., Renner J., Halbig C.E., Maranska M., Puchtler F., Kaiser U., Eigler S. Brodie’s or Hummers’ method: Oxidation conditions determine the structure of graphene oxide. *Chem. – Eur. J.*, 2019, vol. 25, no. 38, pp. 8955–8959. <https://doi.org/10.1002/chem.201901499>.
41. Dimiev A.M., Shukhina K., Khannanov A. Mechanism of the graphene oxide formation: The role of water, “reversibility” of the oxidation, and mobility of the C–O bonds. *Carbon*, 2020, vol. 166, pp. 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2020.05.005>.
42. Kosynkin D., Higginbotham A.L., Sinitskii A., Lomeda J.R., Dimiev A., Price B.K., Tour J.M. Longitudinal unzipping of carbon nanotubes to form graphene nanoribbons. *Nature*, 2009, vol. 458, no. 7240, pp. 872–876. <https://doi.org/10.1038/nature07872>.
43. Eigler S., Dimiev A.M. Characterization techniques. In: Dimiev A.M., Eigler S. (Eds.) *Graphene Oxide: Fundamentals and Applications*. Chichester, Wiley, 2016, pp. 85–120. <https://doi.org/10.1002/9781119069447.ch3>.
44. Shayimova J., Amirov R.R., Iakunkov A., Talyzin A., Dimiev A.M. Carboxyl groups do not play the major role in binding metal cations by graphene oxide. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2021, vol. 23, no. 32, pp. 17430–17439. <https://doi.org/10.1039/D1CP01734A>.
45. Dimiev A.M., Bachilo S.M., Saito R., Tour J.M. Reversible formation of ammonium persulfate/sulfuric acid graphite intercalation compounds and their peculiar Raman spectra. *ACS Nano*, 2012, vol. 6, no. 9, pp. 7842–7849. <https://doi.org/10.1021/nn3020147>.
46. Cançado L.G., Jorio A., Martins Ferreira E.H., Stavale F., Achete C.A., Capaz R.B., Moutinho M.V.O., Lombardo A., Kulmala T.S., Ferrari A.C. Quantifying defects in graphene via Raman spectroscopy at different excitation energies. *Nano Lett.*, 2011, vol. 11, no. 8, pp. 3190–3196. <https://doi.org/10.1021/nl201432g>.
47. Lucchese M.M., Stavale F., Martins Ferreira E.H., Vilani C., Moutinho M.V.O., Capaz R.B., Achete C.A., Jorio A. Quantifying ion-induced defects and Raman relaxation length in graphene. *Carbon*, 2010, vol. 48, no. 5, pp. 1592–1597. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2009.12.057>.

48. King A.A.K., Davies B.R., Noorbehesht N., Newman P., Church T.L., Harris A.T., Razal J.M., Minett A.I. A new Raman metric for the characterisation of graphene oxide and its derivatives. *Sci. Rep.*, 2016, vol. 6, no. 1, art. 19491. <https://doi.org/10.1038/srep19491>.
49. Kleshch V.I., Eremina V.A., Serbun P., Orekhov A.S., Lützenkirchen-Hecht D., Obratsova E.D., Obratsov A.N. A comparative study of field emission from semiconducting and metallic single-walled carbon nanotube planar emitters. *Phys. Status Solidi B*, 2018, vol. 255, no. 1, art. 1700268. <https://doi.org/10.1002/pssb.201700268>.
50. Krestinin A.V., Dremova N.N., Knerel'man E.I., Blinova L.N., Zhigalina V.G., Kiselev N.A. Characterization of SWCNT products manufactured in Russia and the prospects for their industrial application. *Nanotechnol. Russ.*, 2015, vol. 10, nos. 7–8. pp. 537–548. <https://doi.org/10.1134/S1995078015040096>.
51. Turek E., Wasiak T., Stando G., Janas D. Probing the mechanics of aqueous two-phase extraction using large diameter single-walled carbon nanotubes. *Nanotechnology*, 2018, vol. 29, no. 40, art. 405704. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/aad359>.
52. Khamidullin T., Galyaltdinov S., Valimukhametova A., Brusko V., Khannanov A., Maat S., Kalinina I., Dimiev A.M. Simple, cost-efficient and high throughput method for separating single-wall carbon nanotubes with modified cotton. *Carbon*, 2021, vol. 178, pp. 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2021.03.003>.
53. Galyaltdinov S., Lounev I., Khamidullin T., Hashemi S.A., Nasibulin A. Dimiev A.M. High permittivity polymer composites on the basis of long single-walled carbon nanotubes: The role of the nanotube length. *Nanomaterials*, 2022, vol. 12, no. 19, art. 3538. <https://doi.org/10.3390/nano12193538>.

Received March 22, 2024

Accepted April 17, 2024

Khamidullin Timur Lenarovich, PhD Student, Department of Physical Chemistry, A.M. Butlerov Institute of Chemistry

Kazan Federal University
ul. Kremlevskaya, 18, Kazan, 420008 Russia
E-mail: TiLKhamidullin@kpfu.ru

Lounev Ivan Vladimirovich, PhD in Physics, Associate Professor, Senior Research Fellow, Department of Quantum Electronics and Radiospectroscopy, Institute of Physics

Kazan Federal University
ul. Kremlevskaya, 18, Kazan, 420008 Russia
E-mail: lounev75@mail.ru

Sattarov Sergey Abudievich, PhD in Physics, Associate Professor, Department of Radioelectronics

Jizzakh Polytechnical Institute
pr. I. Karimova, 4, Jizzakh, 130100 Republic of Uzbekistan
E-mail: jizpi_sattarov@list.ru

Dimiev Ayrat Maratovich, Doctor of Chemistry, Leading Research Fellow, Laboratory for Advanced Carbon Nanomaterials, A.M. Butlerov Institute of Chemistry

Kazan Federal University
ul. Kremlevskaya, 18, Kazan, 420008 Russia
E-mail: AMDimiev@kpfu.ru

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

УДК 546.05

doi: 10.26907/2542-064X.2024.2.210-228

Аномальные проводящие свойства полимерных композитов с углеродными нанотрубками: неуниверсальность степенного закона*Т.Л. Хамидуллин¹, И.В. Лунев¹, С.А. Саттаров², А.М. Димиев¹*¹ *Казанский Федеральный Университет, г. Казань, 420008, Россия*² *Джизакский политехнический институт, г. Джизак, 130100, Узбекистан***Аннотация**

Проводящие свойства полимерных композитов с углеродными нанотрубками (УНТ) хорошо известны и подробно описаны в литературе. Однако влияние степени распределения УНТ в матрице на поляризацию композитов до конца не изучено. Добиться равномерного распределения УНТ в полимерах практически невозможно, поэтому в большинстве имеющихся публикаций рассматриваются условия, при которых УНТ неизбежно агрегированы. В статье представлен новый метод смешения УНТ с эпоксидной смолой для получения композитных материалов с различной однородностью/агрегацией УНТ в матрице при одинаковом содержании наполнителя. Проведенный эксперимент показал, что значения диэлектрической проницаемости обратно пропорциональны однородности композита, при этом самые низкие показатели проницаемости были выявлены в наиболее однородных образцах, и наоборот. При 0.1% УНТ, значения проводимости в реальной части составили 6.6 и 16.2 при 10^7 Гц и 11.6 и 370.5 при 10^1 Гц для наиболее однородных и наиболее агрегированных образцов соответственно. Показано, что в диапазоне концентраций наполнителя 0.1–0.5 % проводящие свойства зависели главным образом от распределения УНТ, а не от их содержания. Так, во всем диапазоне частот однородный образец с 0.2% УНТ демонстрировал значительно меньшую проницаемость, чем агрегированный образец с 0.1% УНТ. Эти результаты свидетельствуют о необходимости учета фактора агрегации, а также ставят под сомнение универсальность теории перколяции и степенных законов. Физическую суть наблюдаемого явления лучше всего объясняет модель микроконденсаторов, или поляризация Максвелла-Вагнера. Полученные данные, вероятно, потребуют пересмотра многих существующих представлений в области использования углеродных наноматериалов.

Ключевые слова: эпоксидные композиты, углеродные нанотрубки, межфазная поляризация, проводимость, агрегация, модель микроконденсаторов

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 21-73-20024).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 22.03.2024

Принята к публикации 17.04.2024

Хамидуллин Тимур Ленарович, аспирант кафедры физической химии Химического института им. А.М. Бутлерова

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: TiLkhamidullin@kpfu.ru

Лунев Иван Владимирович, кандидат физических наук, доцент, старший научный сотрудник кафедры квантовой электроники и радиоспектроскопии Института физики

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: lounev75@mail.ru

Саттаров Сергей Абудиевич, кандидат физических наук, доцент кафедры радиоэлектроники

Джизакский политехнический институт

просп. И Каримова, д. 4, г. Джизак, 130100, Республика Узбекистан

E-mail: jizpi_sattarov@list.ru

Димиев Айрат Маратович, доктор химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории перспективных углеродных наноматериалов Химического института им. А.М. Бутлерова

Казанский (Приволжский) федеральный университет

ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия

E-mail: AMDimiev@kpfu.ru

***For citation:** Khamidullin T.L., Lounev I.V., Sattarov S.A., Dimiev A.M. Anomalous conductive properties of polymer composites with carbon nanotubes: Why power laws are not universal. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennyye Nauki*, 2024, vol. 166, no. 2, pp. 210–228. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2024.2.210-228>.*

***Для цитирования:** Khamidullin T.L., Lounev I.V., Sattarov S.A., Dimiev A.M. Anomalous conductive properties of polymer composites with carbon nanotubes: Why power laws are not universal // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2024. Т. 166, кн. 2. С. 210–228. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2024.2.210-228>.*

ORIGINAL ARTICLE

UDC 544.3.032+615.322

doi: 10.26907/2542-064X.2024.2.229-237

Evaluation of the Physicochemical Properties of Spray-Dried Coconut Flower Nectar Powder

H.N.Q. Anh, L.P.T. Quoc

*Institute of Biotechnology and Food Technology, Industrial University of Ho Chi Minh City,
Ho Chi Minh City, 700000 Vietnam*

Abstract

This study aimed to determine the physicochemical properties of coconut flower nectar (CFN) powder produced by spray drying. The powder product of the best sample (with maltodextrin–CFN ratio of 26%, w/v) appeared as white, spherical, or oval particles. Its physicochemical properties were as follows: recovery yield ($42 \pm 2\%$), moisture content ($3.1 \pm 0.6\%$), particle size ($3\text{--}12\ \mu\text{m}$), bulk density ($0.380 \pm 0.006\ \text{g mL}^{-1}$), hygroscopicity ($22 \pm 2\%$), water solubility index ($97 \pm 1\%$), angle of repose ($42.2 \pm 0.7^\circ$), and wettability ($366 \pm 11\ \text{s}$). The obtained results offer valuable insights for future research on spray drying of food products and pave the way for potential large-scale use of spray-dried CFN in a great variety of products due to easier preservation and longer shelf life.

Keywords: coconut flower nectar, spray drying, physicochemical properties, powder, sugar

Introduction

The coconut tree, *Cocos nucifera* L. (Arecaceae), is the most common plant in tropical regions. Some major coconut-producing countries are Indonesia, the Philippines, India, and Vietnam. The coconut industry is playing a very important role in the socio-economic development of Vietnam and should be considered an indispensable part of the country's development strategies. Vietnam has more than 132 000 ha of coconut trees, with a potential coconut growing area of about 220 000–250 000 ha [1].

Among many coconut products, coconut flower sap, also known as coconut flower nectar (CFN), stands out as the most remunerative one for farmers. It can be used as a nutrient-rich health drink or processed into syrup, honey, coconut sugar, and vinegar [2, 3]. This material offers numerous health benefits. It aids in digestion and fights diabetes, cancer, electrolyte deficiency, and even hair loss [4]. CFN has good antioxidant properties and is rich in vitamin C ($116.19\ \mu\text{g mL}^{-1}$), ash (0.27%), as well as potassium ($960.87\ \text{mg L}^{-1}$), sodium ($183.21\ \text{mg L}^{-1}$), magnesium ($22.91\ \text{mg L}^{-1}$), etc., thus suggesting a high content of minerals [5]. In addition, it has a low sugar content (15%) and a low glycemic index (GI 35), making it beneficial for people with diabetes [3].

Spray drying, a mechanical microencapsulation technique developed in the 1930s, has become a popular method to maintain the nutritional quality and extend the shelf life of food products. It is also especially effective for converting a liquid into a powder. The process involves using spray drying equipment to dry solutions and suspen-

sions in a dispersed state and to remove moisture from the material, which helps increase durability and preservation. The carrier acts as a protective barrier for the raw material, limiting the influence of the external environment, preventing the loss of volatile substances, and maintaining the desired product conditions [6]. Microencapsulated materials are colloids such as gum arabic, starch derivatives, sugars (lactose, sucrose, maltose), maltodextrin, etc. [7]. Among them, maltodextrin (MD), which is a carbohydrate derivative, has been the most widely used carrier agent in spray drying. The quality of the spray-dried product depends on the dextrose equivalent (DE). MD is often used alone or in combination with other carriers (gum arabic) to improve the desired product properties [8]. Furthermore, MD is both very cheap and easy to buy, so it is extensively applied in the food industry, particularly in spray drying technology.

CFN is readily available in rural areas and undergoes natural fermentation easily due to the high sugar content in the initial raw material. To diversify products and increase the preservation time of CFN, spray drying is necessary: it decreases the water activity in the nectar and transforms it into a powder. In this study, spray drying is explored as an option to create an unfermented CFN product, which can be stored for a long time. The physicochemical indexes of this CFN product are analyzed for potential large-scale application in the future.

1. Material and Methods

1.1. Material. CFN was collected from 3 to 10-year-old coconut plants in Ben Tre province (Vietnam) in January 2023 (16°Brix) and frozen until use. MD (DE 12) was purchased from Roquette Frères (France).

1.2. Sample preparation. CFN was defrozed and mixed with MD at different concentrations (18, 22, 26, and 30%, w/v). The samples were coded M_{18} , M_{22} , M_{26} , and M_{30} , respectively. The sample with the initial MD concentration was coded M_0 . The samples M_{18-30} were adjusted with distilled water to obtain total soluble solids (TSS) of approximately 22°Brix. The mixture was spray-dried using a SD-Basic spray dryer (LabPlant, UK) with inlet/outlet air temperatures 180 °C/70 °C, pressure 4 bar, air flow rate 70 m³ h⁻¹, and feed flow rate 750 mL h⁻¹. The resulting powder product was vacuum-packed and stored at 25 °C.

1.3. Encapsulation yield (EY). EY was measured as the ratio of the dried mass of the obtained powder to the dried mass of the initial substances [9].

1.4. Bulk density (BD). The powder (2 g) was added into an empty graduated cylinder (10 mL) and shaken by hand for 1 min. The BD value was determined by the ratio of the mass of the powder to the volume occupied in the cylinder [10].

1.5. Water solubility index (WSI). According to the procedure described by Quoc with minor modifications [8], the CFN powder (2 g) and deionized water (25 mL) were vigorously mixed and incubated in a water bath for 30 min at 37 °C. Then, the mixture was centrifuged for 30 min at 6000 rpm. The supernatant was separated and dried in an oven at 103±2 °C. The WSI value (%) was expressed as the percentage of dried supernatant to the amount of the original powder.

1.6. Flowability. According to Geldart et al. with slight modifications, flowability was determined by measuring the angle of repose (AOR) [11]. A funnel was held at a fixed height on a flat base (5 cm), and the powder (15 g) was slowly poured through the funnel to form a cone. Then, the AOR was calculated as the inverse tangent of the ratio of the height and half of the width (radius) of the base of the cone.

1.7. Wettability. The powders were poured into a funnel positioned at a fixed height and dropped into 100 mL of water in a beaker (250 mL) at room temperature. After that, the time for the whole amount of the powder to visibly sink beneath the water surface was recorded as an indicator of wettability [12].

1.8. Hygroscopicity. About 1.5 g samples were placed in an airtight plastic container with a saturated solution of sodium carbonate and stored at 25 °C. After 7 days, these samples were weighed. Their hygroscopicity was determined as the amount (g) of adsorbed moisture per 100 g solids ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$) [13].

1.9. Scanning electron microscopy (SEM). The morphology of the spray-dried powder was examined under a Jeol JSM-IT200 scanning electron microscope (JEOL Ltd., Japan) at 1000 \times magnification.

1.10. Statistical analysis. The experimental data were processed using the one-way analysis of variance (ANOVA) method, and significant differences among the means from triplicate analysis at $p < 0.05$ were determined by Fisher's least significant difference (LSD) test using Statgraphics Centurion XV software (StatPoint Technologies, USA). The values obtained were expressed as the mean \pm standard deviation (SD).

2. Results and Discussion

2.1. Moisture and EY of the CFN powder. Table 1 shows that the moisture content of all powder products (M_{0-30}) varied from $1.0 \pm 0.3 \%$ to $4.7 \pm 0.2 \%$. These findings are consistent with previous studies. For instance, the moisture contents of the spray-dried pineapple and saffron petal powder range from 1.66 to 3.85% [12, 14]. With the addition of MD, the TSS content of the initial solution increases, leading to a decrease in the moisture content of the product [15]. The low moisture content indicates that the material has been effectively spray-dried and can be preserved for a long time. The EY values of the spray-dried samples from this study were relatively low, ranging from 12.4 ± 0.6 to $42 \pm 2 \%$. Among them, the M_{26} sample possessed the greatest EY of $42 \pm 2 \%$, which is still lower than in the *Polygonum multiflorum* Thunb. extract powder (60.4–65.17 %) [16], but significantly higher than in the *Morinda citrifolia* L. and *Beta vulgaris* L. fruit extract powder (5.67–8.02 %) [17].

Table 1.

Encapsulation yield (EY) and moisture content of the CFN powder

Sample	Moisture (%)	EY (%)
M_0	4.7 ± 0.2^c	–
M_{18}	1.0 ± 0.3^a	12.4 ± 0.6^a
M_{22}	4.5 ± 0.4^c	16 ± 2^a
M_{26}	3.1 ± 0.6^b	42 ± 2^c
M_{30}	3.2 ± 0.6^b	32 ± 6^b

Within the columns, the letters ^{a-c} indicate significant differences ($p < 0.05$).

Normally, the recovery efficiency of most spray-dried products does not exceed 90% due to the product residue that remains on the chamber wall after drying, thereby leading to a decrease in the recovery efficiency. The TSS concentration in the initial

material and the carrier properties also significantly affect the recovery efficiency of the product. In addition, according to Phisut, EY depends on many factors, such as drying temperature, pump flow rates, raw material source, etc. [15].

2.2. Bulk density (BD), hygroscopicity, and water solubility index (WSI) of the CFN powder. Based on the results of Table 2, the BD value of the M_0 powder ($0.52 \pm 0.01 \text{ g mL}^{-1}$) was lower than that reported by Quoc (0.67 g mL^{-1}) for the spray-dried pineapple juice powder with MD as a carrier agent [8]. However, the BDs of the CFN powder (M_{18-30}) decreased more rapidly compared to that of M_0 and fluctuated from 0.30 ± 0.02 to $0.39 \pm 0.02 \text{ g mL}^{-1}$. When compared to other carrier agents, such as gum arabic, the BDs of both the initial material and the powder product were significantly lower than those in the study by Quoc and Muoi [16]. The obtained results prove that the BD of a powder product strongly depends on the carrier nature. A low BD means that the powder product requires a larger packaging volume, which is also a weak point.

Table 2.

Bulk density (BD), hygroscopicity, and water solubility index (WSI) of the CFN powder

Sample	BD (g mL^{-1})	Hygroscopicity (%)	WSI (%)
M_0	0.52 ± 0.01^d	10 ± 2^a	94 ± 2
M_{18}	0.30 ± 0.02^a	17 ± 2^b	98 ± 1
M_{22}	0.330 ± 0.006^b	20 ± 1^{bc}	94 ± 2
M_{26}	0.380 ± 0.006^c	22 ± 2^c	97 ± 1
M_{30}	0.39 ± 0.02^c	21 ± 3^c	97 ± 2

Within the columns, the letters ^{a-d} indicate significant differences ($p < 0.05$).

The hygroscopicity of the initial material (MD) only reached $10 \pm 2\%$. However, after the spray drying process, the hygroscopicity of the M_{18-30} products dramatically increased from 17 ± 2 to $22 \pm 1\%$ ($p < 0.05$), especially for the samples with a higher amount of MD. These findings contradict the results of Mishra et al. [18]. MD can also be considered a long-chain sugar with hygroscopic properties. A higher amount of MD may lead to an increase in hygroscopicity and make preservation difficult. In fact, many factors directly affect hygroscopicity, including inlet temperature, air flow rate, feed flow rate, particle size, atomizer speed, as well as carrier agent type and concentration [15]. Therefore, adjusting hygroscopicity as desired is not easy for a spray drying process.

The water solubility index (WSI) of the CFN powder was high, ranging from $94 \pm 2\%$ to $98 \pm 1\%$. It remained almost unchanged when MD was added to the initial material. There was a direct relationship between WSI and the powder product quality—the higher the WSI, the better the quality. These results were very similar to those in the study by Mishra et al. (93.28–94.11 %) [18], but higher when compared to gac powder (37.13–37.62 %) [19]. The good WSI of the CFN powder could be due to the significant level of carbohydrates (MD and sugar) in the materials.

2.3. Wettability and flowability of the CFN powder. The flowability before and after spray drying was evaluated through the angle of repose (AOR) tests (Table 3). The AOR of the powder products (M_{18-30}) ranged from $41.0 \pm 0.8^\circ$ to $42.2 \pm 0.7^\circ$, while that of the MD (M_0) was $59 \pm 3^\circ$. This means that the flowability of the samples

decreased significantly after the spray drying process, resulting in reduced adhesion. The flowability of the CFN powder was quite similar to that of the pineapple juice powder with MD used as a carrier agent (40.54°) [8], and the powder product showed cohesiveness properties ($30^\circ < \text{AOR} < 45^\circ$) [20, 21]. Generally, differences in flowability values of materials can be attributed to storage temperatures, moisture content of particles, relative humidity, particle shape, and particle size.

Table 3.

Wettability and flowability of the CFN powder

Sample	Flowability (AOR, $^\circ$)	Wettability (s)
M ₀	59 ± 3^b	497 ± 23^c
M ₁₈	41 ± 1^a	224 ± 37^a
M ₂₂	41.0 ± 0.8^a	206 ± 33^a
M ₂₆	42.2 ± 0.7^a	366 ± 11^b
M ₃₀	42 ± 3^a	409 ± 28^b

Within the columns, the letters ^{a-c} indicate significant differences ($p < 0.05$).

Table 3 shows that the wettability of the CFN powder sharply decreased from 497 ± 23 to 206 ± 33 s after the spray drying process. These results were also higher than those for the pineapple juice (179 s) and *P. multiflorum* extract powder (155 s) [8, 16]. Wettability is influenced by many factors, with the shape, particle size, moisture content, and particle cohesiveness being particularly important.

2.4. Microstructure and particle size of the CFN powder. The M₂₆ sample had the highest EY, and its other properties were similar to those of other powder products. The MD (M₀) and M₂₆ microstructures were observed, and the particle sizes were estimated. As shown in Fig. 1, *a*, the size of the M₀ particles varied greatly, from 20 to 44 μm in length and from 11 to 21 μm in width. The M₀ particles had amorphous shapes. Compared with previous studies, their shapes were similar to the SEM results obtained by Khazaei et al. [14] and Quoc [12] who used MD (DE 16-20) and gum arabic as a carrier agent. However, the CFN powder products were spherical in shape, with mutual adhesion between the particles, and the sizes of the particles were quite diverse, ranging from 3 to 12 μm (Fig. 1, *b*).

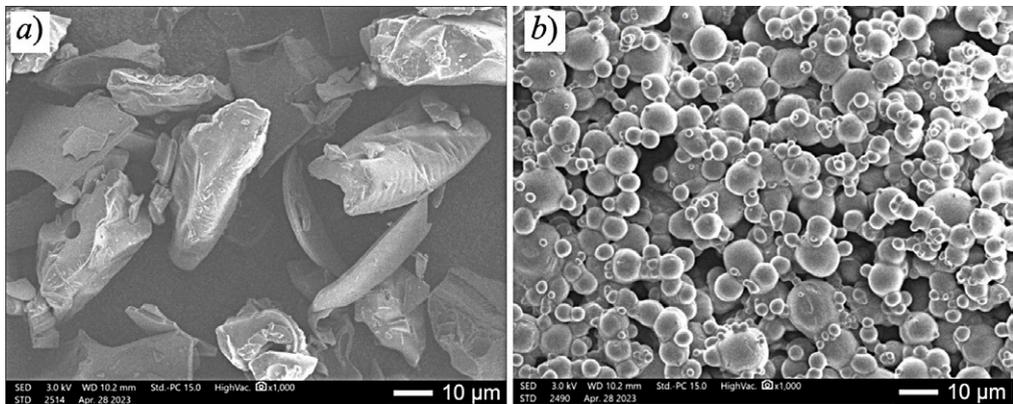


Fig. 1. SEM microphotographs of MD (*a*) and M₂₆ sample (*b*) at 1000 \times magnification.

The particle sizes of the CFN powder were also in agreement with those of the *Orthosiphon stamineus* extracts powder in the studies by Pang et al. [22] with the particle sizes ranging from 4.87 to 6.93 μm when using MD and from 4.09 to 9.3 μm using whey protein isolate as the carrier agent.

There were no wrinkles or indentations on the particle surface. They were rounded and smooth, which is different from what was found by Quoc and Muoi [16] and Pang et al. [22]. The spray-dried products from these studies often had dents and wrinkles due to grain shrinkage as a result of moisture loss during the spray drying and cooling in the drying chamber. However, this phenomenon was not observed in our study. According to Loksuan [23], the smooth surface of the product particles could be attributed to the high sugar content. Sugars may act as a plasticizer preventing shrinkage of the surface during drying.

Conclusions

CFN microencapsulation with the use of MD as an encapsulating agent proved to be effective during spray drying. It was found that CFN has great potential for commercial production of coconut sugar. The physicochemical properties of the spray-dried CFN are comparable to some other spray-dried plant materials. Depending on the MD concentration, the resulting powder products differ in their physicochemical properties and can be either spherical or oval-shaped. The M_{26} sample turned out to be the best encapsulating material for spray drying of CFN, with an EY of 42%. Overall, the results contribute to a better understanding of the CFN powder characteristics and the production of spray-dried powders with desired properties.

Acknowledgments. This research was performed at the Institute of Biotechnology and Food Technology, Industrial University of Ho Chi Minh City (Vietnam). The authors would like to thank Tran Cong Vi and Ly Anh Thu for their helpful advice on various technical issues examined in this article.

Conflicts of Interest. The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Truong T.H., Le H.C., Tran C.T. Biomass resource as a potential renewable energy in Vietnam. *Int. J. Recent Eng. Res. Dev.*, 2019, vol. 4, no. 6, pp. 142–149.
2. Sudha R., Niral V., Hebbar K.B., Samsudeen K. Coconut inflorescence sap. *Curr. Sci.*, 2019, vol. 116, no. 11, pp. 1809–1817. <https://doi.org/10.18520/cs/v116/i11/1809-1817>.
3. Saraiva A., Carrascosa C., Ramos F., Raheem D., Lopes M., Raposo A. Coconut sugar: Chemical analysis and nutritional profile; health impacts; safety and quality control; food industry applications. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2023, vol. 20, no. 4, art. 3671. <https://doi.org/10.3390/ijerph20043671>.
4. Femi B.M.R., Malhija N., Sherin Mary T., Kumaran T. Coconut (*Cocos nucifera*) inflorescence sap nutritional characteristics and health effects. *J. Basic Appl. Res. Biomed.*, 2020, vol. 6, no. 1, pp. 50–52. <https://doi.org/10.51152/jbarbiomed.v6i1.9>.
5. Asghar M.T., Yusof Y.A., Mokhtar M.N., Ya'acob M.E., Ghazali H.M., Chang L.S., Manaf Y.N. Coconut (*Cocos nucifera* L.) sap as a potential source of sugar: Antioxidant and nutritional properties. *Food Sci. Nutr.*, 2020, vol. 8, no. 4, pp. 1777–1787. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1191>.

6. Mohammed N.K., Tan C.P., Manap Y.A., Muhialdin B.J., Hussin A.S.M. Spray drying for the encapsulation of oils – a review. *Molecules*, 2020, vol. 25, no. 17, art. 3873. <https://doi.org/10.3390/molecules25173873>.
7. Gouin S. Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends Food Sci. Technol.*, 2004, vol. 15, nos. 7–8, pp. 330–347. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.10.005>.
8. Quoc L.P.T. Effect of different carrier agents on physicochemical properties of spray-dried pineapple (*Ananas comosus* Merr.) powder. *J. Korean Chem. Soc.*, 2020, vol. 64, no. 5, pp. 259–266. <https://doi.org/10.5012/jkcs.2020.64.5.259>.
9. Roccia P., Martínez M.L., Llabot J.M., Ribotta P.D. Influence of spray-drying operating conditions on sunflower oil powder qualities. *Powder Technol.*, 2014, vol. 254, pp. 307–313. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2014.01.044>.
10. Goula A.M., Adamopoulos K.G., Kazakis N.A. Influence of spray drying conditions on tomato powder properties. *Drying Technol.*, 2004, vol. 22, no. 5, pp. 1129–1151. <https://doi.org/10.1081/DRT-120038584>.
11. Geldart D., Abdullah E.C., Hassanpour A., Nwoke L.C., Wouters I. Characterization of powder flowability using measurement of angle of repose. *China Particuol.*, 2006, vol. 4, nos. 3–4, pp. 104–107. [https://doi.org/10.1016/S1672-2515\(07\)60247-4](https://doi.org/10.1016/S1672-2515(07)60247-4).
12. Quoc L.P.T. Evaluation of physico-chemical properties of spray dried pineapple (*Ananas comosus* Merr.) powder produced with gum arabic as carrier agent. *Malays. J. Biochem. Mol. Biol.*, 2020, vol. 23, no. 2, pp. 93–98.
13. Cai Y., Corke H. Production and properties of spray-dried *Amaranthus* betacyanin pigments. *J. Food Sci.*, 2000, vol. 65, no. 7, pp. 1248–1252. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb10273.x>.
14. Khazaei K.M., Jafari S.M., Ghorbani M., Kakhki A.H. Application of maltodextrin and gum Arabic in microencapsulation of saffron petal's anthocyanins and evaluating their storage stability and color. *Carbohydr. Polym.*, 2014, vol. 105, pp. 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.01.04>.
15. Phisut N. Spray drying technique of fruit juice powder: Some factors influencing the properties of product. *Int. Food Res. J.*, 2012, vol. 19, no. 4, pp. 1297–1306.
16. Quoc L.P.T., Muoi N.V. Physicochemical properties of *Polygonum multiflorum* Thunb. root powder produced with different carrier agents. *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.*, 2018, vol. 24, no. 2, pp. 93–100. <https://doi.org/10.2298/CICEQ170329021Q>.
17. Krishnaiah D., Hiaw K.B., Sarbatly R., Anisuzzaman S.M., Nithyanandam R. Spray drying of *Morinda citrifolia* L. and *Beta vulgaris* L. fruit extract and its synergistic effect. *Int. J. Chem. Eng. Appl.*, 2012, vol. 3, no. 6, pp. 380–384. <https://doi.org/10.7763/IJCEA.2012.V3.223>.
18. Mishra P., Mishra S., Mahanta C.L. Effect of maltodextrin concentration and inlet temperature during spray drying on physicochemical and antioxidant properties of amla (*Emblia officinalis*) juice powder. *Food Bioprod. Process.*, 2014, vol. 92, no. 3, pp. 252–258. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.08.003>.
19. Kha C.T., Nguyen H.M., Roach D.P. Effects of spray drying conditions on the physicochemical and antioxidant properties of the Gac (*Momordica cochinchinensis*) fruit aril powder. *J. Food Eng.*, 2010, vol. 98, no. 3, pp. 385–392. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.01.016>.
20. Carr R.L. Classifying flow properties of solids. *Chem. Eng.*, 1965, vol. 72, no. 3, pp. 69–72.
21. Carr R.L. Particle behaviour, storage and flow. *Br. Chem. Eng.*, 1970, vol. 15, no. 12, pp. 1541–1549.

22. Pang S.F., Yusoff M.M., Gimbin J. Assessment of phenolic compounds stability and retention during spray drying of *Orthosiphon stamineus* extracts. *Food Hydrocolloids*, 2014, vol. 37, pp. 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.022>.
23. Lokuwan J. Characteristics of microencapsulated β -carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin. *Food Hydrocolloids*, 2007, vol. 21, nos. 5–6, pp. 928–935. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.10.011>.

Received October 02, 2023

Accepted November 24, 2023

Huynh Nguyen Que Anh, MSc in Food and Beverage Technology, Lecturer

Institute of Biotechnology and Food Technology, Industrial University of Ho Chi Minh City
Ward 4, Go Vap District, Ho Chi Minh City, 700000 Vietnam

E-mail: huynhnguyenqueanh@iuh.edu.vn

Le Pham Tan Quoc, PhD in Food Science and Technology, Lecturer

Institute of Biotechnology and Food Technology, Industrial University of Ho Chi Minh City
Ward 4, Go Vap District, Ho Chi Minh City, 700000 Vietnam

E-mail: lephamtanquoc@iuh.edu.vn

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

УДК 544.3.032+615.322

doi: 10.26907/2542-064X.2024.2.229-237

Оценка физико-химических свойств порошков из нектара цветков кокосовой пальмы, полученных методом распылительной сушки

Х.Н.К. Ань, Л.Ф.Т. Куок

*Институт биотехнологий и пищевых технологий, Промышленный университет Хошимина,
г. Хошимин, 700000, Вьетнам*

Аннотация

В статье проанализированы физико-химические свойства порошков, изготовленных из нектара цветков кокосовой пальмы путем распылительной сушки. Наилучшие показатели получены для образца с концентрацией мальтодекстрина 26% (масс.), порошок которого имел вид белых, сферических или овальных гранул, а также обладал следующими характеристиками: выход продукта (42 ± 2 %), влажность (3.1 ± 0.6 %), размер частиц (3–12 мкм), насыпная плотность (0.380 ± 0.006 г/мл), гигроскопичность (22 ± 2 %), индекс растворимости в воде (97 ± 1 %), угол естественного откоса ($42.2 \pm 0.7^\circ$) и смачиваемость (366 ± 10 с). Полученные результаты имеют значение для дальнейших исследований в области применения распылительной сушки в пищевой промышленности и открывают новые перспективы для широкого использования порошков кокосового нектара за счет упрощения процесса его переработки и улучшения сохранности.

Ключевые слова: нектар цветков кокосовой пальмы, распылительная сушка, физико-химические свойства, порошок, сахар

Благодарности. Исследование выполнено на базе Института биотехнологий и пищевых технологий Промышленного университета Хошимина (Вьетнам). Авторы выражают искреннюю благодарность коллегам Чан Конг Ви и Ли Ань Тху за ценные рекомендации относительно ряда технических вопросов, рассматриваемых в настоящей статье.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 02.10.2023

Принята к публикации 24.11.2023

Хюн Нгуен Ку Ань, магистр наук в области технологии продуктов питания и напитков, преподаватель

Институт биотехнологий и пищевых технологий, Промышленный университет Хошимина
р-н. 4, г.о. Го Вап, г. Хошимин, 700000, Вьетнам
E-mail: huynhnguyenqueanh@iuh.edu.vn

Ле Фам Тан Куок, доктор философии в области наук о продуктах питания и их производстве, преподаватель

Институт биотехнологий и пищевых технологий, Промышленный университет Хошимина
р-н. 4, г.о. Го Вап, г. Хошимин, 700000, Вьетнам
E-mail: lephamtanquoc@iuh.edu.vn

⟨ **For citation:** Anh H.N.Q., Quoc L.P.T. Evaluation of the physicochemical properties of spray-dried coconut flower nectar powder. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2024, vol. 166, no. 2, pp. 229–237. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2024.2.229-237>. ⟩

⟨ **Для цитирования:** *Anh H.N.Q., Quoc L.P.T.* Evaluation of the physicochemical properties of spray-dried coconut flower nectar powder // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2024. Т. 166, кн. 2. С. 229–237. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2024.2.229-237>. ⟩

ORIGINAL ARTICLE

UDC 547.96:612.392.73

doi: 10.26907/2542-064X.2024.2.238-254

EFFECT OF PROTEIN–STARCH INTERACTION ON RHEOLOGICAL, TEXTURAL, AND SENSORY PROPERTIES OF *KEROPOK LEKOR*

M. Abd Elgadir^{a,b}, *J. Bakar*^b, *R. Abdul Rahman*^b, *R. Karim*^b,
A.A. Mariod^{c,d}

^aCollege of Agriculture and Veterinary Medicine, Qassim University,
Buraydah, 51452 Saudi Arabia

^bUniversiti Putra Malaysia (UPM), Serdang, Selangor, 43400 Malaysia

^cCollege of Science, University of Jeddah, Jeddah, 21931 Saudi Arabia

^dIndigenous Knowledge and Heritage Centre, Ghibaish College of Science and Technology,
Ghibaish, 110 Sudan

Abstract

This article considers the effect of protein–starch interaction on the gelling, textural, and sensory properties of *keropok lekor* used as a fish protein–starch model. A two-level factorial design was employed to analyze the quality and acceptability of different formulations of *keropok lekor* crackers depending on the ratios of minced fish (MF, 20–50 g (w/w)), sago starch (SS, 10–40 g (w/w)), and water (W, 10–35 g (w/w)). The parameters measured were the onset (T_0) and peak (T_p) temperatures of gelatinization, storage modulus (G'), and loss modulus during gelatinization (G''). The samples were rated by a group of 30 panelists during texture profile analysis and sensory evaluation. The most preferred samples had the MF : SS : W ratio of 20 : 10 : 10 and were characterized by the lowest onset and peak temperatures of gelatinization. Therefore, this formulation was singled out as optimal for *keropok lekor*.

Keywords: *keropok lekor*, fish sausage, sago starch, protein–starch interaction, gelatinization, storage modulus, sensory evaluation

Introduction

Keropok lekor is a popular Malaysian fried snack [1–3] distinguished by a unique combination of protein to starch [4, 5]. “Fish sausage” is what it is often dubbed, which is the most straightforward description [6]. Originating from the Terengganu state, it is also known as *keropok batang* and *keropok tongkol* in the Kelantan and Pahang states, respectively [7]. The love for this traditional delicacy among Malaysians, regardless of their race and ethnicity, is incredibly strong.

Keropok lekor crackers are made from a variety of fish species, including mackerel, purple-spotted bigeye, yellow goatfish, sardine, threadfin bream, and sea bass [8]. Besides minced fish, the main ingredients are tapioca starch, sugar, salt, crushed ice, sago flour, and an approved flavor enhancer [9]. The traditional way the ingredients are processed for *keropok lekor* differs from contemporary small or medium-scale backyard production.

Understanding the specific synergistic effects of protein-starch interaction in food systems is important to adjust texture and replace certain ingredients [10]. Namely, the gelatinization parameters of starch in blends upon heating vary depending on the presence of other ingredients, such as proteins [11–13]. The latter can inhibit the swelling of starch granules [14–16], thus altering the gelling properties of the final product [17]. Multiple studies have examined the gelling properties that occur when proteins and starch interact in food systems [18], as this interaction determines texture, stability, and mouthfeel [19]. Additionally, it affects thermal properties, especially in the case of fish protein [20–23]. The development and strength of the protein–starch system is influenced by temperature, ingredient concentration, and phase stability [24]. Uncontrolled heating of the protein–starch system can lead to unpredictable changes in gel structure and rheological properties [25], potentially disrupting the overall structure and texture of the system.

This study was performed in the Selangor state (Malaysia) and aimed to investigate the rheological, textural, and sensory properties of *keropok lekor* as a model fish protein–starch system.

1. Material and Methods

1.1. Experimental design. A two-level full factorial experimental design was employed to assess the effect of three independent variables—minced fish (MF), sago starch (SS), and water (W)—on the onset (T_o) and peak (T_p) temperatures of gelatinization, as well as storage (G') and loss (G'') modulus in *keropok lekor*. Texture profile analysis (TPA) and sensory evaluation of the samples were carried out. All statistics (see Table 1) were conducted using Minitab 17 software (Minitab Inc., PA, USA).

1.2. Preparation of *keropok lekor*. *Keropok lekor* samples were prepared as described by Kyaw [26]. First, fish flesh was transferred into a silent cutter (Kinn Shang Hoo Iron Works, Taiwan) and processed for 3 min. Then, crushed ice was added, followed by sago starch. The mixture was blended for 20 min until a dough-like consistency was achieved. Finally, the fish “dough” was pumped into cellulose casings using a sausage stuffer (F. Dick Company, Germany).

1.3. Gelling properties. The dynamic rheological properties of the *keropok lekor* formulations were analyzed by a temperature sweep from 30 to 90 °C for 5 min. Rheological measurements were performed as outlined by Ould Eleya et al. [27], on a RotoVisco RT-20 controlled-strain rheometer (Hakke Inc., Germany) with cone-plate geometry (diameter 35 mm, cone angle 2°). The gel of each *keropok lekor* sample was loaded into the 0.5 mm gap between an upper cone and a lower flat plate. Kerosene oil was applied onto the samples to create a thin film and prevent evaporation during the measurements. The samples were scanned from 30–90 °C at a rate of 12 °C · min⁻¹ and held at the final temperature for 5 min. The temperature was maintained by a Peltier heat pump (DS 50, Haake Inc., Germany) situated on the bottom plate of the rheometer. The cooling process from 90 to 30 °C occurred at the same rate as the heating. The measurements were carried out in three repetitions, and the mean values were used for subsequent statistical analysis.

Table 1.

Formulation matrix of keropok lekor according to central composite design (CCD)

Treatment runs	Blocks	Minced fish	Sago starch	Water
1	1	20	10	10
2	1	50	40	10
3	1	50	10	35
4	1	20	40	35
5 (C)	1	35	25	22.5
6 (C)	1	35	25	22.5
7	2	50	10	10
8	2	20	40	10
9	2	20	10	35
10	2	50	40	35
11 (C)	2	35	25	22.5
12 (C)	2	35	25	22.5
13	3	20	25	22.5
14	3	50	25	22.5
15	3	35	10	22.5
16	3	35	40	22.5
17	3	35	25	10
18	3	35	25	35
19 (C)	3	35	25	22.5
20 (C)	3	35	25	22.5

C = central points

1.4. Texture profile analysis. The gels were cut into 20 × 20 mm (diameter × length) cylindrical pieces and tested, according to the method of Martinez et al. [28], on a TA-XT2 texture analyzer (Stable Micro Systems, UK) equipped with a cylindrical probe (P/50, diameter 50 mm) connected to a 25 kg load cell. The obtained samples were compressed twice using the probe with the test speed of 2.0 mm/sec, following the standard TPA procedure. The data were collected with the help of Texture Expert 1.17 software (Stable Micro Systems, UK). The parameters calculated were hardness (N)—the maximum force needed to compress the sample, fracturability (N/cm²)—the force during initial compression at which the material fractures, springiness (m)—the ability of the sample to recover its original shape after the deforming force has been removed, cohesive force—the extent to which the sample could be deformed prior to rupture, and chewing force (N/cm)—the force required to chew the solid sample to a uniform swallowing state.

1.5. Sensory evaluation. The stuffed casings (20 mm) were steamed for 15 min. The resulting gels were then immediately immersed in iced water to prevent shrinkage and to ease separation of the casings. The steamed *keropok lekor* sausages, each 2.5 cm long, from all the formulations were deep-fried in oil for 5 min using a fryer (model DF 30 A 1 T, Japan) adjusted to 180 °C. The cooked samples were labeled with arbitrary three-digit codes and presented to the panelists (30 students) in a random order under white fluorescent lights according to Ayo et al.'s modified method [29]. The sensory tests were carried out at the Sensory Laboratory, Faculty of Food Sci-

ence and Technology, Universiti Putra Malaysia. The panelists were asked to rate the texture and overall acceptability of the *keropok lekor* samples on a nine-point scale (dislike extremely (1), neither like nor dislike (5), and like extremely (9)). In between each sample evaluation, the panelists rinsed the mouth with room-temperature water.

1.6. Statistical analysis. The experimental design matrix and ANOVA test were implemented in Minitab 17 software (Minitab Inc., PA, USA). The data were processed using the fish protein–sago starch formulations as the experimental units. The differences were assessed by Duncan’s test at 95% confidence level.

2. Results and Discussion

2.1. Effect of protein–starch interaction on T_0 values. T_0 varied from 52.5 to 77.5 °C. Its dependence on the ratio of added minced fish, sago starch, and water is shown in Table 2 and Fig. 1, *a–c*.

Table 2.

Rheological properties of various *keropok lekor* formulations determined as the functions of independent (MF, SS, and W) and dependent (onset temperature of gelatinization (T_0), peak temperature of gelatinization (T_p), storage modulus (G') and loss modulus of gelatinization (G'')) variables measured by rheometer

Formulation	Blocks	Independent variables g (w/w)			Dependent variables			
		MF	SS	W	T_0 (°C)	T_p (°C)	G' (Pa)	G'' (Pa)
F1	1	20	10	10	52.5 ± 0.2 ^a	61.9 ± 0.5 ^a	2.95 ± 0.10 ^b	2.48 ± 0.01 ^a
F2	1	50	40	10	74.0 ± 0.3 ^b	86.0 ± 0.2 ^b	5.70 ± 0.01 ^b	4.48 ± 0.01 ^b
F3	1	50	10	35	74.0 ± 0.3 ^b	82.5 ± 0.1 ^c	4.50 ± 0.01 ^c	3.60 ± 0.34 ^c
F4	1	20	40	35	70.0 ± 0.3 ^c	85.0 ± 0.2 ^d	4.90 ± 0.01 ^c	4.30 ± 0.01 ^b
F5	1	35	25	22.5	75.0 ± 0.2 ^b	86.0 ± 0.2 ^b	3.90 ± 0.02 ^d	4.00 ± 0.03 ^b
F6	1	35	25	22.5	77.5 ± 0.2 ^d	85.0 ± 0.3 ^d	4.78 ± 0.02 ^c	2.70 ± 0.02 ^a
F7	2	50	10	10	72.0 ± 0.3 ^e	84.0 ± 0.4 ^e	4.60 ± 0.03 ^c	4.00 ± 0.06 ^b
F8	2	20	40	10	67.5 ± 0.2 ^f	82.9 ± 0.1 ^c	4.85 ± 0.02 ^c	4.30 ± 0.56 ^b
F9	2	20	10	35	70.5 ± 0.6 ^c	83.0 ± 0.4 ^b	4.30 ± 0.02 ^c	4.00 ± 0.04 ^b
F10	2	50	40	35	59.5 ± 0.4 ^b	66.0 ± 0.3 ^f	3.78 ± 0.02 ^d	2.85 ± 0.01 ^a
F11	2	35	25	22.5	76.0 ± 0.3 ^b	87.0 ± 0.3 ^g	3.78 ± 0.01 ^d	4.48 ± 0.01 ^b
F12	2	35	25	22.5	76.0 ± 0.4 ^b	86.0 ± 0.3 ^b	3.70 ± 0.03 ^d	3.00 ± 0.02 ^c
F13	3	20	25	22.5	70.0 ± 0.5 ^c	85.0 ± 0.3 ^d	4.48 ± 0.01 ^c	4.31 ± 0.01 ^b
F14	3	50	25	22.5	74.0 ± 0.4 ^b	82.0 ± 0.5 ^c	4.85 ± 0.01 ^c	3.30 ± 0.02 ^c
F15	3	35	10	22.5	70.0 ± 0.4 ^c	88.5 ± 0.1 ^h	3.48 ± 0.02 ^d	2.95 ± 0.01 ^a
F16	3	35	40	22.5	55.5 ± 0.2 ^b	63.0 ± 0.2 ⁱ	5.30 ± 0.02 ^b	4.48 ± 0.01 ^b
F17	3	35	25	10	70.5 ± 0.2 ^c	86.0 ± 0.3 ^b	4.30 ± 0.03 ^c	4.00 ± 0.01 ^b
F18	3	35	25	35	58.5 ± 0.2 ^g	62.0 ± 0.4 ^a	3.60 ± 0.02 ^d	2.90 ± 0.03 ^a
F19	3	35	25	22.5	62.5 ± 0.2 ^h	82.7 ± 0.3 ^c	4.60 ± 0.03 ^c	3.42 ± 0.01 ^c
F20	3	35	25	22.5	70.3 ± 0.3 ^c	87.5 ± 0.4 ^g	4.61 ± 0.08 ^c	3.95 ± 0.02 ^c

MF: minced fish, SS: sago starch, W: water. Means with the same superscript within the column were not significantly different at $p < 0.5$

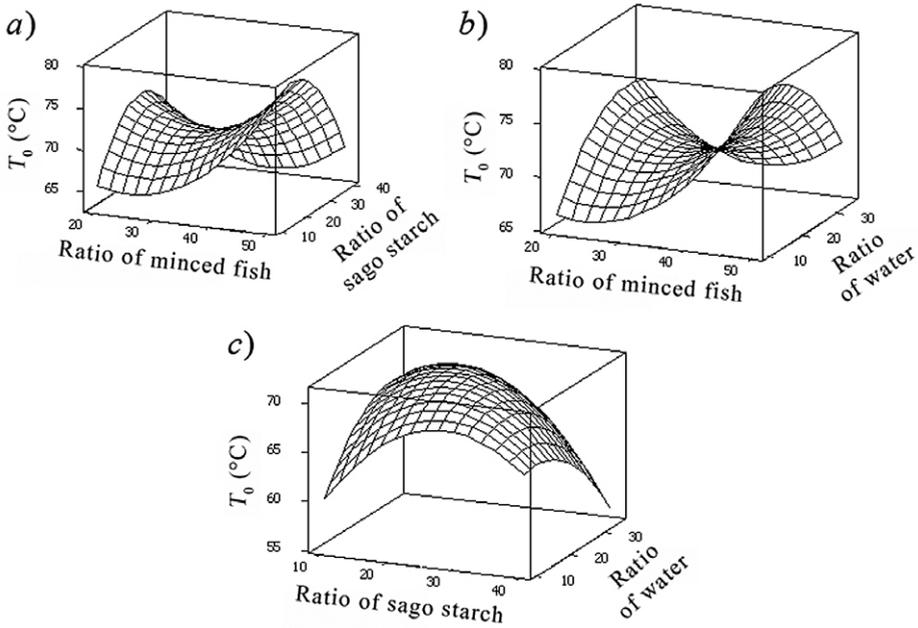


Fig. 1 Response surface plot for the onset temperature of gelatinization of the fish protein–sago starch system as a function of minced fish and sago starch ratios (a), minced fish and water ratios (b), and sago starch and water ratios (c) based on the rheometer measurements.

The lowest T_0 value was observed in the *keropak lekor* samples made with 20 : 10 : 10 minced fish, sago starch, and water, respectively. The highest T_0 value was obtained when these ingredients were mixed in the ratio of 35 : 25 : 22.5. In all the *keropak lekor* formulations, the gelatinization of the fish protein–sago starch system began at T_0 above 50 °C (52.5 °C). This finding fits well with the earlier studies by Kong et al. [30] on the interaction between the fish-meat gel with starch: proteins began to produce a gel when the temperature was higher than 50 °C, which might be due to the changes in the diameter of starch granules binding not only with water but also with fish protein. In Fig. 1, the surface plot demonstrates an upward trend in T_0 as the ratio of minced fish and water increase, while adding more sago starch leads to a decrease in the T_0 value (i.e., the system with the low ratio of water and sago starch had a lower value of T_0). According to Scott and Awika [31], proteins and starch can form complexes through physical interactions, potentially affecting the accessibility of water to starch granules and thus altering the gelatinization process. This interaction might either increase or decrease T_0 , depending on the complex nature. Proteins can enclose starch granules [32] in a protective surface coating that determines the ability of water to penetrate starch granules and initiate gelatinization. Depending on the coating size, T_0 may either increase or fall. Therefore, the protein–starch interaction can be synergistic, enhancing the gelatinization properties, or antagonistic, potentially reducing T_0 values [33].

2.2. Effect of protein–starch interaction on T_p values. Table 2 shows that T_p values of the studied *keropak lekor* formulations, increased significantly, from 61.0 to 88.5 °C, depending on the MF : SS : W ratio. It was found that the structure and behavior of starch granules changed considerably during gelatinization. These findings are consistent with previous results. For instance, Aguilera and Rojas [34]

studied why protein–cassava starch gels and reported that starch granules intensively soaked up water while undergoing gelatinization, thereby swelling, and eventually solubilizing. Our data also suggest that a temperature rise of up to 65.5 °C caused starch granules to swell and adsorb heat, resulting in their deformation, disruption and melting, as in [35]. Some interesting observations concern proteins. In Kyaw's experiments on the protein–starch system of *keropok lekor* [26], the temperature of starch gelatinization shifted to a higher value when fish-meat paste was added. Mohamed and Rayas-Duarte [36] explored the effect of starch–protein interaction in hard red spring wheat on the peak temperature of the system and revealed that the peak temperature of starch gelatinization increased with the amount of protein extract added to the starch. In this study, the lowest T_p value was 61.5 °C in the MF : SS : W ratio of 20 : 10 : 10, which indicated a disruption/melting of sago starch granules, as in [37]. Additionally, the gels of most *keropok lekor* formulations had a T_p peak above 80 °C, with the highest recorded value being 88.5 °C in the MF : SS : W ratio of 35 : 10 : 22.5.

The response surfaces for the obtained T_p values are shown in Fig. 2, *a–c* to aid visualization. The trend seen in T_0 was also pronounced in T_p , i.e., an increase in the ratios of minced fish and water led to a higher peak of gelatinization temperature.

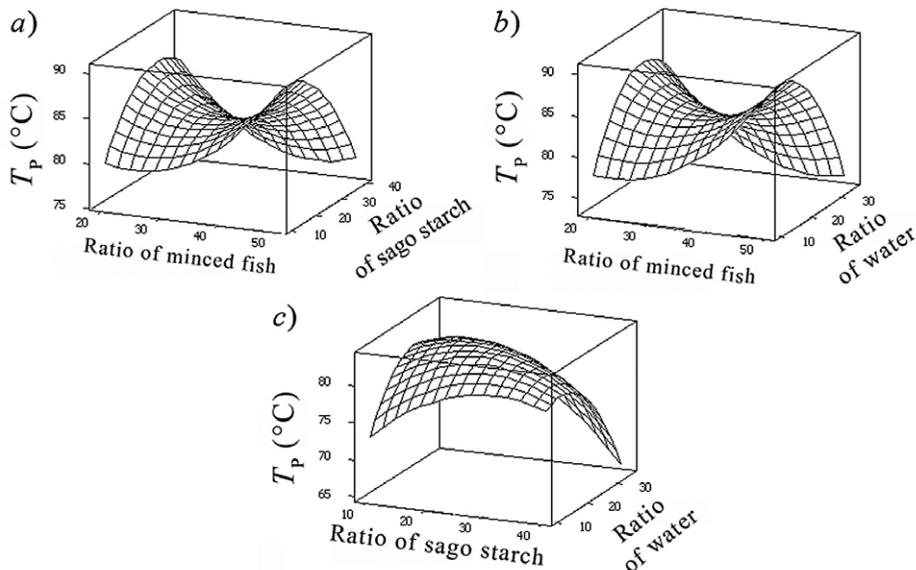


Fig. 2. Response surface plot for the peak temperature of gelatinization of the fish protein–sago starch system as a function of minced fish and sago starch ratios (*a*), minced fish and water ratios (*b*), and sago starch and water ratios (*c*) based on the rheometer measurements

Li [38] reported that the interaction between protein and starch can influence the peak temperature of gelatinization, which is the temperature at which the maximum swelling and viscosity occur during the gelatinization process. This parameter determines the texture, mouthfeel, and other functional properties of food products [39]. Bresciani et al. [40] noticed that the peak temperature of gelatinization may rise if protein–starch complexes are formed. Jia et al. [41] discovered that the presence of protein–starch complexes can alter the water absorption and swelling properties of starch granules, potentially leading to high values of peak temperature. However,

when proteins coat the surface of starch granules, they can create a barrier that affects the penetration of water into them. According to Shao et al. [42], this coating may impact the kinetics of gelatinization, potentially influencing the peak temperature of the food system [42].

2.3. Effect of protein–starch interaction on storage modulus (G') during gelatinization. The storage modulus (G') is a measure of a material's elastic or solid-like behavior [43]. In the context of gelatinization, G' is commonly used in rheology to describe the stiffness or rigidity of a gel or gelatinized material [44]. As starch granules undergo gelatinization, they absorb water and swell, which ultimately leads to the formation of a gel network [45]. G' is a key rheological parameter that reflects the ability of the gel to store and recover energy under deformation [46]. A higher G' value indicates a more elastic or solid-like behavior, while a lower G' value suggests that the material is viscous or more likely to behave like a liquid [47].

Table 2 and Fig. 3, *a–c* show how different ratios of the ingredients used in *keropok lekor* affected the G' values in this study depending on the temperature variations. A gradual increase in the G' values was noted, indicating enhanced elasticity while the system was heated [48]. The storage modulus increased with the higher ratios of both minced fish and sago starch, but decreased as more water was added. This finding is consistent with that of Chen et al. [49]. The higher storage modulus suggested that the starch–protein interaction in *keropok lekor* led to the formation of a network structure during the gelation of the system by heating [50]. In the work by Hoti et al. [51], the storage modulus increased progressively with higher density of the cross-link system. However, in the HPMC enhanced horse mackerel surimi, the storage modulus increased with temperature and decreased with higher water content [52].

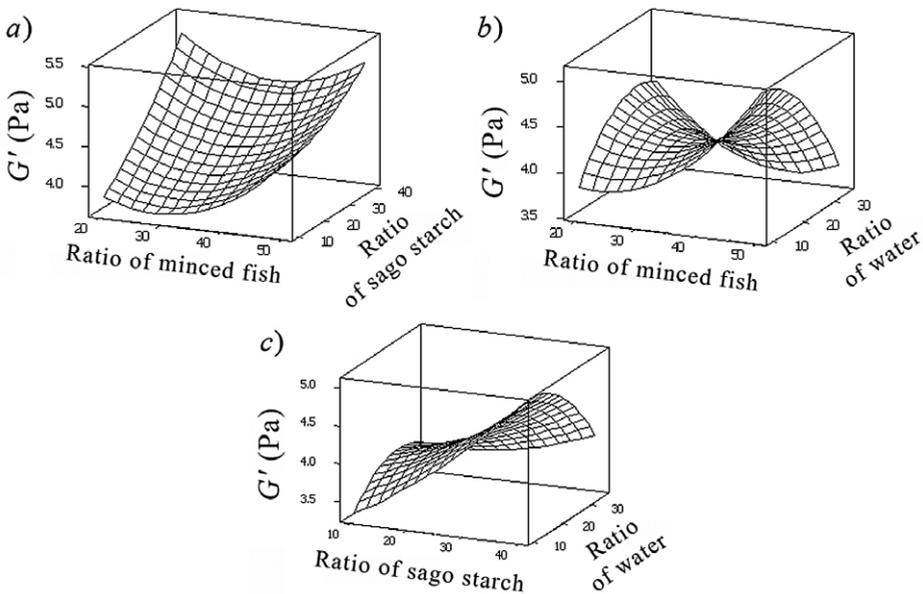


Fig. 3. Response surface plots for the storage modulus of the fish protein–sago starch system as a function of minced fish and sago starch ratios (*a*), minced fish and water ratios (*b*), and sago starch and water ratios (*c*) based on the rheometer measurements.

2.4. Effect of protein–starch interaction on loss modulus (G'') during gelatinization. The loss modulus, often denoted as G'' , is a measure of the viscous or dissipative properties of a material in the context of rheology. Starch gelatinization entails the disruption of hydrogen bonds within the starch granules, allowing water molecules to penetrate and swell them. The loss modulus (G'') of the *keropok lekor* formulations is presented in Table 2 and Fig. 4, *a–c*: G'' exhibited a pattern similar to G' . The system showed an initial increase in G'' at 2.48 Pa and reached the maximum value of 4.48 Pa. The same trend was observed by Matou et al. [53] in their study of starch–meat composite, where the higher ratios of minced fish and water resulted in the lower modulus values of *keropok lekor*. Increasing the ratios of sago starch led to a significant rise in the loss modulus value ($p < 0.05$) (Fig. 4, *a–c*). Li and Yeh [54] studied the effect of high amylose and waxy corn starch, tapioca starch, potato starch, sweet potato starch, pea starch, mung bean starch, and rice starch on the rheological properties of starch–meat complexes. They claimed that the higher loss modulus was associated with the temperature sweep increase. The addition of 30% starch to meat in the starch–meat complex with $76 \pm 0.5\%$ adjusted water resulted in an increase in the loss modulus value for starch and starch–meat composite, and the starch–meat complexes yielded a high G'' , which is associated with the gelatinization of starch. The maximum G'' (5.3 kPa) was observed at 69.3 °C. In Kerry et al. [55], a similar increase in G'' was found by adding modified potato starch in whey protein concentrate.

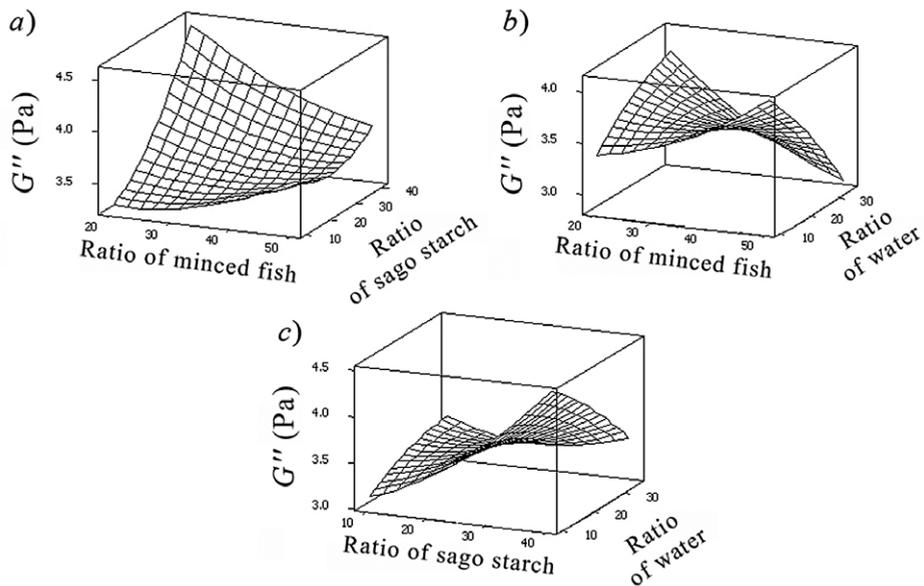


Fig. 4. Response surface plot for the loss modulus of the fish protein–sago starch system as a function of (a) minced fish and sago starch ratios, (b) minced fish and water ratios, and (c) sago starch and water ratios based on the rheometer measurements.

2.5. Texture profile analysis. The results of the texture profile analysis (TPA) for different *keropok lekor* formulations are shown in Table 3. The variations in the TPA values among them are associated with the differences in hardness, fracturability, springiness, cohesiveness, and chewiness.

Table 3

Texture profile analysis parameters of the fish protein–sago starch system formulated with different protein and starch ratios.

Formulation	MF:SS:W	Hardness (N)	Fracturability (N/cm ²)	Springiness (cm)	Cohesiveness (ration)	Chewiness (N/cm)
F1	20:10:10	30.0 ± 0.4 ^a	27.0 ± 0.1 ^a	0.72 ± 0.01 ^a	0.32 ± 0.02 ^a	5.0 ± 1.6 ^a
F2	50:40:10	50.9 ± 0.9 ^b	30.3 ± 0.6 ^b	0.75 ± 0.30 ^a	0.31 ± 0.03 ^a	11.6 ± 2.0 ^b
F3	50:10:35	30.1 ± 0.5 ^c	6.2 ± 0.1 ^c	0.79 ± 0.05 ^a	0.33 ± 0.01 ^a	5.5 ± 0.6 ^c
F4	20:40:35	35.4 ± 0.8 ^d	22.4 ± 0.4 ^d	0.76 ± 0.02 ^a	0.32 ± 0.02 ^a	8.0 ± 1.9 ^d
F5	35:25:22.5	36.4 ± 0.6 ^e	NA	0.85 ± 0.02 ^b	0.41 ± 0.01 ^b	8.1 ± 0.1 ^d
F6	35:25:22.5	32.1 ± 0.2 ^f	NA	0.80 ± 0.01 ^b	0.40 ± 0.01 ^b	6.3 ± 0.5 ^e
F7	50:10:10	33.7 ± 0.4 ^a	21.0 ± 0.8 ^e	0.66 ± 0.01 ^c	0.22 ± 0.02 ^c	4.8 ± 1.2 ^f
F8	20:40:10	35.7 ± 0.4 ^d	18.0 ± 0.3 ^f	0.67 ± 0.01 ^c	0.31 ± 0.04 ^a	6.5 ± 2.1 ^e
F9	20:10:35	33.2 ± 0.8 ^a	18.0 ± 0.7 ^f	0.67 ± 0.03 ^c	0.22 ± 0.01 ^c	5.3 ± 2.9 ^c
F10	50:40:35	43.0 ± 0.4 ^g	25.8 ± 0.2 ^g	0.68 ± 0.02 ^c	0.32 ± 0.03 ^a	7.6 ± 1.9 ^b
F11	35:25:22.5	36.3 ± 0.3 ^e	NA	0.82 ± 0.04 ^b	0.42 ± 0.02 ^b	7.7 ± 1.6 ^b
F12	35:25:22.5	33.9 ± 0.5 ^a	21.2 ± 0.8 ^e	0.64 ± 0.02 ^c	0.23 ± 0.02 ^c	5.2 ± 0.9 ^c
F13	20:25:22.5	30.3 ± 0.9 ^h	18.7 ± 0.1 ^f	0.74 ± 0.03 ^a	0.34 ± 0.03 ^a	7.6 ± 0.5 ^b
F14	50:25:22.5	30.2 ± 0.3 ^h	20.1 ± 0.1 ^e	0.66 ± 0.02 ^c	0.22 ± 0.01 ^c	6.1 ± 0.7 ^f
F15	35:10:22.5	32.8 ± 0.7 ^f	NA	0.76 ± 0.03 ^a	0.32 ± 0.01 ^a	5.3 ± 0.1 ^c
F16	35:40:22.5	45.0 ± 0.2 ⁱ	29.3 ± 0.6 ^a	0.68 ± 0.05 ^c	0.33 ± 0.04 ^a	9.2 ± 0.7 ^b
F17	35:25:10	33.3 ± 0.5 ^a	22.1 ± 0.5 ^d	0.68 ± 0.01 ^c	0.23 ± 0.01 ^c	5.0 ± 0.5 ^c
F18	35:25:35	38.1 ± 0.4 ^j	24.7 ± 0.3 ^g	0.64 ± 0.04 ^c	0.22 ± 0.03 ^c	5.6 ± 1.7 ^c
F19	35:25:22.5	34.0 ± 0.9 ^k	NA	0.77 ± 0.03 ^a	0.42 ± 0.04 ^b	6.7 ± 0.1 ^e
F20	35:25:22.5	36.0 ± 0.3 ^d	23.2 ± 0.8 ^h	0.64 ± 0.03 ^c	0.23 ± 0.04 ^c	5.4 ± 1.3 ^c

Means with the same superscript within the column were not significantly different at $p < 0.5$. Readings were means of triplicate measurements. NA: not available, N: Newton (kg·m/s²), MF: minced fish, SS: sago starch, W: water

The *keropok lekor* samples with the MF : SS : W ratio of 5 : 4 : 1 had the highest hardness value (50.9 N). The second highest hardness value (45.0 N) was observed in the formulation with the MF : SS : W ratio of 3.5 : 4 : 2.25. This could be attributed to the higher proportion of minced fish, as in [3] where the *keropok lekor* texture strengthened as the fish content was increased from 30 to 70%. In Kyaw et al. [48], there was a notable rise in the hardness of *keropok lekor* (from 9.9 N to 15.4 N) when the fish content in the product was from 30 to 50%. Being rich in protein, fish boosts the hardness of food products by increasing their viscoelasticity. Another crucial point here is that the lowest hardness value (20.1 N) was recorded in the sample formulated with the MF : SS : W ratio of 5 : 1 : 3.5, followed by 22.1 N in another sample, which might be related to the low ratio of starch. In the work by Kyaw [26], the reinforcing effect of starch in the composite was not significant when the starch matrix contained too much fish protein (60–80 %), thereby leading to the disruption of the matrix continuity. Increasing the MF ratio enhanced the hardness of *keropok lekor*. Hardness is closely linked to cohesiveness, which refers to the strength of the internal bonds making up the body of the sample [56]. In this study, cohesiveness was positively correlated with the ratio of minced fish, but this relationship was not significant ($p > 0.05$). In most food systems, the adhesion force is a combination of adhesive and cohesive

forces, and a food material is perceived as being sticky when its cohesive force is low [57]. The cohesiveness values in all the analyzed samples were not close to 1.0, which may indicate that increasing the minced fish and sago starch ratios in the system decreased the recovery of the samples after the first compression. This finding aligns with the study by Tabilo-Munizaga and Barbosa-Cánovas [58], in which the cohesiveness value in the texture profile of the samples was close to 1, indicate sample recovery after the first compression. Allais et al. [59] added starch to frankfurters and found that an increase in the starch content improved the hardness and chewiness, decreased the springiness, but had no significant effect on the cohesiveness values. Hughes et al. [60] revealed the higher gel strength in frankfurters formulated with added starch. As the starch granules within the protein gel matrix swell, they contribute to the formation of stronger heat-induced structures. Chen et al. [61] suggested that this phenomenon could increase the water-binding capacity of the gel matrix, resulting in a firmer, more compact structure after cooking.

2.6. Sensory evaluation. The scores given for the sensory attributes of the *keropok lekor* samples are given in Table 4.

Table 4.

Scores attributed to the texture and overall acceptability of the fish protein–sago starch system in the sensory evaluation.

Formulation	MF:SS:W	Taste	Texture	Color	Flavor	Overall acceptability
F1	20:10:10	5.4 ± 1.2 ^b	5.6 ± 1.2 ^b	5.4 ± 1.2 ^b	6.3 ± 0.8 ^b	6.6 ± 0.8 ^b
F2	50:40:10	4.8 ± 1.1 ^a	4.8 ± 1.1 ^a	4.8 ± 1.1 ^a	5.3 ± 1.2 ^a	5.3 ± 1.2 ^a
F3	50:10:35	4.8 ± 1.0 ^a	4.8 ± 1.0 ^a	4.8 ± 1.0 ^a	5.5 ± 1.1 ^a	5.5 ± 1.1 ^a
F4	20:40:35	3.9 ± 1.3 ^c	3.6 ± 1.3 ^c	4.3 ± 1.3 ^c	5.1 ± 1.1 ^a	5.1 ± 1.1 ^a
F5	35:25:22.5	5.4 ± 1.2 ^b	5.4 ± 1.2 ^b	5.5 ± 1.2 ^b	6.0 ± 0.7 ^b	6.0 ± 0.7 ^b
F6	35:25:22.5	4.7 ± 1.4 ^a	4.7 ± 1.4 ^a	4.7 ± 1.4 ^a	6.1 ± 0.9 ^b	6.1 ± 0.9 ^b
F7	50:10:10	5.3 ± 1.1 ^b	5.3 ± 1.1 ^b	5.3 ± 1.1 ^b	5.5 ± 0.9 ^a	5.5 ± 0.9 ^a
F8	20:40:10	5.0 ± 1.3 ^b	5.0 ± 1.3 ^b	5.0 ± 1.3 ^b	5.6 ± 1.0 ^a	5.6 ± 1.0 ^a
F9	20:10:35	4.8 ± 1.4 ^a	4.8 ± 1.4 ^a	4.8 ± 1.4 ^a	5.8 ± 0.9 ^a	5.8 ± 0.9 ^a
F10	50:40:35	5.3 ± 1.3 ^b	5.3 ± 1.3 ^b	5.3 ± 1.3 ^b	5.9 ± 0.8 ^b	5.9 ± 0.8 ^b
F11	35:25:22.5	4.7 ± 1.4 ^a	4.7 ± 1.4 ^a	4.7 ± 1.4 ^a	5.9 ± 0.9 ^b	5.9 ± 0.9 ^b
I2	35:25:22.5	5.0 ± 1.2 ^b	5.0 ± 1.2 ^b	5.0 ± 1.2 ^b	6.0 ± 0.8 ^b	6.0 ± 0.8 ^b
F13	20:25:22.5	4.8 ± 1.1 ^a	4.8 ± 1.1 ^a	4.8 ± 1.1 ^a	5.5 ± 1.1 ^a	5.5 ± 1.1 ^a
F14	50:25:22.5	4.8 ± 1.5 ^a	4.8 ± 1.5 ^a	4.8 ± 1.5 ^a	4.9 ± 1.0 ^c	5.2 ± 1.0 ^c
F15	35:10:22.5	5.2 ± 1.1 ^b	5.2 ± 1.1 ^b	5.2 ± 1.1 ^b	5.8 ± 0.9 ^a	5.8 ± 0.9 ^a
F16	35:40:22.5	4.9 ± 1.5 ^a	4.9 ± 1.5 ^a	4.9 ± 1.5 ^a	5.6 ± 1.2 ^a	5.6 ± 1.2 ^a
F17	35:25:10	5.2 ± 1.1 ^b	5.2 ± 1.1 ^b	5.2 ± 1.1 ^b	5.8 ± 0.9 ^a	5.8 ± 0.9 ^a
F18	35:25:35	5.3 ± 1.5 ^b	5.3 ± 1.5 ^b	5.3 ± 1.5 ^b	5.6 ± 1.0 ^a	5.6 ± 1.0 ^a
F19	35:25:22.5	5.0 ± 1.5 ^b	5.0 ± 1.5 ^b	5.0 ± 1.5 ^b	6.2 ± 0.8 ^b	6.4 ± 0.8 ^b
F20	35:25:22.5	5.2 ± 0.9 ^b	5.2 ± 0.9 ^b	5.2 ± 0.9 ^b	6.2 ± 0.8 ^b	6.2 ± 0.8 ^b

Different superscript letters within the columns are significant differences ($p < 0.05$). MF: minced fish, SS: sago starch, W: water

Their values were statistically different ($p < 0.05$) and ranged as follows: 3.9–5.4 for taste; 3.6–5.6 for texture; 4.3–5.4 for color; 4.9–6.5 for flavor, and 5.2–6.6 for overall acceptability. The sample formulated with the MF : SS : W ratio of 20 : 10 : 10 received the highest scores across all attributes. The lowest score for the texture attribute was obtained in the sample formulated with the MF : SS : W ratio of 20 : 40 : 35, mainly because of the excess starch content (twice as much as the fish ratio) causing the texture to turn firmer after frying. Local producers add more starch while making *keropok lekor* to maximize their profits. The panelists generally preferred the formulations with the MF : SS ratios of 20 : 10 and 35 : 25. According to Kyaw [26], *keropok lekor* crackers should contain 60% minced fish, 30% sago starch, and 10% tapioca starch.

Conclusions

The rheological, textural, and sensory properties of *keropok lekor* can be improved by adjusting the amounts of its key ingredients—fish protein, sago starch, and water. Among the formulations tested, the one with the MF : SS : W ratio of 20 : 10 : 10 was marked by the lowest onset and peak temperatures of gelatinization, as well as the lowest values of hardness and chewiness. With the highest scores in overall acceptability, this particular formulation was identified as the optimal and preferred choice for *keropok lekor*.

Institutional Review Board Statement. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (2000).

Informed Consent Statement. Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Acknowledgments. We thank the staff at the Food Processing Laboratory, Universiti Putra Malaysia for their assistance and advice during the preparation of *keropok lekor*.

Conflicts of Interest. The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Iqmal-Afifi L., Arifin N., Huda-Faujan N., Ramly N. Physicochemical properties and sensory preference of *keropok lekor* with partial replacement of fish flesh with oyster mushroom. *Malays. J. Sci. Health Technol.*, 2023, vol. 9, no. 2, pp. 128–135. <https://doi.org/10.33102/mjosht.v9i2.357>.
2. Zim A.F.M.I.U., Akter A., Ali M.S., Anik W.A., Ahmed S., Zamri A.I.B. Proximate composition, texture analysis and sensory evaluation of *keropok lekor* formulated with herbs and spices. *Food Res.*, 2019, vol. 3, no. 6, pp. 635–639. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.3\(6\).050](https://doi.org/10.26656/fr.2017.3(6).050).
3. Cheow C.S., Yu S.Y., Howell N.K. Effect of salt, sugar and monosodium glutamate on the viscoelastic properties of fish cracker (“*keropok*”) gel. *J. Food Process. Preserv.*, 1999, vol. 23, no. 1, pp. 21–37. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.1999.tb00367.x>.
4. Nur Liyana N., Nor-Khaizura M.A.R., Ismail-Fitry M.R. Effect of substituting tapioca starch with various high protein legume flours on the physicochemical and sensory properties of *keropok lekor* (Malaysian fish sausage). *Food Res.*, 2018, vol. 3, no. 1, pp. 40–48. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.3\(1\).217](https://doi.org/10.26656/fr.2017.3(1).217).
5. Hussain H., Bustamam M.A., Vimala B., Lai T.C., Mahiyuddin W.R.W., Fitrianto A., Razak M.F.A., Mohamud W.N.W., Bakar J., Ghazali H.M. Screening biogenic

- amines and fish-based food (keropok lekor) extracts in induction of inflammation using Principal Component Analysis. *Res. Square*, preprint (ver. 1), 2019, pp. 1–17. <https://doi.org/10.21203/rs.2.12436/v1>.
6. Abd Rashid N.Y., Manan M.A., Pa'ee, K.F., Saari N., Faizal Wong F.W. Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of fish protein hydrolysate produced from Malaysian fish sausage (*Keropok Lekor*) by-products by indigenous *Lactobacillus casei* fermentation. *J. Cleaner Prod.*, 2022, vol. 347, art. 131303. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.131303>.
 7. Nor-Khaizura M.A.R., Zaiton H., Jamilah B., Rusul R.A.G., Ismail-Fitry M.R. Histamine and histamine-forming bacteria in *keropok lekor* (Malaysian fish sausage) during processing. *Food Sci. Technol. Res.*, 2009, vol. 15, no. 4, pp. 395–402. <https://doi.org/10.3136/fstr.15.395>.
 8. Hatta W.N.N.W.Md. The authentic of 'keropok lekor' process. *Arts Des. Stud.*, 2015, vol. 27, pp. 1–7.
 9. Bakar J. Keropok lekor—boiling and steaming methods of processing. *Pertanika*, 1983, vol. 6, no. 3, pp. 56–60.
 10. Kumar L., Brennan M.A., Mason S.L., Zheng H., Brennan C.S. Rheological, pasting and microstructural studies of dairy protein–starch interactions and their application in extrusion-based products: A review. *Starch*, 2016, vol. 69, nos. 1–2, pp. 1–11. <https://doi.org/10.1002/star.201600273>.
 11. Chakraborty I., N P., Mal S.S., Paul U.C., Rahman Md.H., Mazumder N. An insight into the gelatinization properties influencing the modified starches used in food industry: A review. *Food Bioprocess Technol.*, 2022, vol. 15, no. 6, pp. 1195–1223. <https://doi.org/10.1007/s11947-022-02761-z>.
 12. Adedara O.A., Taylor J.R.N. Roles of protein, starch and sugar in the texture of sorghum biscuits. *LWT – Food Sci. Technol.*, 2021, vol. 136, art. 110323. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110323>.
 13. Boonkor P., Sagis L.M.C., Lumdubwong N. Pasting and rheological properties of starch paste/gels in a sugar-acid system. *Foods*, 2022, vol. 11, no. 24, art. 4060. <https://doi.org/10.3390/foods11244060>.
 14. Woodbury T.J., Grush E., Allan M.C., Mauer L.J. The effects of sugars and sugar alcohols on the pasting and granular swelling of wheat starch. *Food Hydrocolloids*, 2022, vol. 126, art. 107433. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107433>.
 15. Woodbury T.J., Pitts S.L., Pilch A.M., Smith P., Mauer L.J. Mechanisms of the different effects of sucrose, glucose, fructose, and a glucose–fructose mixture on wheat starch gelatinization, pasting, and retrogradation. *J. Food Sci.*, 2022, vol. 88, no. 1, pp. 293–314. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16414>.
 16. Desam G.P., Jones O.G., Narsimhan G. Prediction of the effect of sucrose on equilibrium swelling of starch suspensions. *J. Food Eng.*, 2021, vol. 294, art. 110397. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110397>.
 17. Sarker M.Z.I., Elgadir M.A., Ferdosh S., Akanda M.J.H., Aditiawati P., Noda T. Rheological behavior of starch-based biopolymer mixtures in selected processed foods. *Starch*, 2012, vol. 65, nos. 1–2, pp. 73–81. <https://doi.org/10.1002/star.201200072>.
 18. Zhang B., Qiao D., Zhao S., Lin Q., Wang J., Xie F. Starch-based food matrices containing protein: Recent understanding of morphology, structure, and properties. *Trends Food Sci. Technol.*, 2021, vol. 114, pp. 212–231. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.05.033>.
 19. Chen Q., Zhang J., Zhang Y., Kaplan D.L., Wang Q. Protein-amylose/amylopectin molecular interactions during high-moisture extruded texturization toward plant-based meat substitutes applications. *Food Hydrocolloids*, 2022, vol. 127, art. 107559. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107559>.

20. Peng D., Tang D., Zhong C., Wang K., Huang H., He Z., Lv C., Chen J., Li P., Du B. Interactions between Fuzi (*Aconiti Lateralis Radix Preparata*) total alkaloids and Fuzi starch: Structural, physicochemical, and rheological properties. *LWT – Food Sci. Technol.*, 2023, vol. 182, art. 114879. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114879>.
21. Carvajal-Mena N., Tabilo-Munizaga G., Pérez-Won M., Herrera-Lavados C., Lemus-Mondaca R., Moreno-Osorio L. Evaluation of physicochemical properties of starch-protein gels: Printability and postprocessing. *LWT – Food Sci. Technol.*, 2023, vol. 182, art. 114797. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114797>.
22. Sun B., Qian X., Zhou M., Gu Y., Ma S., Wang X. Changes of gelation behavior, water distribution and digestibility of protein-starch mixtures in the oat dough/batter model affected by water. *LWT – Food Sci. Technol.*, 2023, vol. 182, art. 114860. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114860>.
23. Wang M., Shen Y., Wang B., Liu S., Zhu P. Effect of starch type on the physicochemical and emulsifying properties of amorphous starch–whey protein isolate mixtures. *LWT – Food Sci. Technol.*, 2023, vol. 185, art. 115134. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115134>.
24. Gui Y., Zou F., Zhu Y., Li J., Wang N., Guo L., Cui B. The structural, thermal, pasting and gel properties of the mixtures of enzyme-treated potato protein and potato starch. *LWT – Food Sci. Technol.*, 2022, vol. 154, art. 112882. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112882>.
25. Mauro R.R., Vela A.J., Ronda F. Impact of starch concentration on the pasting and rheological properties of gluten-free gels. Effects of amylose content and thermal and hydration properties. *Foods*, 2023, vol. 12, no. 12, art. 2281. <https://doi.org/10.3390/foods12122281>.
26. Kyaw Z.Y. Protein–hydrocolloids interactions in “keropok lekor”. *PhD Thesis*. Univ. Putra Malays., 2004, 207 p.
27. Ould Eleya M., Turgeon S.L. Rheology of κ -carrageenan and β -lactoglobulin mixed gels. *Food Hydrocolloids*, 2000, vol. 14, no. 1, pp. 29–40. [https://doi.org/10.1016/s0268-005x\(99\)00043-0](https://doi.org/10.1016/s0268-005x(99)00043-0).
28. Martínez O., Salmerón J., Guillén M.D., Casas C. Texture profile analysis of meat products treated with commercial liquid smoke flavourings. *Food Control*, 2004, vol. 15, no. 6, pp. 457–461. [https://doi.org/10.1016/s0956-7135\(03\)00130-0](https://doi.org/10.1016/s0956-7135(03)00130-0).
29. Ayo J., Carballo J., Solas M.T., Jiménez-Colmenero F. Physicochemical and sensory properties of healthier frankfurters as affected by walnut and fat content. *Food Chem.*, 2008, vol. 107, no. 4, pp. 1547–1552. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.019>.
30. Kong C.S., Ogawa H., Iso N. Compression properties of fish-meat gel as affected by gelatinization of added starch. *J. Food Sci.*, 1999, vol. 64, no. 2, pp. 283–286. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1999.tb15883.x>.
31. Scott G., Awika J.M. Effect of protein–starch interactions on starch retrogradation and implications for food product quality. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 2023, vol. 22, no. 3, pp. 2081–2111. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13141>.
32. Kett A.P., Chaurin V., Fitzsimons S.M., Morris E.R., O’Mahony J.A., Fenelon M.A. Influence of milk proteins on the pasting behaviour and microstructural characteristics of waxy maize starch. *Food Hydrocolloids*, 2013, vol. 30, no. 2, pp. 661–671. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.08.002>.
33. Kumar L., Brennan M., Brennan C., Zheng H. Thermal, pasting and structural studies of oat starch-caseinate interactions. *Food Chem.*, 2022, vol. 373, pt. B, art. 131433. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131433>.
34. Aguilera J.M., Rojas E. Rheological, thermal and microstructural properties of whey protein-cassava starch gels. *J. Food Sci.*, 1996, vol. 61, no. 5, pp. 962–966. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1996.tb10911.x>.

35. Tsai M.-L., Li C.-F., Lii C.-Y. Effects of granular structures on the pasting behaviors of starches. *Cereal Chem.*, 1997, vol. 74, no. 6, pp. 750–757. <https://doi.org/10.1094/cchem.1997.74.6.750>.
36. Mohamed A.A., Rayas-Duarte P. The effect of mixing and wheat protein/gluten on the gelatinization of wheat starch. *Food Chem.*, 2003, vol. 81, no. 4, pp. 533–545. [https://doi.org/10.1016/s0308-8146\(02\)00487-9](https://doi.org/10.1016/s0308-8146(02)00487-9).
37. Yeh A.-I., Li J.-Y. A continuous measurement of swelling of rice starch during heating. *J. Cereal Sci.*, 1996, vol. 23, no. 3, pp. 277–283. <https://doi.org/10.1006/jcrs.1996.0028>.
38. Li C. Recent progress in understanding starch gelatinization – an important property determining food quality. *Carbohydr. Polym.*, 2022, vol. 293, art. 119735. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119735>.
39. Zhao Y., Dai X., Mackon E., Ma Y., Liu P. Impacts of protein from high-protein rice on gelatinization and retrogradation properties in high- and low-amylose reconstituted rice flour. *Agronomy*, 2022, vol. 12, no. 6, art. 1431. <https://doi.org/10.3390/agronomy12061431>.
40. Bresciani A., Emide D., Saitta F., Fessas D., Iametti S., Barbiroli A., Marti A. Impact of thermal treatment on the starch-protein interplay in red lentils: Connecting molecular features and rheological properties. *Molecules*, 2022, vol. 27, no. 4, art. 1266. <https://doi.org/10.3390/molecules27041266>.
41. Jia R., Cui C., Gao L., Qin Y., Ji N., Dai L., Wang Y., Xiong L., Shi R., Sun Q. A review of starch swelling behavior: Its mechanism, determination methods, influencing factors, and influence on food quality. *Carbohydr. Polym.*, 2023, vol. 321, art. 121260. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121260>.
42. Shao Y., Jiao R., Wu Y., Xu F., Li Y., Jiang Q., Zhang L., Mao L. Physicochemical and functional properties of the protein–starch interaction in Chinese yam. *Food Sci. Nutr.*, 2023, vol. 11, no. 3, pp. 1499–1506. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3189>.
43. Ramli H., Zainal N.F.A., Hess M., Chan C.H. Basic principle and good practices of rheology for polymers for teachers and beginners. *Chem. Teach. Int.*, 2022, vol. 4, no. 4, pp. 307–326. <https://doi.org/10.1515/cti-2022-0010>.
44. Polo-Muñoz M.P., Garcia-Parra M.Á., Roa-Acosta D.F. Viscoelastic behavior of gels obtained from five cultivars of quinoa at altitude gradient. *Front. Sustainable Food Syst.*, 2023, vol. 7, art. 1222277. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2023.1222277>.
45. Lavoisier A., Aguilera J.M. Starch gelatinization inside a whey protein gel formed by Cold Gelation. *J. Food Eng.*, 2019, vol. 256, pp. 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.03.013>.
46. Ding C., Zhang M., Li G. Rheological properties of collagen/hydroxypropyl methylcellulose (Col/HPMC) blended solutions. *J. Appl. Polym. Sci.*, 2013, vol. 131, no. 7, art. 40042. <https://doi.org/10.1002/app.40042>.
47. Mohamed A.A., Hussain S., Alamri M.S., Ibraheem M.A., Abdo Qasem A.A., Yehia H. Camel milk-sweet potato starch gel: Steady shear and dynamic rheological properties. *Food Sci. Technol.*, 2022, vol. 42, no. 1, art. e20021. <https://doi.org/10.1590/fst.20021>.
48. Kyaw Z.Y., Yu S.Y., Cheow C.S., Dzulkifly M.H., Howell N.K. Effect of fish to starch ratio on viscoelastic properties and microstructure of fish cracker (‘keropok’) dough. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2001, vol. 36, no. 7, pp. 741–747. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2001.00481.x>.
49. Chen S.-D., Chen H.-H., Chao Y.-C., Lin R.-S. Effect of batter formula on qualities of deep-fat and microwave fried fish nuggets. *J. Food Eng.*, 2009, vol. 95, no. 2, pp. 359–364. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.05.016>.
50. Taewee T.K. Cracker “Keropok”: A review on factors influencing expansion. *Int. Food Res. J.*, 2011, vol. 18, no. 3, pp. 855–866.

51. Hoti G., Caldera F., Cecone C., Rubin Pedrazzo A., Anceschi A., Appleton S.L., Monfared Y.K., Trotta F. Effect of the cross-linking density on the swelling and rheological behavior of ester-bridged β -cyclodextrin nanosponges. *Materials*, 2021, vol. 14, no. 3, art. 478. <https://doi.org/10.3390/ma14030478>.
52. Chen H.-H. Rheological properties of HPMC enhanced Surimi analyzed by small- and large-strain tests: I. The effect of concentration and temperature on HPMC flow properties. *Food Hydrocolloids*, 2007, vol. 21, no. 7, pp. 1201–1208. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.09.007>.
53. Li J.-Y., Yeh A.-I. Functions of starch in formation of starch/meat composite during heating. *J. Texture Stud.*, 2002, vol. 33, no. 4, pp. 341–366. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.2002.tb01353.x>.
54. Li J.-Y., Yeh A.-I. Effects of starch properties on rheological characteristics of starch/meat complexes. *J. Food Eng.*, 2003, vol. 57, no. 3, pp. 287–294. [https://doi.org/10.1016/s0260-8774\(02\)00309-6](https://doi.org/10.1016/s0260-8774(02)00309-6).
55. Kerry J.F., Morrissey P.A., Buckley D.J. The rheological properties of exudates from cured porcine muscle: Effects of added polysaccharides and whey protein/polysaccharide blends. *J. Sci. Food Agric.*, 1999, vol. 79, no. 10, pp. 1260–1266. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(19990715\)79:10<1260::AID-JSFA354>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(19990715)79:10<1260::AID-JSFA354>3.0.CO;2-S).
56. de Huidobro F.R., Miguel E., Blázquez B., Onega E. A comparison between two methods (Warner–Bratzler and texture profile analysis) for testing either raw meat or cooked meat. *Meat Sci.*, 2005, vol. 69, no. 3, pp. 527–536. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.09.008>.
57. Hosoney R.C., Smewing J. Instrumental measurement of stickiness of doughs and other foods. *J. Texture Stud.*, 1999, vol. 30, no. 2, pp. 123–136. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.1999.tb00206.x>.
58. Tabilo-Munizaga G., Barbosa-Cánovas G.V. Color and textural parameters of pressurized and heat-treated surimi gels as affected by potato starch and egg white. *Food Res. J.*, 2004, vol. 37, no. 8, pp. 767–775. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.04.001>.
59. Allais I., Viaud C., Pierre A., Dufour É. A rapid method based on front-face fluorescence spectroscopy for the monitoring of the texture of meat emulsions and frankfurters. *Meat Sci.*, 2004, vol. 67, no. 2, pp. 219–229. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2003.10.009>.
60. Hughes E., Mullen A.M., Troy D.J. Effects of fat level, tapioca starch and whey protein on frankfurters formulated with 5% and 12% fat. *Meat Sci.*, 1998, vol. 48, nos. 1–2, pp. 169–180. [https://doi.org/10.1016/s0309-1740\(97\)00087-9](https://doi.org/10.1016/s0309-1740(97)00087-9).
61. Chen J.S., Lee C.M., Crapo C.R. Linear programming and response surface methodology to optimize surimi gel texture. *J. Food Sci.*, 1993, vol. 58, no. 3, pp. 535–538. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb04318.x>.

Received December 19, 2023

Accepted February 10, 2024

Abd Elgadir Mohamed, PhD in Food Science and Technology, Associate Professor, Department of Food Science and Human Nutrition

College of Agriculture and Veterinary Medicine, Qassim University
Buraydah, 51452 Saudi Arabia

Universiti Putra Malaysia (UPM)
Serdang, Selangor, 43400 Malaysia
E-mail: mam.qassim@gmail.com

Bakar Jamilah, PhD in Food Processing & Preservation, Professor, Faculty of Food Science & Technology

Universiti Putra Malaysia (UPM)
Serdang, Selangor, 43400 Malaysia
E-mail: jamilah@upm.edu.my

Abdul Rahman Russly, PhD in Food Technology, Professor, Faculty of Food Science & Technology
Universiti Putra Malaysia (UPM)
Serdang, Selangor, 43400 Malaysia
E-mail: russly@upm.edu.my

Karim Roselina, PhD in Food Technology, Professor, Faculty of Food Science & Technology
Universiti Putra Malaysia (UPM)
Serdang, Selangor, 43400 Malaysia
E-mail: russly@upm.edu.my

Mariod Abdalbasit Adam, PhD in Food Science, Professor, Department of Biology, College of Science;
Professor, Indigenous Knowledge and Heritage Centre
University of Jeddah
Jeddah, 21931 Saudi Arabia
Ghibaish College of Science and Technology
Ghibaish, 110 Sudan
E-mail: basitmariod58@gmail.com

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

УДК 547.96:612.392.73

doi: 10.26907/2542-064X.2024.2.238-254

Взаимодействие белка и крахмала в рыбных крекерах *керопок лекор* и его влияние на их реологические, текстурные и органолептические свойства

М. Абд Эльгадир^{1,2}, Дж. Бакар², Р. Абдул Рахман², Р. Карим², А.А. Мариод^{3,4}

¹Колледж сельского хозяйства и ветеринарной медицины, Университет аль-Касым, Бурайда, 51452, Саудовская Аравия

²Университет Путра Малайзия, Серданг, Селангор, 43400, Малайзия

³Колледж науки, Университет Джидды, Джидда, 21931, Саудовская Аравия

⁴Центр знаний и наследия коренных народов, Колледж науки и технологий Гибайша, Гибайш, 110, Республика Судан

Аннотация

В статье рассматриваются особенности взаимодействия белка и крахмала и его влияние на гелеобразующие, текстурные и органолептические свойства системы рыбный белок – крахмал на примере традиционного малайзийского блюда *керопок лекор*. Методом двухфакторного анализа изучены рецептурные составы крекеров *керопок лекор* с различным соотношением рыбного фарша (MF, 20–50 г от общей массы), крахмала саго (SS, 10–40 г от общей массы) и воды (W, 10–35 г от общей массы). Рассчитаны их начальная (T_0) и пиковая (T_p) температуры желатинизации, динамический модуль упругости (G'), а также модуль потерь упругости при желатинизации (G''). Органолептические и текстурные свойства образцов оценивали в ходе дегустации с привлечением 30 респондентов. Наивысшую оценку получили образцы, в которых соотношение рыбного фарша, крахмала саго и воды составило 20 : 10 : 10. По результатам проведенного исследования именно этот вариант рецептуры был выбран в качестве наиболее оптимального для приготовления *керопок лекор*.

Ключевые слова: *керопок лекор*, рыбный крекер, крахмал саго, взаимодействие белка и крахмала, желатинизация, модуль упругости, органолептическая оценка

Заключение Комитета по этике. Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией 2000 г.

Информированное согласие. Информированное согласие было получено от всех субъектов, участвовавших в исследовании.

Благодарности. Авторы выражают искреннюю благодарность коллегам из Лаборатории пищевой промышленности (Университет Путра Малайзия) за помощь и ценные советы в ходе подготовки образцов керопок лекор для последующего исследования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 19.12.2023

Принята к публикации 10.02.2024

Абд Эльгадир Мухаммед, доктор философии в области наук о продуктах питания и их производстве, доцент, кафедра наук о пищевых продуктах и питании человека

Колледж сельского хозяйства и ветеринарной медицины, Университет аль-Касым

Бурайда, 51452, Саудовская Аравия

Университет Путра Малайзия

Серданг, Селангор, 43400, Малайзия

E-mail: mam.qassim@gmail.com

Бакар Джамиля, доктор философии в области наук по переработке и хранению продуктов питания, профессор, факультет наук о пищевых продуктах и технологиях пищевого производства

Университет Путра Малайзия

Серданг, Селангор, 43400, Малайзия

E-mail: jamilah@upm.edu.my

Абдул Рахман Рассли, доктор философии в области наук о технологиях пищевого производства, профессор, факультет наук о пищевых продуктах и технологиях пищевого производства

Университет Путра Малайзия

Серданг, Селангор, 43400, Малайзия

E-mail: russly@upm.edu.my

Карим Розелина, доктор философии в области наук о технологиях пищевого производства, профессор, факультет наук о пищевых продуктах и технологиях пищевого производства

Университет Путра Малайзия

Серданг, Селангор, 43400, Малайзия

E-mail: russly@upm.edu.my

Мариод Абдулбасит Адам, доктор философии в области наук о продуктах питания, профессор, кафедра биологии, Колледж наук; профессор, Центр знаний и наследия коренных народов

Университет Джидды

Джидда, 21931, Саудовская Аравия

Колледж науки и технологий Гибайша

Гибайш, 110, Республика Судан

E-mail: basitmariod58@gmail.com

For citation: Abd Elgadir M., Bakar J., Abdul Rahman R., Karim R., Mariod A.A. Effect of protein–starch interaction on rheological, textural, and sensory properties of *keropok lekor*. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2024, vol. 166, no. 2, pp. 238–254. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2024.2.238-254>.

Для цитирования: *Abd Elgadir M., Bakar J., Abdul Rahman R., Karim R., Mariod A.A.* Effect of protein–starch interaction on rheological, textural, and sensory properties of *keropok lekor* // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2024. Т. 166, кн. 2. С. 238–254. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2024.2.238-254>.

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

УДК 543.94

doi: 10.26907/2542-064X.2024.2.255-265

АФФИННОСТЬ К ЭСТРОГЕНОВОМУ РЕЦЕПТОРУ α (ER α) ПРОИЗВОДНОГО *ТРАНС*-СТИЛЬБЕНА, СОДЕРЖАЩЕГО ФРАГМЕНТ ПИРИДОКСИНА

*О.В. Бондарь, Р. Карут, О.А. Мостовая, М.В. Пугачев,
А.Г. Иксанова, Ю.Г. Штырлин*

Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

Аннотация

Исследование направлено на поиск молекулярных мишеней действия перспективного противоопухолевого агента на основе *транс*-стильбена, содержащего в своей структуре фрагмент пиридоксина. Выявленное соединение-лидер ((*E*)-6-(3,4-диметоксистирил)-2,2,5,8-тетраметил-4*H*-[1,3]диоксино[4,5-*c*]пиридин) селективно индуцирует апоптоз в клетках аденокарциномы молочной железы MCF-7, гиперэкспрессирующих рецептор эстрогена, но не в клетках MDA-MB-231, негативных по эстрогеновому рецептору. В связи с этим изучен механизм действия этого производного *транс*-стильбена в качестве селективного модулятора рецепторов эстрогена. С использованием флуоресцентного поляризационного теста оценено сродство производного *транс*-стильбена к человеческому эстрогеновому рецептору α (ER α). Показано, что, в отличие от его структурных аналогов тамоксифена и ралоксифена, соединение-лидер не обладает сродством к ER α и не формирует комплексов с ним. На основании этого факта сделан вывод об альтернативном механизме селективного действия пиридоксинсодержащего производного *транс*-стильбена в отношении эстроген-позитивных клеток рака молочной железы. Для эстрадиола, ралоксифена и тамоксифена рассчитаны значения EC₅₀ вытеснения из активного центра ER α флуоресцентного лиганда, которые составили 22, 120 и 595 нМ соответственно.

Ключевые слова: *транс*-стильбены, пиридоксин, эстрогеновый рецептор α , тамоксифен, ралоксифен, комплексообразование, поляризация флуоресценции.

Введение

Для лечения опухолей молочной железы широко применяют селективные модуляторы рецепторов эстрогена – тамоксифен и ралоксифен, которые имеют структурное сходство с женским половым гормоном – эстрадиолом. Такие молекулы связываются с рецептором эстрогена, но в отличие от эстрадиола подавляют активацию рецептора и пролиферацию тканей молочной железы, оказывая противоопухолевый эффект [1].

Тамоксифен применяют для терапии эстроген-позитивного метастатического рака молочной железы в комплексе с другими препаратами, а также для предотвращения рецидивов после хирургического удаления опухоли, лучевой терапии или для профилактики в группе пациентов с высоким риском развития

рака молочной железы [4]. Тамоксифен связывается с эстрогеновым рецептором α (ER α), препятствует связыванию с ним эстрадиола и активации рецептора в тканях молочной железы. Это сопровождается отсутствием транскрипции эстроген-зависимых генов, к которым относятся факторы роста и онкогены [5]. Тамоксифен также является антагонистом эстрогенового рецептора β в тканях молочной железы [6], но играет роль агониста эстрогеновых рецепторов в матке и стимулирует пролиферацию эндометрия, что повышает риск развития рака эндометрия [7].

Ралоксифен назначают для терапии остеопороза у женщин в постменопаузе, а также в профилактических целях пациентам с высоким риском развития рака молочной железы. Он демонстрирует проэстрогенный эффект в костной ткани и стимулирует метаболизм липидов (в качестве протектора против атеросклеротических осложнений сосудов), однако является антиэстрогеном в тканях молочной железы и эндометрии матки [8, 9]. Ралоксифен обладает высоким сродством как к ER α , так и к эстрогеновому рецептору β . По данным рентгеноструктурного анализа, ралоксифен связывается с ER α с небольшим отличием в 3D-структуре от аналогичного комплекса с эстрадиолом [10]. Агонистическое или антагонистическое действие ралоксифена и тамоксифена зависит от степени привлечения коактиваторов и корепрессоров к промоторам гена-мишени рецептора эстрогена [11–13]. Вследствие различной степени экспрессии коактиваторов и корепрессоров в различных тканях эффекты становятся тканеспецифичными.

В лаборатории НОЦ фармацевтики КФУ синтезируют новые соединения, которые объединяют в своей структуре фрагмент молекулы пиридоксина (витамина B₆) и фрагмент стильбена в *транс*-конфигурации относительно двойной связи [2, 3]. Подобная структура имитирует ароматическую систему эстрадиола. В ходе предыдущих исследований получен широкий ряд (31 новое соединение) пиридоксинсодержащих производных *транс*-стильбена, проведен скрининг их противоопухолевой активности в отношении панели опухолевых клеточных линий [2] и выявлено соединение-лидер **I** ((*E*)-6-(3,4-диметокси-стирил)-2,2,5,8-тетраметил-4*H*-[1,3]диоксино[4,5-*c*]пиридин), содержащее шестичленный кетальный цикл, метильную группу в пятом и 3,4-диметокси-стириловый фрагмент в шестом положении пиридинового кольца с *транс*-конфигурацией относительно двойной связи (рис. 1). Установлено, что соединение-лидер **I** обладает селективной антипролиферативной активностью в отношении опухолевых клеток MCF-7 с высокой продукцией эстрогеновых рецепторов (ER+) (IC₅₀ < 5 мкМ) и в то же время в отношении клеток с низкой продукцией рецепторов эстрогена MDA-MB231 (ER-) активность в 3.3 раза меньше [2]. Терапевтический индекс (отношение IC₅₀ для условно-нормальных клеток к IC₅₀ для опухолевых клеток) соединения-лидера составил 48 (у реперного соединения ралоксифена он равен 5.8) [2]. Соединение-лидер **I** эффективно проникает в цитоплазму опухолевых клеток, а также накапливается в их ядрах, что может способствовать взаимодействию с рецепторами ядра [3]. Также показано, что соединение-лидер **I** активирует программируемую гибель (апоптоз) только опухолевых клеток ER+. При этом соединение-лидер **I** уменьшает мембранный потенциал митохондрий и увеличивает концентрацию

активных форм кислорода в опухолевых клетках ER⁺, клетки ER⁻ не подвергаются такому воздействию [2]. В связи с этим представляет интерес оценка потенциальных эффекторных свойств соединения-лидера **I** по отношению к ER α . В качестве веществ сравнения использовали селективные модуляторы ER α – лекарственные средства тамоксифен и ралоксифен.

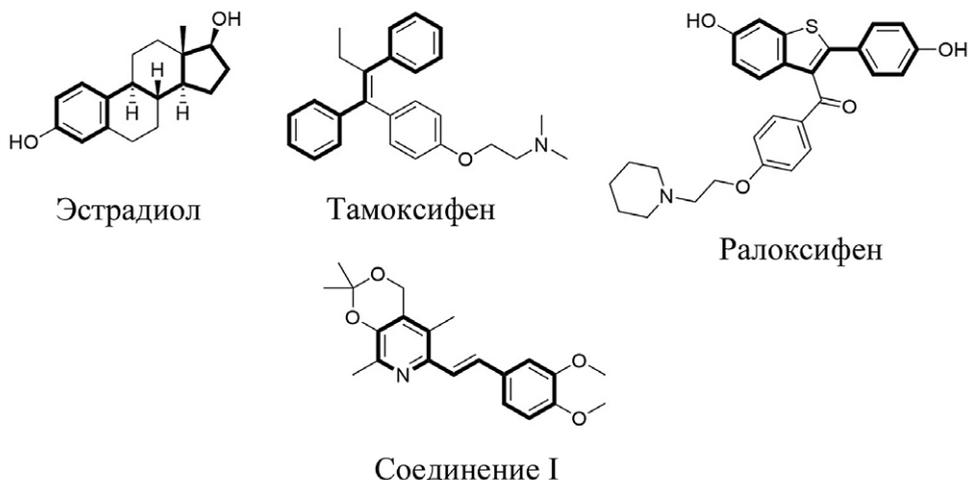


Рис. 1. Структура известных селективных модуляторов рецепторов эстрогена и соединения **I**

1. Материалы и методы

Связывание исследуемых соединений с рекомбинантным ER α изучали с использованием коммерческого тест-набора PolarScreen™ ER Alpha Competitor Assay, Red (Life Technologies, США). Набор содержит человеческий рекомбинантный ER α и его флуоресцентный лиганд. При взаимодействии с рецептором лиганд располагается в его активном центре, свободное вращение молекулы лиганда затруднено и поляризация его флуоресценции высокая. При добавлении в систему рецептор-лиганд эффекторов с высоким сродством к ER α происходит вытеснение лиганда из активного центра рецептора, и поляризация флуоресценции лиганда снижается (рис. 2).

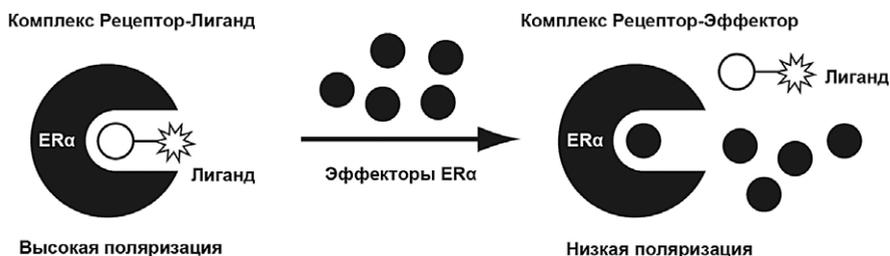


Рис. 2. Схема формирования отклика поляризации флуоресценции лиганда в комплексе с эстрогеновым рецептором α (ER α) [14]

Растворы эстрадиола и ралоксифена гидрохлорид с концентрацией 5 мМ получали их растворением в диметилсульфоксиде (ДМСО). Для приготовления 5 мМ растворов соединения I и тамоксифена использовали ДМСО с добавлением эквимольного количества HCl для получения гидрохлоридов. Серийные разведения исследуемых веществ с концентрациями 2000, 1000, 500, 100, 50, 10, 1, 0,2 мкМ также осуществляли в ДМСО. Далее 3.4 мкл приготовленных разведений исследуемых веществ смешивали со 167 мкл реакционного буферного раствора с получением двукратных рабочих растворов. Для приготовления рабочего раствора комплекса ER α с флуоресцентным лигандом в отдельной пробирке смешивали 2042 мкл реакционного буферного раствора, 21.5 мкл флуоресцентного лиганда эстрогенового рецептора и 86 мкл нативного человеческого рецептора α . Опытная проба содержала 150 мкл двукратных разведений исследуемых веществ и 150 мкл рабочего раствора комплекса ER α с лигандом. Рабочие концентрации исследуемых веществ в пробе составили: 20000, 10000, 5000, 1000, 500, 100, 50, 10, 2 нМ.

Одновременно осуществляли следующие контрольные реакции. Для получения пробы без рецептора (низкая поляризация флуоресценции) смешивали 3 мкл флуоресцентного лиганда и 298 мкл реакционного буферного раствора, затем отбирали 150 мкл этой смеси и добавляли 150 мкл реакционного буферного раствора, содержащего аналогичное опытным пробам количество ДМСО. Максимальный контроль (максимальная поляризация флуоресценции) определяли в системе, содержащей 150 мкл комплекса ER α с лигандом и 150 мкл реакционного буферного раствора с добавлением аналогичного опытным пробам содержания ДМСО. Минимальный контроль (низкие значения поляризации флуоресценции) регистрировали в системе из 150 мкл двукратных разведений эстрадиола и 150 мкл рабочего раствора комплекса ER α с лигандом.

Опытные и контрольные пробы инкубировали 2 ч до момента регистрации поляризации флуоресценции. Затем их помещали в кварцевые кюветы малого объема и регистрировали спектры флуоресценции на флуоресцентном спектрофотометре Fluorolog-3 Jobin Yvon (Horiba, Япония) в условиях четырех различных положений поляризаторов на возбуждении и испускании: вертикально/вертикально (vv), вертикально/горизонтально (vh), горизонтально/вертикально (hv) и горизонтально/горизонтально (hh), в следующих условиях: $\lambda_{\text{возбуждения}} = 535$ нм, $\lambda_{\text{испускания}} = 560\text{--}610$ нм, ширина спектральных щелей – 10 нм, накопление – 0.2 с, позиция кюветы – под прямым углом.

Поляризацию флуоресценции рассчитывали по следующей формуле:

$$P = \left(\frac{I_{vv} \times I_{hh} - 1}{I_{vh} \times I_{hv}} - 1 \right) / \left(\frac{I_{vv} \times I_{hh} + 1}{I_{vh} \times I_{hv}} + 1 \right),$$

где I_{vv} , I_{hh} , I_{vh} , I_{hv} – интенсивности флуоресценции лиганда в максимуме при различных положениях поляризатора. Разность поляризации флуоресценции до и после добавления насыщающей концентрации эстрадиола принимали за максимальный эффект (100%-ное сродство к рецептору), строили зависимости наблюдаемого эффекта от концентрации, по которым определяли EC $_{50}$ исследуемых эффекторов.

2. Результаты и обсуждение

На первом этапе работы по ранее разработанной методике [2] из пиридоксина **1** в пять стадий получено соединение-лидер **I** (схема 1). На первой стадии осуществляли защиту гидроксильных групп в четвертом и пятом положениях пиридоксина с образованием семичленного кетала **2**. На второй стадии проводили гидроксиметилирование полученного кетала в щелочной среде при 70 °С в течение 60 ч с образованием соответствующего диола **3**. Далее 6-гидроксиметильное производное пиридоксина **3** подвергалось хлорированию с использованием двукратного избытка тионилхлорида в дихлорметане при комнатной температуре с последующей изомеризацией семичленного кетала в шестичленный и образованием соответствующего производного **4**. Фосфониевую соль **5** получали взаимодействием дихлорпроизводного пиридоксина **4** с избытком трифенилфосфина в ацетонитриле при кипячении в течение 7 ч. И, наконец, реакция Виттига фосфониевой соли **5** с 3,4-диметоксибензальдегидом приводила к образованию производного *транс*-стильбена, содержащего фрагмент пиридоксина **I**. Реакцию проводили в дихлорметане в присутствии гидрида натрия при 80 °С в течение 30 ч под давлением в закрытом сосуде.

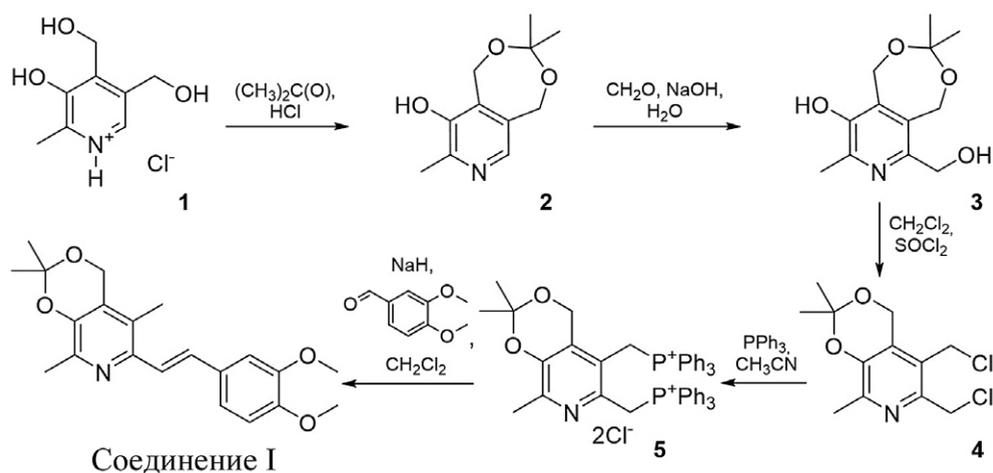


Схема 1. Синтез соединения **I** из пиридоксина **1**

С целью выявления механизма противоопухолевого действия соединения **I** оценили его связывание с человеческим ER α с использованием тест-набора, содержащего рекомбинантный рецептор и его флуоресцентный лиганд. В качестве реперных соединений, обладающих высоким сродством к эстрогеновому рецептору, использовали эстрадиол, тамоксифен и ралоксифен. Спектры флуоресценции комплекса рецептор-лиганд регистрировали в присутствии различных концентраций тестируемого соединения **I** и реперных соединений в условиях четырех различных положений поляризаторов света при длинах волн возбуждения и испускания. Рассчитанные значения поляризации флуоресценции комплекса рецептор-лиганд в присутствии различных концентраций исследуемых эффекторов представлены на рис. 3.

Эстрадиол обладает максимальным сродством к ER α [15], поэтому в его присутствии флуоресцентный лиганд вытесняется из активного центра рецеп-

тора и поляризация флуоресценции лиганда значительно уменьшается (рис. 3). Различие поляризации флуоресценции до и после добавления насыщающей концентрации эстрадиола (10 мкМ) принимали за максимальный эффект и считали контрольным значением. Эффективность остальных исследуемых соединений в различных тестируемых концентрациях выражали в процентах относительно этого контроля. Полученные значения представлены на рис. 4.

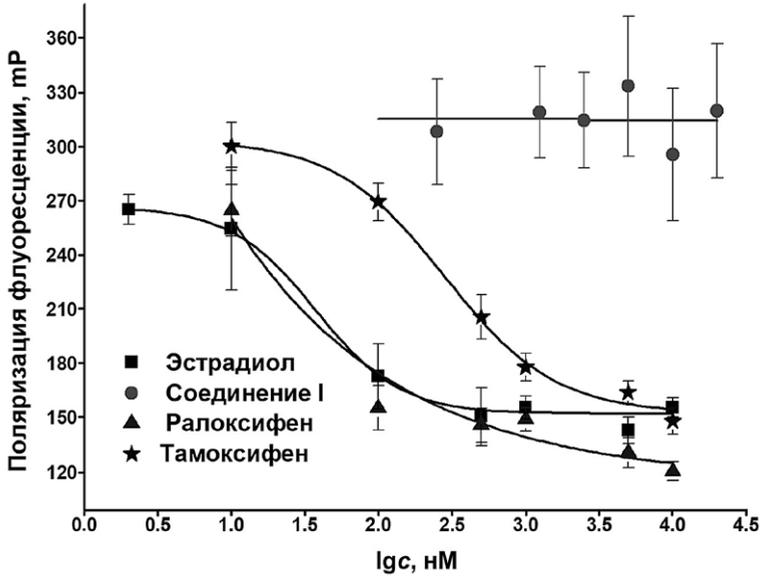


Рис. 3. Дозозависимая поляризация флуоресценции лиганда Fluormone EL Red в комплексе с ER α в присутствии различных концентраций соединения I, эстрадиола, ралоксифена и тамоксифена

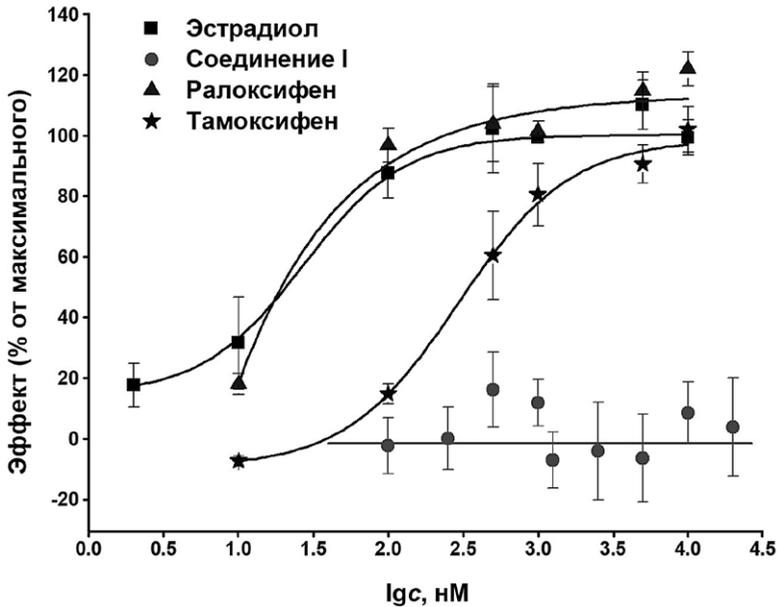


Рис. 4. Эффективность вытеснения флуоресцентного лиганда из активного центра ER α в присутствии различных концентраций соединения I, эстрадиола, ралоксифена и тамоксифена

Установлено, что при добавлении соединения **I** к комплексу рецептор-лиганд вплоть до достижения концентрации 20 мкМ поляризация флуоресценции лиганда не уменьшается и, следовательно, лиганд не вытесняется из активного центра рецептора. Напротив, при добавлении возрастающих концентраций тамоксифена и ралоксифена к комплексу рецептор-лиганд происходит постепенное уменьшение поляризации флуоресценции лиганда вследствие его вытеснения из активного центра (рис. 3). Из представленных на рис. 4 зависимостей эффективности вытеснения флуоресцентного лиганда от концентрации соединений получены их полумаксимальные эффективные концентрации (EC_{50}), значения которых составили для эстрадиола 22 нМ, для ралоксифена 120 нМ, для тамоксифена 595 нМ. Эти результаты в целом согласуются с литературными значениями EC_{50} для рассматриваемых эффекторов [14–16].

Таким образом, производное *транс*-стилбена, содержащее фрагмент пиридоксина **I**, в отличие от своих структурных аналогов тамоксифена и ралоксифена не обладает сродством к человеческому ER α и, следовательно, не регулирует пролиферацию и метаболизм клеток молочной железы опосредованно через воздействие на ER α . Можно предположить, что соединение-лидер **I** избирательно регулирует экспрессию генов в опухолевых клетках. Так, например, в предыдущих исследованиях [2] показано, что соединение-лидер **I** уменьшает уровень экспрессии ER α в клетках MCF-7. Не исключено, что это соединение также оказывает влияние на экспрессию других белков и внутриклеточное содержание кальция, что характерно для тамоксифена [17].

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения проектной части государственного задания в сфере научной деятельности FZSM2023-0010.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Diez-Perez A. Selective estrogen receptor modulators (SERMS) // Arq. Bras. Endocrinol. Metabol. 2006. V. 50, No 4. P. 720–734. <https://doi.org/10.1590/s0004-27302006000400017>.
2. Pugachev M.V., Pavelyev R.S., Nguyen T.N.T., Gabbasova R.R., Bulatov T.M., Iksanova A.G., Aljondi B., Bondar O.V., Grishaev D.Yu., Yamaleeva Z.R., Kataeva O.N., Nikishova T.V., Balakin K.V., Shtyrlin Yu.G. Synthesis, antitumor activity and structure-activity studies of novel pyridoxine-based bioisosteric analogs of estradiol // Bioorg. Med. Chem. 2021. V. 30. Art. 115957. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115957>.
3. Pugachev M.V., Nguyen T.T.N., Bulatov T.M., Pavelyev R.S., Iksanova A.G., Bondar O.V., Balakin K.V., Shtyrlin Yu.G. Synthesis and antitumor activity of novel pyridoxine-based bioisosteric analogs of *trans*-stilbenes // J. Chem. 2017. V. 2017. Art. 8281518. <https://doi.org/10.1155/2017/8281518>.
4. Jordan V.C. A current view of tamoxifen for the treatment and prevention of breast cancer // Br. J. Pharmacol. 1993. V. 110, No 2. P. 507–517. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1993.tb13840.x>.
5. Klinge C.M. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements // Nucleic Acids Res. 2001. V. 29, No 14. P. 2905–2919. <https://doi.org/10.1093/nar/29.14.2905>.
6. Grubberger-Saal S.K., Bendahl P.-O., Saal L.H., Laakso M., Hegardt C., Edén P., Peterson C., Malmström P., Isola J., Borg Å., Fernö M. Estrogen receptor β expression is associated

- with tamoxifen response in ER α -negative breast carcinoma // *Clin. Cancer Res.* 2007. V. 13, No 7. P. 1987–1994. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1823>.
7. *Howell A., Cuzick J., Baum M., Buzdar A., Dowsett M., Forbes J.F., Hocht-Boes G., Houghton J., Locker G.Y., Tobias J.S.* Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer // *Lancet.* 2005. V. 365, No 9453. P. 60–62. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17666-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17666-6).
 8. *Heringa M.* Review on raloxifene: Profile of a selective estrogen receptor modulator // *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 2003. V. 41, No 8. P. 331–345. <https://doi.org/10.5414/cpp41331>.
 9. *Bryant H.U., Glasebrook A.L., Yang N.N., Sato M.* An estrogen receptor basis for raloxifene action in bone // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1999. V. 69, No 1–6. P. 37–44. [https://doi.org/10.1016/s0960-0760\(98\)00147-2](https://doi.org/10.1016/s0960-0760(98)00147-2).
 10. *Brzozowski A.M., Pike A.C.W., Dauter Z., Hubbard R.E., Bonn T., Engström O., Öhman L., Greene G.L., Gustafsson J.-Å., Carlquist M.* Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor // *Nature.* 1997. V. 389, No 6652. P. 753–758. <https://doi.org/10.1038/39645>.
 11. *Martinkovich S., Shah D., Planey S.L., Arnott J.A.* Selective estrogen receptor modulators: tissue specificity and clinical utility // *Clin. Interventions Aging.* 2014. V. 9. P. 1437–1452. <https://doi.org/10.2147/CIA.S66690>.
 12. *Liu H., Park W.-C., Bentrem D.J., McKian K.P., de Los Reyes A., Loweth J.A., Schafer J.M., Zapf J.W., Jordan V.C.* Structure-function relationships of the raloxifene-estrogen receptor- α complex for regulating transforming growth factor- α expression in breast cancer cells // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277, No 11. P. 9189–9198. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108335200>.
 13. *Weatherman R.V., Clegg N.J., Scanlan T.S.* Differential SERM activation of the estrogen receptors (ER α and ER β) at AP-1 sites // *Chem. Biol.* 2001. V. 8, No 5. P. 427–436. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(01\)00025-4](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(01)00025-4).
 14. PolarScreen™ ER Alpha Competitor Assay, Red. User manual. Publ.: MAN0009428. Rev.: A.0. URL: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FSLG%2Fmanuals%2Fpolarcreen_er_alpha_red_man.pdf.
 15. *Lin A.H.Y., Li R.W.S., Ho E.Y.W., Leung G.P.H., Leung S.W.S., Vanhoutte P.M., Man R.Y.K.* Differential ligand binding affinities of human estrogen receptor- α isoforms // *PLoS ONE.* 2013. V. 8, No 4. Art. e63199. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063199>.
 16. *Blair R.M., Fang H., Branham W.S., Hass B.S., Dial S.L., Moland C.L., Tong W., Shi L., Perkins R., Sheehan D.M.* The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: Structural diversity of ligands // *Toxicol. Sci.* 2000. V. 54, No 1. P. 138–153. <https://doi.org/10.1093/toxsci/54.1.138>.
 17. *Radin D.P., Patel P.* Delineating the molecular mechanisms of tamoxifen's oncolytic actions in estrogen receptor-negative cancers // *Eur. J. Pharmacol.* 2016. V. 781. P. 173–180. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.04.017>.

Поступила в редакцию 08.11.2023

Принята к публикации 15.01.2024

Бондарь Оксана Викторовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Научно-образовательного центра фармацевтики

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: OkVBondar@kpfu.ru

Карут Рауда, аспирант, младший научный сотрудник Научно-образовательного центра фармацевтики

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: rawdahkarwt@gmail.com

Мостовая Ольга Александровна, кандидат химических наук, инженер I категории кафедры органической и медицинской химии Химического института имени А.М. Бутлерова

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: olga.mostovaya@mail.ru

Пугачев Михаил Владимирович, кандидат химических наук, старший научный сотрудник Научно-образовательного центра фармацевтики

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: mpugache@kpfu.ru

Иксанова Альфия Габдулахатовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Научно-образовательного центра фармацевтики

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: Alfija.Iksanova@kpfu.ru

Штырлин Юрий Григорьевич, доктор химических наук, ведущий научный сотрудник Научно-образовательного центра фармацевтики

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: Yurii.Shtyrilin@kpfu.ru

ISSN 2542-064X (Print)

ISSN 2500-218X (Online)

UCHENYE ZAPISKI KAZANSKOGO UNIVERSITETA. SERIYA ESTESTVENNYE NAUKI
(Proceedings of Kazan University. Natural Sciences Series)

2024, vol. 166, no. 2, pp. 255–265

ORIGINAL ARTICLE

doi: 10.26907/2542-064X.2024.2.255-265

Affinity for Estrogen Receptor α (ER α) in a *trans*-Stilbene Derivative Containing a Pyridoxine Fragment

O.V. Bondar^{*}, *R. Karut*^{**}, *O.A. Mostovaya*^{***}, *M.V. Pugachev*^{****},
A.G. Iksanova^{*****}, *Yu.G. Shtyrilin*^{*****}

Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia

E-mail: ^{*}OkVBondar@kpfu.ru, ^{**}rawdahkarwt@gmail.com, ^{***}olga.mostovaya@mail.ru,
^{****}mpugache@kpfu.ru, ^{*****}Alfija.Iksanova@kpfu.ru, ^{*****}Yurii.Shtyrilin@kpfu.ru

Received November 8, 2023; Accepted January 15, 2024

Abstract

Molecular targets for a promising antitumor agent based on *trans*-stilbene containing a pyridoxine fragment were identified. The lead compound, (*E*)-6-(3,4-dimethoxystyryl)-2,2,5,8-tetramethyl-4*H*-[1,3]dioxino[4,5-*c*]pyridine, was found to selectively induce apoptosis in MCF-7 breast adenocarcinoma cells overexpressing estrogen receptor, but not in MDA-MB-231 cells negative for estrogen receptor. The mechanism by which the novel *trans*-stilbene derivative acts as a selective estrogen receptor modulator was analyzed, and the affinity for human estrogen receptor α (ER α) was assessed by fluorescence polarization. Unlike its structural analogs—tamoxifen and raloxifene, the lead compound showed no affinity

for ER α and did not form complexes with it. Therefore, it was concluded that the selective action of the pyridoxine-containing derivative of *trans*-stilbene on estrogen-positive breast cancer cells occurs through an alternative mechanism. The EC₅₀ values for the displacement of the fluorescent ligand from the ER α active site were 22, 120, and 595 nM for estradiol, raloxifene, and tamoxifen, respectively.

Keywords: *trans*-stilbenes, pyridoxine, estrogen receptor α , tamoxifen, raloxifene, complexation, fluorescence polarization

Acknowledgments. This study was supported by the subsidy allocated to Kazan Federal University for the state assignment in the sphere of scientific activities (project no. FZSM2023-0010).

Conflicts of Interest. The authors declare no conflicts of interest.

Figure Captions

Fig. 1. Structure of known selective estrogen receptor modulators and lead compound I.

Fig. 2. Fluorescence polarization response of the ligand in the complex with estrogen receptor α (ER α) [14].

Scheme 1. Synthesis of lead compound I from pyridoxine 1.

Fig. 3. Dose-dependent fluorescence polarization of the Fluormone EL Red ligand in the complex with ER α at varying concentrations of compound I, estradiol, raloxifene, and tamoxifen.

Fig. 4. Efficiency of the fluorescent ligand displacement from the active site of ER α at varying concentrations of compound I, estradiol, raloxifene, and tamoxifen.

References

1. Diez-Perez A. Selective estrogen receptor modulators (SERMS). *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.*, 2006, vol. 50, no. 4, pp. 720–734. <https://doi.org/10.1590/s0004-27302006000400017>.
2. Pugachev M.V., Pavelyev R.S., Nguyen T.N.T., Gabbasova R.R., Bulatov T.M., Iksanova A.G., Aljondi B., Bondar O.V., Grishaev D.Yu., Yamaleeva Z.R., Kataeva O.N., Nikishova T.V., Balakin K.V., Shtyrlin Yu.G. Synthesis, antitumor activity and structure-activity studies of novel pyridoxine-based bioisosteric analogs of estradiol. *Bioorg. Med. Chem.*, 2021, vol. 30, art. 115957. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115957>.
3. Pugachev M.V., Nguyen T.N.T., Bulatov T.M., Pavelyev R.S., Iksanova A.G., Bondar O.V., Balakin K.V., Shtyrlin Yu.G. Synthesis and antitumor activity of novel pyridoxine-based bioisosteric analogs of *trans*-stilbenes. *J. Chem.*, 2017, vol. 2017, art. 8281518. <https://doi.org/10.1155/2017/8281518>.
4. Jordan V.C. A current view of tamoxifen for the treatment and prevention of breast cancer. *Br. J. Pharmacol.*, 1993, vol. 110, no. 2, pp. 507–517. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1993.tb13840.x>.
5. Klinge C.M. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res.*, 2001, vol. 29, no. 14, pp. 2905–2919. <https://doi.org/10.1093/nar/29.14.2905>.
6. Gruvberger-Saal S.K., Bendahl P.-O., Saal L.H., Laakso M., Hegardt C., Edén P., Peterson C., Malmström P., Isola J., Borg Å., Fernö M. Estrogen receptor β expression is associated with tamoxifen response in ER α -negative breast carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 2007, vol. 13, no. 7, pp. 1987–1994. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1823>.
7. Howell A., Cuzick J., Baum M., Buzdar A., Dowsett M., Forbes J.F., Hoctin-Boes G., Houghton J., Locker G.Y., Tobias J.S. Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer. *Lancet*, 2005, vol. 365, no. 9453, pp. 60–62. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17666-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17666-6).
8. Heringa M. Review on raloxifene: Profile of a selective estrogen receptor modulator. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, 2003, vol. 41, no. 8, pp. 331–345. <https://doi.org/10.5414/cpp41331>.
9. Bryant H.U., Glasebrook A.L., Yang N.N., Sato M. An estrogen receptor basis for raloxifene action in bone. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 1999, vol. 69, nos. 1–6, pp. 37–44. [https://doi.org/10.1016/s0960-0760\(98\)00147-2](https://doi.org/10.1016/s0960-0760(98)00147-2).
10. Brzozowski A.M., Pike A.C.W., Dauter Z., Hubbard R.E., Bonn T., Engström O., Öhman L., Greene G.L., Gustafsson J.-Å., Carlquist M. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*, 1997, vol. 389, no. 6652, pp. 753–758. <https://doi.org/10.1038/39645>.
11. Martinkovich S., Shah D., Planey S.L., Arnott J. Selective estrogen receptor modulators: Tissue specificity and clinical utility. *Clin. Interventions Aging.*, 2014, vol. 9, pp. 1437–1452. <https://doi.org/10.2147/CIA.S66690>.

12. Liu H., Park W.-C., Bentrem D.J., McKian K.P., de Los Reyes A., Loweth J.A., Schafer J.M., Zapf J.W., Jordan V.C. Structure-function relationships of the raloxifene-estrogen receptor- α complex for regulating transforming growth factor- α expression in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277, no. 11, pp. 9189–9198. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108335200>.
13. Weatherman R.V., Clegg N.J., Scanlan T.S. Differential SERM activation of the estrogen receptors (ER α and ER β) at AP-1 sites. *Chem. Biol.*, 2001, vol. 8, no. 5, pp. 427–436. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(01\)00025-4](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(01)00025-4).
14. PolarScreen™ ER Alpha Competitor Assay, Red. User manual. Publ.: MAN0009428. Rev.: A.0. URL: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FSLSG%2Fmanuals%2FpolarScreen_er_alpha_red_man.pdf.
15. Lin A.H.Y., Li R.W.S., Ho E.Y.W., Leung G.P.H., Leung S.W.S., Vanhoutte P.M., Man R.Y.K. Differential ligand binding affinities of human estrogen receptor- α isoforms. *PLoS ONE*, 2013, vol. 8, no. 4, art. e63199. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063199>.
16. Blair R.M., Fang H., Branham W.S., Hass B.S., Dial S.L., Moland C.L., Tong W., Shi L., Perkins R., Sheehan D.M. The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: Structural diversity of ligands. *Toxicol. Sci.*, 2000, vol. 54, no. 1, pp. 138–153. <https://doi.org/10.1093/toxsci/54.1.138>.
17. Radin D.P., Patel P. Delineating the molecular mechanisms of tamoxifen's oncolytic actions in estrogen receptor-negative cancers. *Eur. J. Pharmacol.*, 2016, vol. 781, pp. 173–180. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.04.017>.

Для цитирования: Бондарь О.В., Карут Р., Мостовая О.А., Пугачев М.В., Иксанова А.Г., Штырлин Ю.Г. Аффинность к эстрогеновому рецептору α (ER α) производного транс-стильбена, содержащего фрагмент пиридоксина // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2024. Т. 166, кн. 2. С. 255–265. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2024.2.255-265>.

For citation: Bondar O.V., Karut R., Mostovaya O.A., Pugachev M.V., Iksanova A.G., Shtyrin Yu.G. Affinity for estrogen receptor α (ER α) in a *trans*-stilbene derivative containing a pyridoxine fragment. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2024, vol. 166, no. 2, pp. 255–265. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2024.2.255-265>. (In Russian)

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

УДК 504.064.2

doi: 10.26907/2542-064X.2024.2.266-282

СПОСОБ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ НАКОПЛЕНИЯ МЕТАЛЛОВ В ОРГАНИЗМЕ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ПОЛИМЕТАЛЛИЧЕСКОМ ЗАГРЯЗНЕНИИ КОМПОНЕНТОВ УРБОЭКОСИСТЕМЫ

Ю.А. Тунакова¹, С.В. Новикова¹, В.С. Валиев², Р.И. Файзуллин³

*¹Казанский национальный исследовательский технический
университет имени А.Н. Туполева – КАИ, г. Казань, 420111, Россия*

*²Институт проблем экологии и недропользования Академии наук Республики
Татарстан, г. Казань, 420087, Россия*

*³Казанский (Приволжский) федеральный университет,
г. Казань, 420012, Россия*

Аннотация

Повышенное содержание металлов в биологических субстратах организма является показателем хронического кумулятивного воздействия неблагоприятных условий среды обитания. В статье представлены результаты исследования количественного состава биологических субстратов организма человека в качестве информативной характеристики состояния компонентов урбоэко системы. Прямая оценка накопления металлов в организме с непосредственным определением концентраций в биосубстратах является сложной многоуровневой аналитической процедурой. Поставлена задача создания простого способа определения содержания металлов в биологических субстратах с использованием возможностей нейросетевых методов, в результате решения которой представлена комплексная нейросетевая модель оценки накопления металлов в организме при их избыточном поступлении из среды обитания. Модель позволяет рассчитывать содержание металлов при поступлении воздушным и водно-пищевым путем без использования инвазивных процедур отбора биоматериалов и сложных процедур пробоподготовки и анализа. Кроме того, предложенная модель позволяет решать и обратные задачи определения порогового содержания металлов в компонентах урбоэко системы.

Ключевые слова: урбоэко система, компоненты, полиметаллическое загрязнение, биологический субстрат, накопление, нейросетевая модель, ретенция металлов.

Введение

Главным маркером состояния компонентов урбоэко системы и основным защищаемым объектом является население исследуемой территории. Среди совокупности загрязняющих веществ, воздействующих на организм человека на урбанизированных территориях, особую роль играют металлы. Они характеризуются токсичностью при повышенных концентрациях, высокой способностью к биогенной миграции и биоаккумуляции [1–3]. Современный житель урбоэко системы подвержен хроническому воздействию избыточных доз металлов, поступающих в компоненты урбоэко системы из различных антропо-

генных источников. На территориях с высокой полиметаллической нагрузкой отмечается накопление металлов в биологических субстратах организма на индивидуальном и популяционном уровнях. Содержание металлов в биологических субстратах человека отражает интегральный эффект поступления металлов в организм и может быть использовано как важнейший аналитический «срез» при оценке полиметаллического загрязнения основных компонентов урбоэкосистемы (атмосферный воздух, поверхностные и питьевые воды, деполирующие среды) [4–9].

По заключениям ряда исследователей, проведение оценки состояния урбоэкосистемы по биологическим ответам организма человека и по показателям здоровья более объективно, чем сопоставление концентраций отдельных токсикантов с их гигиеническими нормативами. Такой способ оценки позволяет интегрально учесть воздействие всех, в том числе не идентифицированных, загрязняющих веществ [10–13].

Повышенные концентрации металлов в компонентах урбоэкосистемы относятся к хроническим слабоинтенсивным факторам, вызывающим накопление металлов в организме и приводящим к срыву адаптационных процессов [14–16]. Вместе с этим ущерб для организма человека наступает постепенно, проявляясь по мере нарушения адаптации, в первую очередь на уровне самых уязвимых групп населения, что в дальнейшем неизбежно отражается на качестве популяции в целом [17].

Отмечается, что на территориях с высоким уровнем антропогенной нагрузки наиболее показательным является исследование биосубстратов детей и подростков, поскольку при этом отсутствует влияние производственных факторов, вредных привычек и существует возможность пространственно-дифференцированного учета полиметаллического загрязнения компонентов урбоэкосистемы ввиду локализованного местонахождения детей [18–19].

Степень накопления металлов в организме характеризуется понятием ретенции, которое подразумевает динамику изменения содержания всего пула металлов. Прямая оценка ретенции чрезвычайно сложна в силу множества внутренних механизмов, обеспечивающих изменчивость содержания металлов в организме. В формировании ретенции задействованы различные органы, ткани, процессы, обеспечивающие перераспределение металлов, их транспорт и кумуляцию. Баланс металлов может быть положительным, отрицательным и нейтральным, а также может постоянно изменять свою направленность в течение короткого времени. Эта особенность приводит к противоречивым результатам при использовании классических методов оценки ретенции. Следует отметить, что ретенция является интегральным показателем, обобщающим многосредовое воздействие загрязняющих факторов и учитывающим все пути поступления металлов в организм [20–22].

Хотя прямое определение ретенции металлов в организме человека практически невозможно, сопоставление динамики количества поступающего и экскретируемого вещества позволяет представить меру ее относительных значений. Основная роль транспорта металлов в организме отводится крови, белки которой связывают их. Металлы, находящиеся в крови в молекулярно-дисперсном состоянии, в виде ионов или неустойчивых комплексов, выделяются преимуще-

ственно с мочой. По соотношению поступившего и выделившегося вещества оценивают клиренс металлов (CL_M , мл/мин), используя формулу Реберга [23] (уравнение 1).

$$CL_M = \frac{c_{\text{Моча}} \times \text{СД}}{c_{\text{М.кровь}} \times 1440} \times \text{ПТ}, \quad (1)$$

где $c_{\text{Моча}}$, $c_{\text{М.кровь}}$ – концентрация металла в моче и крови соответственно, мкг/мл; СД – суточный диурез, мл; 1440 – число минут в сутках; ПТ – скорректированная относительно среднегопопуляционного значения площадь тела. Параметр ПТ используется в качестве поправки на площадь поверхности тела, поскольку минутный объем фильтрации в почках зависит от роста и веса человека и требует нормирования у людей, значительно отклоняющихся в размерах от средних значений. Величина ПТ рассчитывается согласно уравнению 2.

$$\text{ПТ} = \frac{1.73}{\sqrt{\frac{\text{Вес} \times \text{рост}}{3600}}}, \quad (2)$$

Клиренс отражает скорость очищения плазмы крови от металла, при этом чем ниже скорость, тем выше ретенция металла. Для удобства представления и нормализации рассчитываемых значений оценку ретенции осуществляют с помощью экспоненциальной функции отношения абсолютных значений клиренса к его среднеквадратическому отклонению (уравнение 3).

$$\text{Ретенция}_M = e^{-\frac{CL_M^2}{\sigma^2}}, \quad (3)$$

где σ – среднеквадратическое отклонение ряда данных.

Таким образом, для решения вопроса о количественной оценке накопления металлов в организме жителей определенной территории необходимо выполнить большой объем исследований их биологических субстратов с территориальной привязкой. Такого рода исследования требуют значительных материальных и временных затрат, а также сопровождаются определенными рисками и неудобствами, связанными с необходимостью инвазивного забора биологического материала, в первую очередь крови. Другими параметрами, опосредованно влияющими на клиренс, являются возраст и пол пациента, что отражено в многочисленных научных публикациях, например, в работах [24–27].

Оценка содержания металлов в абиотических средах также сопровождается определенными сложностями, решение которых предопределяет способы и методы их исследования. Наиболее часто на практике используют косвенные методы определения содержания металлов в атмосферном воздухе, основанные на исследовании депонирующих сред – снежного и почвенного покровов [28]. Для оценки поступления металлов в организм водным путем необходимо учитывать вторичное загрязнение вод по мере их прохождения по водоводам и разводящим путям и проводить отбор проб в конечной точке потребления, т. е. в домах и квартирах [29].

Зависимости между поступлением в организм и ретенцией металлов с формированием их индивидуальных статусов имеют сложный и, как правило, нелинейный характер. Поэтому методы линейного моделирования в задачах мно-

гофакторной регрессии не могут достаточно корректно описать весь спектр взаимосвязей между значимыми для оценки удерживания металлов в организме человека факторами. Поэтому для адекватного описания зависимости ретенции от поступления и экскреции металлов применяют современные интеллектуальные модели – искусственные нейронные сети. Так, описаны нейросетевые методы, позволяющие автоматически учесть как явные, так и скрытые зависимости между исходными данными [30–32].

Кроме того, нейронные сети по сравнению с традиционными методами моделирования позволяют оперировать неполными исходными данными, способны отражать нелинейные зависимости и подбирать корректирующие коэффициенты. Использование нейронных сетей типа «многослойный персептрон» (MLP), карт Кохонена, вероятностных нейронных сетей, а также гибридных и каскадных сетей на их основе (многослойные нейросетевые эксперты, нейросетевые каскады и пр.) позволяет снизить погрешность расчетов с десятков процентов до их единиц и даже долей процента [32].

Цель настоящего исследования – создание нейросетевой модели для территориально-дифференцированной количественной оценки накопления металлов в организме жителей урбозкосистемы на основе совокупности их морфо-физиологических параметров, а также оценки полиметаллического загрязнения трех основных компонентов урбозкосистемы (почвенный и снежный покровы, питьевые воды), отражающих водно-пищевой и воздушный пути поступления металлов в организм, без исследования биологических субстратов населения.

Таким образом, входами нейросетевой модели являются морфофизиологические параметры жителей исследуемой территории (рост, вес, пол и возраст) и концентрации металлов в питьевой воде, снеге и почве. Выходом модели является искомый уровень ретенции соответствующего металла в организме.

1. Материалы и методы

Для обучения нейросетевой модели необходимы массивы экспериментальных данных. В рамках настоящей работы проведено масштабное исследование содержания металлов в пробах питьевой воды, отобранной в конечной точке потребления, снежном и почвенном покровах на территории г. Казани. Исследованы металлы (цинк, хром, железо, стронций, медь и свинец), концентрации которых подвержены наибольшей изменчивости в компонентах урбозкосистемы [23–25]. Для проверки работоспособности предложенной нейросетевой модели проводили сопоставления с экспериментально установленными данными.

1.1. Определение содержания металлов в биосубстратах, питьевой воде, снежном и почвенном покровах. Определено содержание металлов в биологических субстратах 242 детей, проживающих в различных районах г. Казани и проходивших диспансеризацию. Из них 54 – мальчики (средний возраст – 11.7 года) и 188 – девочки (средний возраст – 10.4 года), для которых оценивали такие показатели, как вес, рост, площадь тела, возраст и пол, а также транспорт металлов в организме и их экскрецию по результатам определения металлов в сыворотке крови и суточной моче соответственно.

Для определения содержания металлов в биосубстратах проводили предварительную пробоподготовку образцов.

Для отделения сыворотки кровь выдерживали в термостате при 37 °С до образования сгустка и центрифугировали в течение 15 мин при 3000 об/мин. Для определения цинка, меди и железа полученную сыворотку крови разбавляли бидистиллированной водой в соотношении 1:2 и подвергали дальнейшему анализу. Для определения свинца, хрома и стронция сыворотку крови разбавляли фильтратом, полученным после кислотного гидролиза и осаждения белков сыворотки трихлоруксусной кислотой (ТХУ). Для этого к 1.5 мл сыворотки крови добавляли 0.75 мл 1.5 %-ного раствора HCl и инкубировали в течение 1 ч при 37 °С, что обеспечивает гидролиз белков. Затем проводили осаждение белков добавлением 0.75 мл 20 %-ного раствора ТХУ (двукратное конечное разведение) и через 1 ч центрифугировали в течение 10 мин при 1500 об/мин. Надосадочную жидкость – ТХУ-фильтрат – использовали для дальнейших исследований.

В случаях низких концентраций металлов (ниже предела обнаружения) проводили экстракционное концентрирование. Для этого к 2.5 мл сыворотки крови добавляли 0.5 мл 2 %-ного раствора диэтилдитиокарбамата натрия, 2 капли детергента Triton X-100 и энергично встряхивали смесь в течение 10 с. Образец в пробирке ставили в штатив для равномерного распределения эмульсии. По истечении 10 мин добавляли 1.5 мл бутилацетата, смесь встряхивали в течение 1 мин, а затем центрифугировали. Это позволило понизить предел обнаружения хрома в 1.5 раза, а стронция и свинца в 2.5 раза.

Определение металлов в моче проводили прямым способом в пробах суточной мочи.

Отбор проб воды проводили на выходе из кранов внутренних водопроводных сетей домов. В процессе подготовки пробы 1 л анализируемой питьевой воды выпаривали на водяной бане, сухой остаток растворяли в 50 мл 1 н азотной кислоты (х.ч.) и анализировали аликвотную часть полученного раствора. Объем талой снеговой воды составил от 3 до 7 л в зависимости от мощности и плотности снежного покрова в точке отбора. Для отделения взвесей весь объем талой воды фильтровали под вакуумом через предварительно взвешенные бумажные фильтры средней плотности. Часть фильтрата объемом 1 л выпаривали на водяной бане в фарфоровых чашках. Сухой остаток в чашке смачивали несколькими каплями H₂O₂ и доводили до аналитического объема 1 н HCl. После высушивания фильтров до постоянной массы при температуре 105 °С и определения массы взвесей навески последних растворяли в кипящей 5 н HNO₃.

Экстракцию валовых форм металлов в пробах почв проводили 5 н HNO₃, как и при анализе взвесей снежного покрова, что позволило получить сравнимые результаты. Подвижные формы экстрагировали ацетатно-аммонийным буферным раствором с pH 4.8. Всего проведено 1160 определений в питьевой воде, 2228 – в снежном покрове и 1890 – в почве.

Определение содержания металлов во всех образцах проводили методом атомно-абсорбционной спектроскопии на атомно-абсорбционном спектрометре AAAnalyst 400 (PerkinElmer, США). Для обработки первичных данных использовали программный пакет AA WinLab32 (PerkinElmer, США).

1.2. Статистические методы. Различия в составе экспериментальных групп для учета веса, роста, площади тела, возраста и пола при проектировании нейросетевых моделей оценивали с помощью статистического пакета STATISTICA v.6.0 (StatSoft, США). Группы, представляющие различные участки исследования, подбирали таким образом, чтобы не было статистически достоверных различий по возрасту, росто-весовым показателям и полу. Достоверность различий средних сравниваемых величин определяли по стандартному *t*-критерию Стьюдента с поправкой Кейлса для малых выборок, а для выборок с ярко выраженной асимметрией – с помощью *U*-критерия Манна – Уитни. За достоверное принимали различие на 95 %-ном уровне значимости ($p < 0.05$).

В результате была сформирована матрица, включающая данные по содержанию металлов в сыворотке крови, суточной моче, питьевой воде, снежном покрове, почве, а также морфофизиологические параметры (возраст, рост, вес, площадь поверхности тела, суточный диурез и пол).

На основе результатов о содержании металлов в крови и суточной моче обследуемых детей-подростков с привлечением информации об их росте и весе были рассчитаны значения клиренса и ретенции каждого металла согласно уравнениям (1) и (3). Все данные были привязаны к идентификационным кодам участников исследования и местам их проживания.

Из полученной матрицы значений было сформировано шесть наборов данных (по одному для каждого металла), каждый из которых включал от 60 до 242 кортежей данных вида: код обследуемого, рост и вес, площадь тела, возраст, пол, содержание металла в питьевой воде, содержание металла в снежном покрове, содержание металла в почве, ретенция металла. Каждый набор данных был разделен на обучающий и тестовый набор в пропорции 80% и 20% соответственно.

2. Результаты исследования

В соответствии с разработанной концепцией созданы шесть моделей типа нейронная сеть топологии MLP. Архитектура моделей подобрана на основе серии экспериментов [32]. Количество входных нейронов в каждой модели варьировали в зависимости от наличия информации о содержании металлов в составе исследуемых компонентов. Для меди, хрома, цинка и свинца использован полный набор входных данных (восемь параметров), в то время как для железа число входных параметров составило семь из-за отсутствия информации о его содержании в почве, а для стронция – шесть, так как доступна только информация о его концентрации в питьевой воде. Топология моделей представлена ниже.

Количество нейронов входного слоя:

- медь, хром, цинк, свинец – 8;
- железо – 7;
- стронций – 6.

Количество скрытых слоев:

- медь, хром, цинк, железо – 1;
- свинец, стронций – 2.

Количество нейронов в скрытом слое:

- медь, хром, цинк, свинец – 5;

- железо – 6 в первом, 3 во втором;
- стронций – 8 в первом, 4 во втором.

Функция активации скрытого слоя:

- медь, хром, цинк, свинец – гиперболический тангенс с параметром кривизны 0.7;
- железо – сигмоида с параметром кривизны 0.7;
- стронций – сигмоида с параметром кривизны 0.8.

Количество нейронов выходного слоя – 1.

Функция активации выходного нейрона – линейная.

Алгоритм обучения всех моделей – resilient propagation (RPROP) с шагом спуска 0.5 и шагом подъема 1.2 соответственно. Каждую модель обучали на собственном обучающем наборе данных в течение 10000 эпох.

Для каждого i -того примера ошибку Err_i^0 рассчитывали как относительное отклонение нормированных к 1 выходного и эталонного значений выходного параметра (ретенции):

$$Err_i^0 = \frac{(y_i^{M3} - y_i^{\ominus})}{y_i^{\ominus 2}}, \quad (4)$$

где i – количество обучающих примеров (изменяется от 1 до N), y_i^M – нормированный выход нейросетевой модели для i -того примера, y_i^{\ominus} – нормированный эталонный ответ для i -того примера. Пример считается распознанным верно, если ошибка для него не превышает порога 0.05, т. е.

если $Err_i^0 < 0.05$, то $R_i = 1$, иначе $R_i = 0$.

В качестве точности обучения модели (Ac_M^0) применена оценка типа “ассига-су”, определяющая процент правильно распознанных примеров из всего обучающего множества согласно уравнению 5.

$$Ac_M^* = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N R_i, \quad (5)$$

Для исследования адекватности моделей рассчитана точность (уравнение 5), а также коэффициенты корреляции между эталонными и прогнозными данными ретенции отдельно для обучающих (K_M^0 и Ac_M^0) и тестовых (K_M^T и Ac_M^T) наборов данных. Сводные результаты представлены в табл. 1.

Табл. 1

Характеристики адекватности моделей расчета ретенции

Модель металла	K_M^0	$Ac_M^0, \%$	K_M^T	$Ac_M^T, \%$
Цинк	0.992	100.0	0.866	83.33
Железо	0.838	97.00	0.779	88.40
Медь	0.992	100.0	0.949	95.24
Свинец	0.871	85.83	0.742	76.67
Стронций	0.952	94.17	0.745	88.33
Хром	0.999	100.0	0.944	90.91

Высокие значения коэффициентов корреляции, а также высокая точность моделей как на обучающем, так и на тестовом множествах свидетельствуют об

их адекватности. Бóльшим значениям корреляции на обучающей выборке соответствуют бóльшие значения на тестовых данных, что говорит об отсутствии переобучения моделей. То же самое можно сказать и о точности. Данное обстоятельство иллюстрируют гистограммы на рис. 1 и 2.

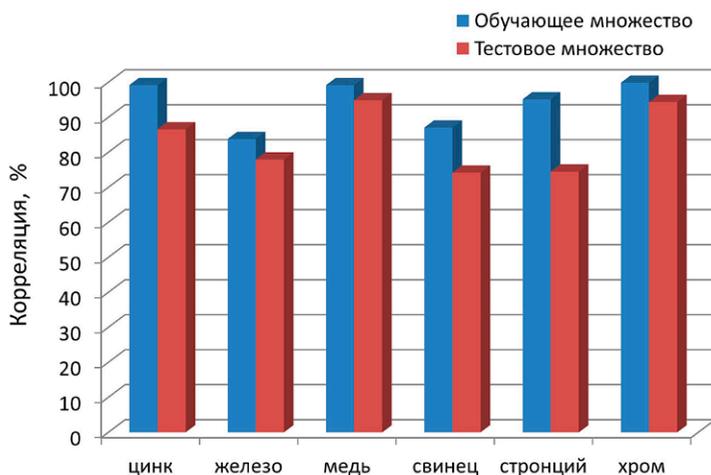


Рис. 1. Корреляции «факт-прогноз» для пар обучающих и тестовых наборов данных для шести моделей оценки уровней ретенции металлов

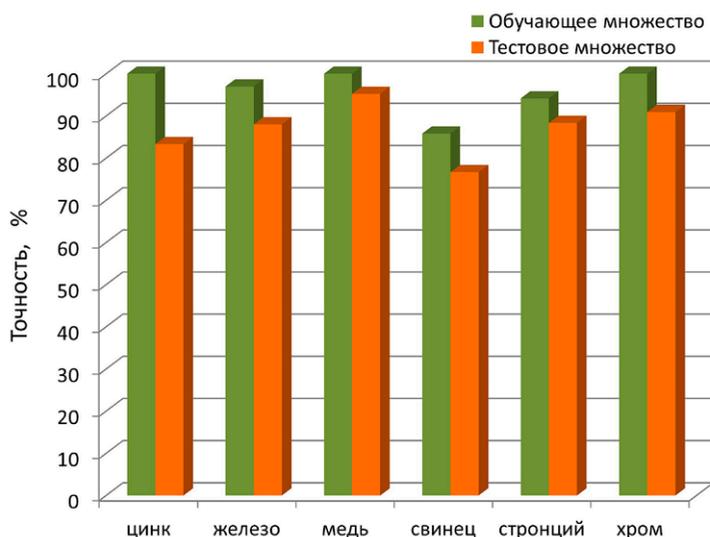


Рис. 2. Сравнительная точность распознавания моделей оценки уровня ретенции металлов на тестовом и обучающем наборах

Также хорошо прослеживается взаимосвязь между корреляцией и точностью, что демонстрирует рис. 3.

Наиболее информативными для нейросетевых моделей являются данные тестов. Так, минимальные значения как корреляции, так и точности на тестовых выборках получены для моделей расчета ретенции свинца и стронция, а также железа, что может свидетельствовать о влиянии дополнительных факторов, обуславливающих изменчивость этих металлов в организме, но не учитываемых в модели.

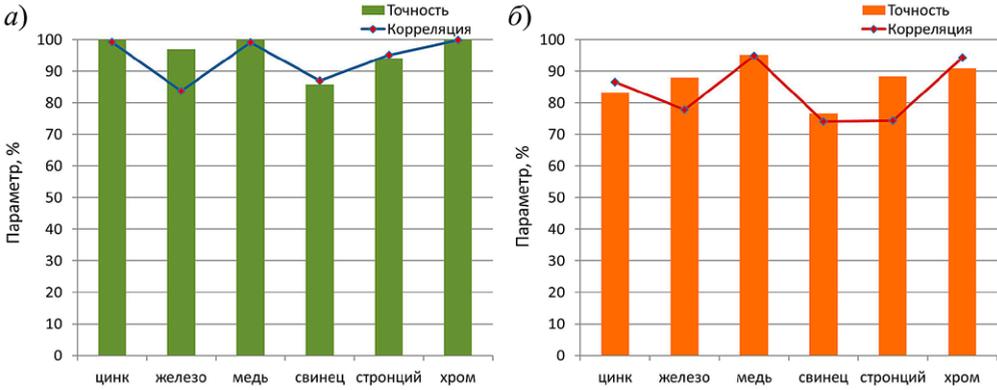


Рис. 3. Связь корреляции и точности нейросетевых моделей для обучающего (а) и тестового (б) множеств по шести исследуемым металлам

Графики «факт-прогноз» уровней ретенции для эталонных и рассчитанных по нейросетевым моделям оценки тестовых данных представлены на рис. 4.

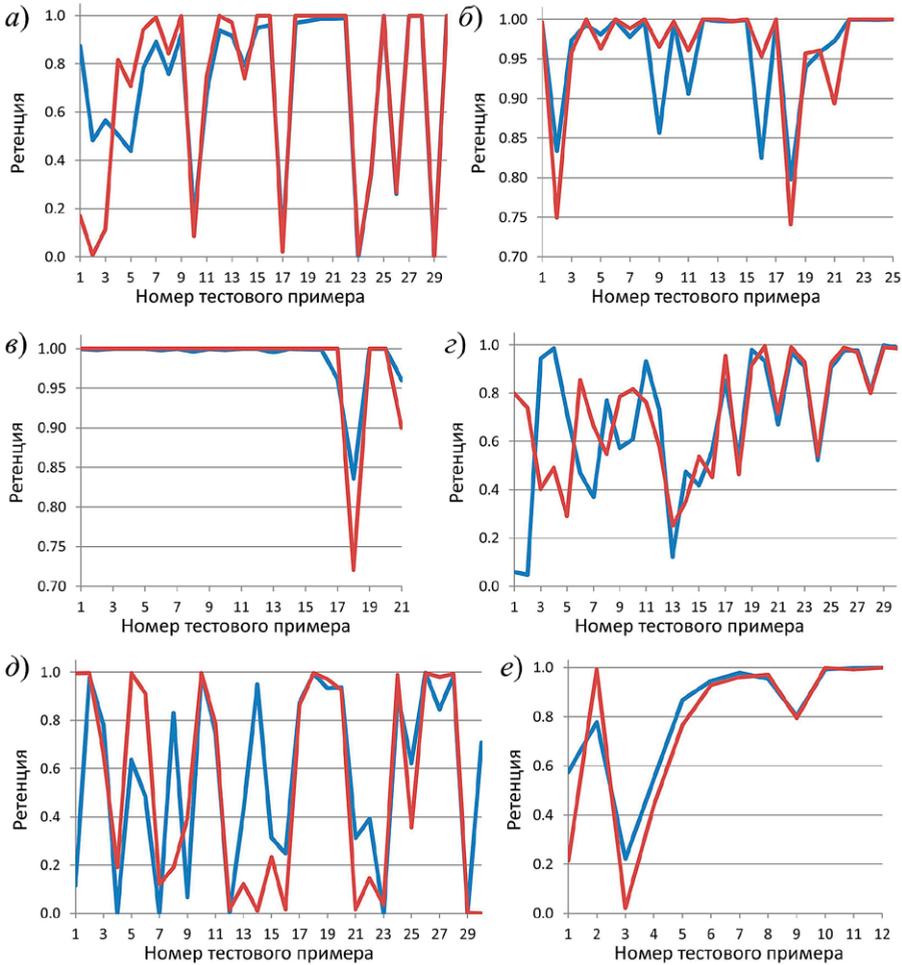


Рис. 4. Отклонение эталонных и рассчитанных моделями типовой топологии уровней ретенции: а) цинка, б) железа, в) меди, г) свинца, д) стронция, е) хрома. Синяя и красная линии соответствуют фактическому и прогнозируемому уровням ретенции соответственно

Для проверки первоначальных выводов об эффективности и адекватности спроектированных моделей проведен анализ по схеме «5-fold кросс-валидация». Для каждой нейросетевой модели, спроектированной и обученной на первоначальном этапе, создавалось пять копий. Синаптические веса моделей-копий сбрасывались до малых случайных значений, после чего каждая модель-копия обучалась на исходном наборе данных, разделенном в пропорции 80% и 20% на обучающее и тестовое множество соответственно. При этом элементы тестового множества выбирались методом последовательного сдвига на 20% полной выборки, начиная с первого элемента. Процесс проведения экспериментов в пакете Logiном 6.0 иллюстрирует рис. 5 (на примере меди).

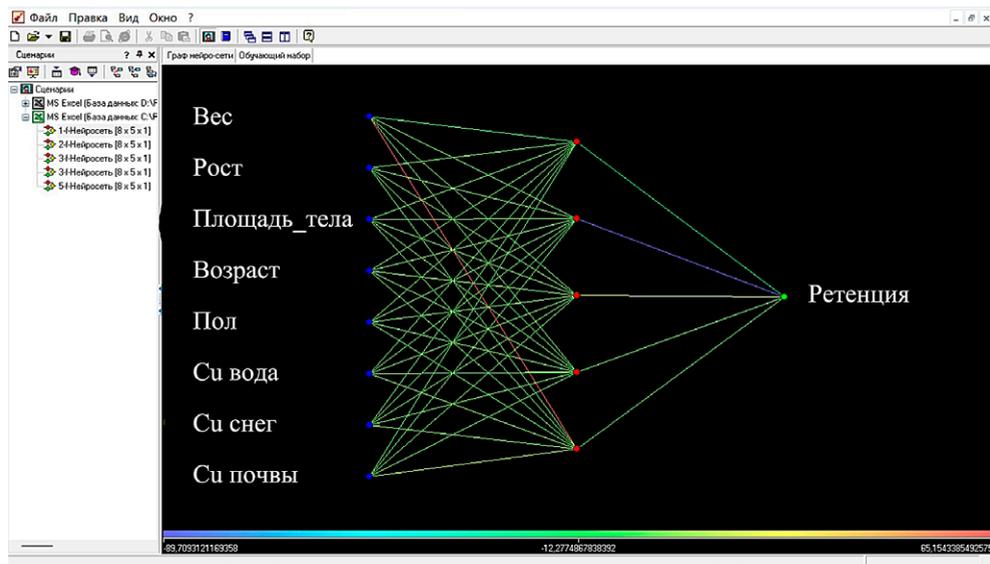


Рис. 5. Проведение кросс-валидации для модели ретенции меди

Результаты оценены по количеству правильно спрогнозированных уровней ретенции на тестовой выборке. Показана стабильно высокая точность всех спроектированных моделей. При этом наиболее стабильные показатели достигнуты при экспериментах для модели оценки уровня ретенции меди (точность от 81 до 100%), наименьшие – для свинца (точность от 67.7 до 78.3%). Результаты по всем шести моделям приведены в табл. 2.

Табл. 2

Точность моделей на тестовом множестве для 5-fold кросс-валидации

Модель ретенции	Точность модели, %				
	1*	2	3	4	5
Цинк	96.7	90.0	83.3	93.3	90.0
Железо	84.0	80.0	88.0	84.0	88.0
Медь	95.2	100	85.7	95.2	81.0
Свинец	76.6	70.0	67.7	71.0	78.3
Стронций	100	75.0	87.0	75.0	87.5
Хром	75.0	100	91.7	83.3	92.0

Обозначения: * – номер эксперимента.

Результаты проверки позволяют сделать вывод об адекватности построенных моделей, а также об отсутствии переобучения, что, в свою очередь, гарантирует высокую способность моделей к обобщению данных.

Данные тестирования показывают, что наиболее точными являются модели для оценки уровней ретенции тех металлов, для которых имеется информация об их содержании в трех компонентах урбозкосистемы (снег, питьевая вода и почва). При снижении количества значимых предикторов обобщающая способность моделей снижается. Однако данный показатель не является решающим. Так, для свинца точность расчетов на тестовых данных оказалась наименьшей при полном наборе входных предикторов. Подобные результаты могут говорить о наличии дополнительных неучтенных моделью факторов, оказывающих сильное влияние на изменчивость содержания этого металла в организме, и требуют проведения дополнительных исследований.

Заключение

Один из путей повышения качества экспериментальных результатов при анализе сложных систем, к которым относится урбозкосистема, состоит в обоснованном выборе объекта контроля. К таким представительным объектам контроля следует отнести биологические субстраты организма человека, которые дают репрезентативный отклик на присутствие в окружающей среде токсикантов.

Предложен способ оценки накопления металлов в организме на основании данных об их поступлении воздушным и водно-пищевым путем и содержании в биологических субстратах. Учет ретенции металлов в организме проведен с помощью интеллектуальной системы, которая позволяет эффективно определять меру накопления металлов в организме без инвазивных процедур пробоотбора и сложных пробоподготовки и анализа. Проведенные численные эксперименты доказали правомерность выдвинутой гипотезы относительно возможности высокоточного расчета уровней ретенции металлов на основе доступных для исследования параметров. В качестве расчетных моделей хорошие результаты показало использование искусственных нейронных сетей типа многослойный персептрон. Даже при применении типовой топологии такие модели обеспечивают оценку уровней ретенции с точностью около 90%. Так как для различных металлов точность моделей значимо отличается, можно рекомендовать усложнение топологии нейросетевой модели в тех случаях, когда точность оказывается недостаточной.

Спроектированная нейросетевая модель позволяет осуществлять решение обратных задач по определению содержания металлов в компонентах урбозкосистемы, в том числе с установлением допустимых содержаний, не приводящих к накоплению металлов в организме.

Заключение Комитета по этике. Исследование проведено в соответствии с положениями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации и одобрено локальным этическим комитетом Казанского федерального университета (протокол № 40 от 09.03.2023).

Информированное согласие. Информированное согласие было получено от всех субъектов, участвовавших в исследовании, или их законных представителей.

Благодарности. Исследование проведено при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках исполнения обязательств по Соглашению № 07503-2023-032 от 16.01.2023 (номер темы FZSU-2023-0005).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Mandlate J.S., Soares B.M., Andrade C.F.F., Colling L.A., Primel E.G., Mesko M.F., Duarte F.A. Determination of trace elements in *Sergio mirim*: An evaluation of sample preparation methods and detection techniques // Environ. Sci. Pollut. Res. 2020. V. 17, No 27. P. 21914–21923. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08766-5>.
2. Matloob M.H. Determination of cadmium, lead, copper and zinc in Yemeni khat by anodic stripping voltammetry // East. Mediterr. Health J. 2003. V. 9, No 1–2. P. 28–36. <https://doi.org/10.26719/2003.9.1–2.28>.
3. Авцын А.П., Жаворонков А.А., Риш М.А., Строчкова Л.С. Микроэлементозы человека: этиология, классификация, органопатология. М.: Медицина, 1991. 496 с.
4. Скальный А.В. Химические элементы в физиологии и экологии человека. М.: Оникс 21 век, 2004. 216 с.
5. Ali H., Khan E. Environmental chemistry in the twenty-first century // Environ. Chem. Lett. 2017. V. 15, No 2. P. 329–346. <https://doi.org/10.1007/s10311-016-0601-3>.
6. Боев В.М., Верещагин Н.Н., Скачкова М.А., Быстрых В.В., Скачков М.В. Экология человека на урбанизированных и сельских территориях. Оренбург: Оренбург. кн. изд-во, 2003. 392 с.
7. Assessing Human Health Risks of Chemicals: Derivation of Guidance Values for Health-Based Exposure Limits. Ser.: Environmental Health Criteria. No 170. Geneva: W. H. O., 1994. 45 p.
8. Eisenstein E.M., Eisenstein D. A behavioral homeostasis theory of habituation and sensitization: II. Further developments and predictions // Rev. Neurosci. 2006. V. 5, No 17. P. 533–557. <https://doi.org/10.1515/REVNEURO.2006.17.5.533>.
9. Веремчук Л.В., Черпак Н.А., Гвозденко Т.А., Волкова М.В. Методология оценки влияния загрязнения атмосферного воздуха на формирование уровней общей заболеваемости бронхиальной астмой // Гигиена и санитария. 2015. Т. 3, № 94. С. 119–122.
10. Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles. Ser.: Environmental Health Criteria. No 155. Geneva: W. H. O., 1993. 86 p.
11. Okosa I., Paul T., IkechukwuEdeh C.E., Ehiomogoe P., Emeka-Chris C.C., Okereke A.C. Ecological and health risk assessment of heavy metals: A case study of residential waste sites in Umuahia, South-East Nigeria // Environ. Monit. Assess. 2023. V. 195, No 3. Art. 390. <https://doi.org/10.1007/s10661-023-10930-6>.
12. Rahim M., Ullah I., Khan A., Haris M.R.H.M. Health risk from heavy metals via consumption of food crops in the vicinity of district Shangla // J. Chem. Soc. Pak. 2016. V. 38, No 1. P. 177–185.
13. Prejac J., Višnjević V., Skalny A.A., Grabeklis A.R., Mimica N., Momčilović B. Hair for a long-term biological indicator tissue for assessing the strontium nutri-

- tional status of men and women // *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2017. V 42. P. 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2017.02.015>.
14. *Veremchuk L.V., Mineeva E.E., Vitkina T.I., Gvozdenko T.A., Golokhvast K.S.* Impact of atmospheric microparticles and heavy metals on external respiration function of urbanized territory population // *Russ. Open Med. J.* 2017. V. 6, No 4. Art. e0402. <https://doi.org/10.15275/rusomj.2017.0402>.
 15. *Momčilović B., Prejac J., Skalny A.V., Mimica N.* In search of decoding the syntax of the bioelements in human hair – a critical overview // *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2018. V. 50. P. 543–553. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.03.016>.
 16. *Coelho P., Costa S., Silva S., Walter A., Ranville J., Sousa A.C.A., Costa C., Coelho M., Garcia-Leston J., Pastorinho M.R., Laffon B., Pasaro E., Harrington C., Taylor A., Teixeira J.P.* Metal(loid) levels in biological matrices from human populations exposed to mining contamination – Panasqueira Mine (Portugal) // *J. Toxicol. Environ. Health, Part A.* 2012. V. 75, No 13–15. P. 893–908. <https://doi.org/10.1080/15287394.2012.690705>.
 17. *Забродский П.Ф.* Влияние ксенобиотиков на иммунный гомеостаз // *Общая токсикология / под ред. Б.А. Курляндского, В.А. Филова. М.: Медицина, 2002. С. 352–384.*
 18. *Widdowson E.M.* Absorption, excretion and storage of trace elements: Studies over 50 years // *Food Chem.* 1992. V. 43, No 3. P. 203–207. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(92\)90174-Z](https://doi.org/10.1016/0308-8146(92)90174-Z).
 19. *Rehman K., Fatima F., Waheed I., Akash M.S.H.* Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences // *J. Cell. Biochem.* 2018. V. 119, No 1. P. 157–184. <https://doi.org/10.1002/jcb.26234>.
 20. *Ye J., Medzhitov R.* Control strategies in systemic metabolism // *Nat. Metab.* 2019. V. 1, No 10. P. 947–957. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0118-8>.
 21. *Torday J.S.* A central theory of biology // *Med. Hypotheses.* 2015. V. 85, No 1. P. 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2015.03.019>.
 22. *Goldstein D.S.* How does homeostasis happen? Integrative physiological, systems biological, and evolutionary perspectives // *Am. J. Physiol.: Regul., Integr. Comp. Physiol.* 2019. V. 316, No 4. P. R301–R317. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00396.2018>.
 23. *Бобкова И.Н., Камышова Е.С., Чеботарева Н.В.* Проба Реберга – Тареева в оценке скорости клубочковой фильтрации // *Терапевтический архив.* 2021. Т. 93, вып. 10. С. 1246–1248. <https://doi.org/10.26442/00403660.2021.10.201119>.
 24. *Dongarrà G., Lombardo M., Tamburo E., Varrica D., Cibella F., Cuttitta G.* Concentration and reference interval of trace elements in human hair from students living in Palermo, Sicily (Italy) // *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2011. V. 32, No 1. P. 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2011.03.003>.
 25. *Pottel H., Vrydags N., Mahieu B., Vandewynckele E., Croes K., Martens F.* Establishing age/sex related serum creatinine reference intervals from hospital laboratory data based on different statistical methods // *Clin. Chim. Acta.* 2008. V. 396, No 1–2. P. 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2008.06.017>.
 26. *Joubaud P.* Variations en fonction de l'âge et du sexe de la clairance de la créatinine estimée selon Cockcroft et Gault dans une population sélectionnée d'adultes non hospitalisés // *Ann. Biol. Clin.* 2004. V. 62, No 5. P. 547–554.
 27. *Forni Ognà V., Ognà A., Vuistiner P., Pruijm M., Ponte B., Ackermann D., Gabutti L., Vakilzadeh N., Mohaupt M., Martin P.-Y., Guessous I., Pechere-Bertschi A., Paccaud F., Bochud M., Burnier M.* New anthropometry-based age- and sex-specific reference values

- for urinary 24-hour creatinine excretion based on the adult Swiss population // BMC Med. 2015. V. 13, No 1. Art. 40. <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0275-x>.
28. Руководство по контролю загрязнения атмосферы (в редакции РД 52.04.667-2005), 1991. 615 с.
29. *Tunakova Yu., Novikova S., Krasnyuk I., Faizullin R., Gabdrakhmanova G.* Neural network self-learning model for complex assessment of drinking water safety for consumers // Bio-NanoScience. 2018. V. 8, No 2. P. 504–510. <https://doi.org/10.1007/s12668-017-0486-z>.
30. *Buhrmester V., Münch D., Arens M.* Analysis of explainers of black box deep neural networks for computer vision: A survey // Mach. Learn. Knowl. Extr. 2021. V. 3, No 4. P. 966–989. <https://doi.org/10.3390/make3040048>.
31. *Fallah N., Gu H., Mohammad K., Seyyedsalehi S.A., Nourijelyani K., Eshraghian M.R.* Nonlinear Poisson regression using neural networks: A simulation study // Neural Comput. Appl. 2009. V. 18, No 8. P. 939–943. <https://doi.org/10.1007/s00521-009-0277-8>.
32. *Yotov K., Hadzhikolev E., Hadzhikoleva S., Cheresharov S.* Finding the optimal topology of an approximating neural network // Mathematics. 2023. V. 11, No 1. Art. 217. <https://doi.org/10.3390/math11010217>.

Поступила в редакцию 23.11.2023

Принята к публикации 09.01.2024

Тунакова Юлия Алексеевна, доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой общей химии и экологии

Казанский национальный исследовательский технический университет имени А.Н. Туполева – КАИ

ул. К. Маркса, д. 10, г. Казань, 420111, Россия

E-mail: YuATunakova@kai.ru

Новикова Светлана Владимировна, доктор технических наук, доцент, профессор кафедры прикладной математики и информатики

Казанский национальный исследовательский технический университет имени А.Н. Туполева – КАИ

ул. К. Маркса, д. 10, г. Казань, 420111, Россия

E-mail: SVNovikova@kai.ru

Валиев Всеволод Сергеевич, старший научный сотрудник лаборатории биогеохимии

Институт проблем экологии и недропользования Академии наук Республики Татарстан

ул. Даурская, д. 28, г. Казань, 420087, Россия

E-mail: ipen-anrt@mail.ru

Файзуллин Рашат Искандарович, кандидат медицинских наук, доцент, заместитель директора по научной деятельности Института фундаментальной медицины и биологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет

ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия

E-mail: RIFajzullin@kpfu.ru

ORIGINAL ARTICLE

doi: 10.26907/2542-064X.2024.2.266-282

A Method for Quantitative Assessment of Metal Accumulation in the Human Body during Polymetallic Pollution of Urban Ecosystem Components*Yu.A. Tunakova^{a*}, S.V. Novikova^{a**}, V.S. Valiev^{b***}, R.I. Faizullin^{c****}*^a*Kazan National Research Technical University named after A.N. Tupolev – KAI, Kazan, 420111 Russia*^b*Institute of Ecology and Subsoil Use, Tatarstan Academy of Sciences, Kazan, 420087 Russia*^c*Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia**E-mail: *YuATunakova@kai.ru, **SVNovikova@kai.ru, ***ipen-anrt@mail.ru, ****RIFajzullin@kpfu.ru*

Received November 23, 2023; Accepted January 09, 2024

Abstract

High metal concentrations in the body's biological substrates often result from a persistent, cumulative impact of adverse environmental conditions. This article considers the quantitative composition of human biological substrates as an indicator of the state of urban ecosystem components. Assessing the accumulation of metals in the body by directly measuring their concentrations in biological substrates is a multi-step analytical procedure. Here, a quick-and-easy method for determining metal concentrations in biological substrates based on a neural network algorithm was introduced. A complex neural network model was developed to enable the determination of metal inputs from the air and food-water system without the need for invasive sampling of biomaterials or too difficult processing and analysis of the samples obtained. The model also proved to be feasible in solving the inverse problems associated with the determination of metal thresholds in various components of urban ecosystems.

Keywords: urban ecosystem, components, polymetallic pollution, biological substrate, accumulation, neural network model, metal retention

Institutional Review Board Statement. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Local Ethics Committee of Kazan Federal University (protocol 40, March 09, 2023).

Informed Consent Statement. Informed consent was obtained from all subjects involved in the study or their authorized representatives.

Acknowledgments. This study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation as part of agreement no. 075 03-2023-032 dated January 16, 2023 (topic no. FZSU-2023-0005).

Conflicts of Interest. The authors declare no conflicts of interest.

Figure Captions

Fig. 1. “Actual–predicted” correlations in the pairs of training and testing data sets for six metal retention models.

Fig. 2. Comparative accuracy of the recognition of six metal retention models based on the testing and training data sets.

Fig. 3. Relationship between the correlation and accuracy of the obtained neural network models based on the training (*a*) and testing (*b*) sets for six studied metals.

Fig. 4. Deviation of the reference and retention values calculated by the standard topology models: *a*) zinc; *b*) iron; *c*) copper; *d*) lead; *e*) strontium; *f*) chromium. Blue and red lines show the actual and predicted levels of retention, respectively.

Fig. 5. Cross-validation for the copper retention model.

References

1. Mandlate J.S., Soares B.M., Andrade C.F.F., Colling L.A., Primel E.G., Mesko M.F., Duarte F.A. Determination of trace elements in *Sergio mirim*: An evaluation of sample preparation methods and detection techniques. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2020, vol. 17, no. 27, pp. 21914–21923. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08766-5>.
2. Matloob M.H. Determination of cadmium, lead, copper and zinc in Yemeni khat by anodic stripping voltammetry. *East. Mediterr. Health J.*, 2003, vol. 9, nos. 1–2, pp. 28–36. <https://doi.org/10.26719/2003.9.1-2.28>.
3. Avtsyn A.P., Zhavoronkov A.A., Rish M.A., Strochkova L.S. *Mikroelementozy cheloveka: etiologiya, klassifikatsiya, organopatologiya* [Human Microelementoses: Etiology, Classification, and Organopathology]. Moscow, Meditsina, 1991. 496 p. (In Russian)
4. Skalny A.V. *Khimicheskie elementy v fiziologii i ekologii cheloveka* [Chemical Elements in Human Physiology and Ecology]. Moscow, Oniks 21 vek, 2004. 216 p. (In Russian)
5. Ali H., Khan E. Environmental chemistry in the twenty-first century. *Environ. Chem. Lett.*, 2017, vol. 15, no. 2, pp. 329–346. <https://doi.org/10.1007/s10311-016-0601-3>.
6. Boev V.M., Vereshchagin N.N., Skachkova M.A., Bystrykh V.V., Skachkov M.V. *Ekologiya cheloveka na urbanizirovannykh i sel'skikh territoriyakh* [Human Ecology in Urban and Rural Areas]. Orenburg, Orenb. Kn. Izd., 2003. 392 p. (In Russian)
7. *Assessing Human Health Risks of Chemicals: Derivation of Guidance Values for Health-Based Exposure Limits*. Ser.: Environmental Health Criteria, no. 170. Geneva, W. H. O., 1994. 45 p.
8. Eisenstein E.M., Eisenstein D. A behavioral homeostasis theory of habituation and sensitization: II. Further developments and predictions. *Rev. Neurosci.*, 2006, vol. 5, no. 17, pp. 533–557. <https://doi.org/10.1515/REVNEURO.2006.17.5.533>.
9. Veremchuk L.V., Cherpak N.A., Gvozdenko T.A., Volkova M.V. A methodology for assessing the impact of air pollution on the general incidence of bronchial asthma. *Gig. Sanit.*, 2015, vol. 3, no. 94, pp. 119–122. (In Russian)
10. *Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles*. Ser.: Environmental Health Criteria, no. 155. Geneva, W. H. O., 1993. 86 p.
11. Okosa I., Paul T., Ikechukwu-Edeh C.E., Ehiomogoe P., Emeka-Chris C.C., Okereke A.C. Ecological and health risk assessment of heavy metals: A case study of residential waste sites in Umuahia, South-East Nigeria. *Environ. Monit. Assess.*, 2023, vol. 195, no. 3, art. 360. <https://doi.org/10.1007/s10661-023-10930-6>.
12. Rahim M., Ullah I., Khan A., Haris M.R.H.M. Health risk from heavy metals via consumption of food crops in the vicinity of district Shangla. *J. Chem. Soc. Pak.*, 2016, vol. 38, no. 1, pp. 177–185.
13. Prejac J., Višnjević V., Skalny A.A., Grabeklis A.R., Mimica N., Momčilović B. Hair for a long-term biological indicator tissue for assessing the strontium nutritional status of men and women. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2017, vol. 42, pp. 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2017.02.015>.
14. Veremchuk L.V., Mineeva E.E., Vitkina T.I., Gvozdenko T.A., Golokhvast K.S. Impact of atmospheric microparticles and heavy metals on external respiration function of urbanized territory population. *Russ. Open Med. J.*, 2017, vol. 6, no. 4, art. e0402. <https://doi.org/10.15275/rusomj.2017.0402>.
15. Momčilović B., Prejac J., Skalny A.V., Mimica N. In search of decoding the syntax of the bioelements in human hair – A critical overview. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2018, vol. 50, pp. 543–553. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.03.016>.
16. Coelho P., Costa S., Silva S., Walter A., Ranville J., Sousa A.C.A., Costa C., Coelho M., Garcia-Leston J., Pastorinho M.R., Laffon B., Pasaro E., Harrington C., Taylor A., Teixeira J.P. Metal(loid) levels in biological matrices from human populations exposed to mining contamination – Panasqueira Mine (Portugal). *J. Toxicol. Environ. Health, Part A*, 2012, vol. 75, nos. 13–15, pp. 893–908. <https://doi.org/10.1080/15287394.2012.690705>.
17. Zabrodsky P.F. The effects of xenobiotics on immune homeostasis. In: Kurlyandsky B.A., Filov V.A. (Eds.) *Obschchaya toksikologiya* [General Toxicology]. Moscow, Meditsina, 2002, pp. 352–384. (In Russian)
18. Widdowson E.M. Absorption, excretion and storage of trace elements: Studies over 50 years. *Food Chem.*, 1992, vol. 43, no. 3, pp. 203–207. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(92\)90174-Z](https://doi.org/10.1016/0308-8146(92)90174-Z).
19. Rehman K., Fatima F., Waheed I., Akash M.S.H. Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences. *J. Cell. Biochem.*, 2018, vol. 119, no. 1, pp. 157–184. <https://doi.org/10.1002/jcb.26234>.

20. Ye J., Medzhitov R. Control strategies in systemic metabolism. *Nat. Metab.*, 2019, vol. 1, no. 10, pp. 947–957. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0118-8>.
21. Torday J.S. A central theory of biology. *Med. Hypotheses*, 2015, vol. 85, no. 1, pp. 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2015.03.019>.
22. Goldstein D.S. How does homeostasis happen? Integrative physiological, systems biological, and evolutionary perspectives. *Am. J. Physiol.: Regul., Integr. Comp. Physiol.*, 2019, vol. 316, no. 4, pp. R301–R317. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00396.2018>.
23. Bobkova I.N., Kamyshova E.S., Chebotareva N.V. The Rehberg–Tareev test in assessing the glomerular filtration rate. *Ter. Arkh.*, 2021, vol. 93, no. 10, pp. 1246–1248. <https://doi.org/10.26442/00403660.2021.10.201119>. (In Russian)
24. Dongarrà G., Lombardo M., Tamburo E., Varrica D., Cibella F., Cuttitta G. Concentration and reference interval of trace elements in human hair from students living in Palermo, Sicily (Italy). *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 2011, vol. 32, no. 1, pp. 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2011.03.003>.
25. Pottel H., Vrydags N., Mahieu B., Vandewynckele E., Croes K., Martens F. Establishing age/sex related serum creatinine reference intervals from hospital laboratory data based on different statistical methods. *Clin. Chim. Acta*, 2008, vol. 396, nos. 1–2, pp. 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2008.06.017>.
26. Joubaud P. Variations en fonction de l'âge et du sexe de la clairance de la créatinine estimée selon Cockcroft et Gault dans une population sélectionnée d'adultes non hospitalisés. *Ann. Biol. Clin.*, 2004, vol. 62, no. 5, pp. 547–554. (In French)
27. Forni Ognà V., Ognà A., Vuistiner P., Pruijm M., Ponte B., Ackermann D., Gabutti L., Vakilzadeh N., Mohaupt M., Martin P.-Y., Guessous I., Pechere-Bertschi A., Paccaud F., Bochud M., Burnier M. New anthropometry-based age- and sex-specific reference values for urinary 24-hour creatinine excretion based on the adult Swiss population. *BMC Med.*, 2015, vol. 13, no. 1, art. 40. <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0275-x>.
28. Guidance Document RD 52.04.667–2005. Guidelines for the control of air pollution. Moscow, 1991. 615 p. (In Russian)
29. Tunakova Yu., Novikova S., Krasnyuk I., Faizullin R., Gabdrakhmanova G. Neural network self-learning model for complex assessment of drinking water safety for consumers. *BioNanoScience*, 2018, vol. 8, no. 2, pp. 504–510. <https://doi.org/10.1007/s12668-017-0486-z>.
30. Buhrmester V., Münch D., Arens M. Analysis of explainers of black box deep neural networks for computer vision: A survey. *Mach. Learn. Knowl. Extr.*, 2021, vol. 3, no. 4, pp. 966–989. <https://doi.org/10.3390/make3040048>.
31. Fallah N., Gu H., Mohammad K., Seyyedsalehi S.A., Nourijelyani K., Eshraghian M.R. Nonlinear Poisson regression using neural networks: A simulation study. *Neural Comput. Appl.*, 2009, vol. 18, no. 8, pp. 939–943. <https://doi.org/10.1007/s00521-009-0277-8>.
32. Yotov K., Hadzhikolev E., Hadzhikoleva S., Cheresharov S. Finding the optimal topology of an approximating neural network. *Mathematics*, 2023, vol. 11, no. 1, art. 217. <https://doi.org/10.3390/math11010217>.

Для цитирования: Тунакова Ю.А., Новикова С.В., Валиев В.С., Фаизуллин Р.И. Способ количественной оценки накопления металлов в организме человека при полиметаллическом загрязнении компонентов урбоэкосистемы // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2024. Т. 166, кн. 2. С. 266–282. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2024.2.266-282>.

For citation: Tunakova Yu.A., Novikova S.V., Valiev V.S., Faizullin R.I. A method for quantitative assessment of metal accumulation in the human body during polymetallic pollution of urban ecosystem components. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2024, vol. 166, no. 2, pp. 266–282. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2024.2.266-282>. (In Russian)

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

УДК 577.1+615

doi: 10.26907/2542-064X.2024.2.283-296

БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИНДУЦИРОВАННОГО ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО ПАРАЛИЧА ЗАДНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ У МЫШЕЙ СТОКА СD-1

А.Н. Фаттахова¹, В.Г. Евтюгин¹, К.Н. Бушмелева²

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет,
г. Казань, 420008, Россия

²Институт органической и физической химии имени А.Е. Арбузова ФИЦ «Казанский
научный центр РАН», г. Казань, 420088, Россия

Аннотация

Разработана модель фармакологического паралича задних конечностей у мышей. Во время первого периода, «подготовительного», ингибирование активности важного фермента обмена нейроаминов моноаминоксидазы А (МАО-А) приводило к повышению уровня стероидных гормонов и пролактина, снижению активности СУР 3А4 и СУР 2D6 в гепатоцитах и секреции астроцитарного белка S-100 в сыворотку крови. Во время второго периода, «манифестного», у мышей развивался паралич задних конечностей, наблюдалось накопление гранул кортизола, разрушение капилляров и агрегация деформированных эритроцитов в зоне коры и гиппокампа мозга.

Ключевые слова: МАО-А, моклобемид, фармакологический паралич у мышей.

Введение

Согласно Декларации по глобальной первичной профилактике инсульта и деменции Всемирной организации по борьбе с инсультом (2020 г.), при условии сохранения текущих тенденций профилактики инсульта к 2050 г. можно ожидать появления 200 млн пациентов с перенесенным инсультом и 106 млн пациентов, страдающих деменцией, а с каждым последующим годом – более 30 млн новых случаев инсульта, 12 млн случаев смерти от инсульта, 5 млн случаев смерти, вызванных деменцией. Такая ситуация представляет угрозу стабильности всей системы здравоохранения; однако ее можно предотвратить, поскольку значительная часть бремени заболеваний связана с потенциально модифицируемыми факторами риска и ранней диагностикой нейродегенеративных проявлений [1]. Современные стратегии первичной профилактики инсульта и сердечно-сосудистых заболеваний должны быть основаны на детектировании ранних маркеров апоптоза или некроза центральных нейронов и астроцитов до развития заболевания. Актуальной проблемой является разработка тестов для выявления предикторов инсульта и скрининга как всей популяции, так и пациентов из группы риска. Одним из предикторов может быть астроцитарный белок S-100 в периферической крови, который является маркером нарушения гематоэнцефалического барьера и обнаруживается у пациентов с нейродегенеративными заболеваниями

и диабетом [2, 3]. Проблема идентификации тканевых антигенов нервной ткани до развития инсульта остается острой [4].

Биохимические маркеры инсульта, которые выявляются у лабораторных животных, могут служить основанием для разработки экспресс-тестов для ранней диагностики факторов инсульта и выявления молекулярных маркеров неустойчивого состояния перед инсультом. Диагностика такого состояния является одним из важных способов профилактики инсультов [3].

Цель исследования состоит в разработке и биохимической характеристике модели фармакологического паралича задних конечностей и анализе содержания астроцитарного белка S100 как предиктора инсульта у мышей.

1. Материалы и методики исследования

1.1. Введение препарата мышам и получение органов и сыворотки крови для исследований. В опытах *in vivo* использовали мышей стока CD-1 обоего пола ($n = 50$), SPF-категории, предоставленных НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН, г. Пущино. Возраст животных к началу эксперимента составлял 4 недели, вес – 16–18 г. Мышей содержали, согласно Правилам содержания животных, в установке Techniplast IVC Transport Unit (Италия), на подстилке Rehofix (JRS, Германия), при условиях постоянной температуры 22–25 °C и влажности, в нормальном световом режиме. Животным предоставляли зерновой корм и воду *ad libitum*. Мыши были разделены на опытную и контрольную группы по 25 особей в каждой. Опытной группе один раз в день в течение 6 суток вводили внутривентриально 100 мкл раствора селективного ингибитора моноаминоксидазы А (МАО-А) моклобемида (N-[2-(морфолин-4-ил)этил]-4-хлорбензамид) «Аурорикс» (La Roche, Швейцария) в дозе 400 мг/кг в 0.9%-ном растворе NaCl. Через 6 суток 12 мышей опытной группы вывели из опыта. Оставшимся в опытной группе особям ($n = 13$) вводили раствор моклобемида в дозе 600 мг/кг в 0.9%-ном растворе NaCl и через 5 суток вывели их из опыта. Мыши в контрольной группе получали внутривентриально 100 мкл 0.9%-ного раствора NaCl. По окончании эксперимента мышей контрольной группы вывели из опыта. Всех выведенных из опыта животных подвергали эвтаназии в камере с углекислым газом.

Пробы крови получали из левого желудочка сердца с помощью шприца и помещали кровь в вакуумные контейнеры с 0.2%-ным раствором этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА). Полученную кровь центрифугировали при 3000 g в течение 10 мин для осаждения форменных элементов крови и получения сыворотки. Сыворотку замораживали при –20 °C и использовали для определения гормонов и белка S-100. Печень, сердце и мозг животных экстерпарировали и помещали в раствор, содержащий 0.25 M сахарозы, 1 mM ЭДТА, 0.2 M трис-HCl буферный раствор с pH 7.4, и хранили при –18 °C. Микросомы печени, сердца и митохондриальные фракции мозга получали путем гомогенизирования и центрифугирования на холоду на центрифуге Optima L-90K ultracentrifuge (Beckman Coulter, США), как указано в работе [5]. Микросомные и митохондриальные фракции замораживали при –20 °C и использовали для определения активности МАО-А, цитохромов 3A4 и 2D6 [5]. Мозг животных использовали для получения ультратонких срезов и криосрезов для анализа с помощью просвечивающей электронной микроскопии и иммуноцитохимии.

1.2. Получение ультратонких срезов мозга мышей. Для получения ультратонких срезов использовали стандартный метод предварительной подготовки тканей [6], для чего мозг мыши инкубировали в растворе глутарового альдегида и обезвоживали в этаноле и пропиленоксиде, инкубировали в растворе OsO_4 и полимеризовали в смоле Эпон. Полученные с помощью микротомы Leica UC 7 (Carl Zeiss, Германия) ультратонкие срезы анализировали на электронном просвечивающем микроскопе JEM 100 CXII (JEOL, Япония).

1.3. Получение криосрезов мозга мышей для иммуцитохимического выявления гранул кортизола. С целью получения криосрезов для иммуцитохимического выявления гранул кортизола мозг мыши заливали в среду NEG 50 "Richard-Allan Scientific" (США), замораживали в криостате в течение 30 мин. Для изготовления срезов использовали криостат Microm HM 550 (Thermo Scientific, США), полученные срезы наносили на стекла "StarFrost" с полилизинным покрытием. Срезы окрашивали с помощью коммерческого набора «Крезоловый фиолетовый» (Biovitrum, Россия) согласно инструкции фирмы-производителя и анализировали на световом микроскопе AXIO Vert A1 (Carl Zeiss, Германия). Для детектирования кортизола использовали первичные моноклональные антитела "Mouse IgG Cortisol-3" и вторичные антитела "Anti-mouse IgG Alexa Fluor 647" (Abcam, Великобритания). Полученные препараты анализировали с помощью конфокального лазерного микроскопа LSM 780 (Carl Zeiss, Германия).

1.4. Определение содержания гормонов в сыворотке крови мышей. Концентрацию гормонов пролактина, кортизола и дигидроэпиандростерон-сульфата (ДГЭА-С) в сыворотке крови мышей определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью коммерческих наборов «ИФА-пролактин», «СтероидИФА-кортизол», «ДГЭА-С-ИФА» (Алкор-Био, Россия) согласно инструкции фирмы-производителя. Концентрацию белка определяли спектрофотометрическим методом и рассчитывали по формуле $[c] = 1.58 \times A_{280} - 0.76 \times A_{260}$.

1.5. Определение активности MAO-A в микросомах и митохондриях тканей мышей. Активность MAO-A в митохондриальных фракциях мозга, микросомах сердца и печени мышей определяли по скорости дезаминирования норадреналина. Удельную активность выражали в нмоль 2,4-динитрофенилгидразона 3-метокси-4-гидроксиминдального альдегида, образовавшегося в 1 мг белка за 1 мин [5].

1.6. Определение концентрации и активности цитохромов P450 в микросомах печени и мозга мышей. Концентрацию цитохромов P450 в микросомах печени и мозга животных определяли по спектрам поглощения их фермент-субстратных комплексов, отравленных CO, и рассчитывали с помощью молярных коэффициентов поглощения $\epsilon_{450} = 91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ для восстановленной формы цитохромов и $\epsilon_{420} = 41 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ для окисленной формы цитохромов [5]. В качестве субстратов для определения ферментативной активности CYP 3A4 и CYP 2D6 использовали лекарственные препараты эритромицин и флуоксетин (Озон Фарм, Россия) соответственно. Дифференциальные спектры опытных реакционных смесей относительно контрольной реакционной смеси получали на двухлучевом спектрофотометре UV-2700 (Shimadzu, Япония) при длине волны 340 нм в динамике в течение 5 мин. Активности гидроксирования эритроми-

цина и окислительного dealкилирования флуоксетина определяли по окислению НАДН в 1 мин на 1 нмоль СУР, используя молярный коэффициент поглощения для НАДН $\epsilon_{340} = 6.22 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [5].

1.7. Иммунохимическое определение белка S-100 в сыворотке крови мышей. Сыворотку крови мышей разделяли с помощью стандартного денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле и проводили вестерн-блот-анализ фракций с помощью нитроцеллюлозных мембран (Invitrogen, США) согласно протоколу производителя (Bio-Rad, США) в течение 12 ч при постоянном напряжении 20 В в системе Bio-Rad для вестерн-блоттинга. Для детектирования белка S-100 мембраны инкубировали в буферном растворе, содержащем первичные моноклональные мышинные антитела против S-100 (Santa Cruz Biotechnology, США). В качестве вторичных антител использовали антимышинные моноклональные антитела, конъюгированные с пероксидазой (Sigma, Германия). В качестве хромогенного субстрата использовали диаминобензидин и 30%-ный H_2O_2 в 0.1 М трис-НСl, рН 7.6. Мембрану после окончания инкубации с субстратом анализировали на приборе ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, США).

1.8. Статистическая обработка результатов. Результаты представлены в виде $X \pm SE$, где X – среднее арифметическое значение величины, а SE – стандартная ошибка средней величины. Для оценки статистической значимости полученных результатов использовали параметрический критерий Стьюдента (t). Различия считали значимыми при $p < 0.05$. Все расчеты проводили с помощью программы EXCEL 13 (Microsoft, США).

2. Результаты исследования и их обсуждение

2.1. Биохимическая характеристика состояния мышей в «подготовительный» период, до паралича задних конечностей. Мыши стока CD-1 SPF-категории являются здоровыми животными и не несут в себе гены предрасположенности к каким-либо заболеваниям человека. Для индукции фармакологического ответа был использован обратимый ингибитор MAO-A моклобемид в дозах, превышающих рекомендованные дозы для пациентов и пересчитанных на вес животного с учетом коэффициента для лабораторной мыши, которые составили в среднем 0.4 мг/г веса мыши. Биохимические и физиологические эффекты от используемых в опытах доз моклобемида не описаны в фармакопейной статье данного лекарственного средства.

Анализ поведения и внешнего вида животных показал, что опытные мыши, особенно самцы, получавшие внутривенно по 100 мкл раствора моклобемида в дозе 400 мг/кг (6.8 мг/мышь), через 6 инъекций стали проявлять агрессивное поведение. Ранее в работах [7, 8] отмечалось агрессивное и аутичное поведение мышей, в геноме которых блокирован и не экспрессируется ген MAO-A (КО MAO-A мыши). Мыши, получавшие дозу 600 мг/кг (10.2 мг/мышь), после 5 инъекций стали ползать с парализованными задними конечностями по кругу. Они были выведены из опыта и подвергнуты эвтаназии в CO_2 -камере. Часть мозга мышей на границе гипоталамуса и коры с помощью секционного Атласа лабораторных мышей [9], согласно которому эта зона названа как *pes hippocampi* (Ammons's horn), и зона коры над этой структурой были выбраны для иммунохимического выявления гранул кортизола и исследований методом просвечи-

вающей электронной микроскопии. У мышей, получавших дозу 400 мг/кг, такие симптомы за время проведения опыта отсутствовали. Поэтому наблюдаемые симптомы, вызванные повышением дозы моклобемида, были отнесены к фармакологическим эффектам.

Анализ активности MAO-A, цитохромов P450 печени, определение содержания гормонов и астроцитарного белка S-100 в сыворотке крови проводили у мышей, получавших 400 мг/кг моклобемида в период, предшествующий параличу задних конечностей у мышей, получавших 600 мг/кг препарата.

Таким образом, проанализировано состояние, которое, возможно, привело к параличу задних конечностей у мышей. Согласно литературным данным, подавление активности MAO-A приводит к резкому увеличению концентрации норадреналина, адреналина, серотонина в синаптической зоне и возрастанию концентрации вазоактивного амина N-ацетилсеротонина в плазме крови [8]. В работе Zhao с соавторами [10] указано, что возрастание концентрации норадреналина и адреналина после инъекции ингибитора обратного захвата серотонина вызвало кровоизлияния в области сетчатки глаза у крыс. Моделирование локального ишемического повреждения коры головного мозга у крыс [11] привело к появлению в плазме крови ряда нейроспецифических белков, в том числе S-100.

Сравнительный анализ уровня MAO-A у опытных и контрольных мышей стока CD-1 (табл. 1) показал, что активность MAO-A с норадреналином в качестве субстрата у животных опытной группы достоверно снижалась в тканях сердца, мозга и печени по сравнению с показателями для животных контрольной группы.

Табл. 1

Активность MAO-A с норадреналином в митохондриальных фракциях и микросомах тканей органов мышей стока CD-1, получавших моклобеמיד в дозе 400 мг/кг (О), и контрольных животных (К) ($P = 0.95$)

Пол животных и число особей в группе	Удельная активность MAO-A, нмоль 2,4-динитрофенилгидразона 3-метокси-4-гидроксиминдального альдегида, образовавшегося в 1 мг белка за 1 мин					
	Сердце микросомы		Мозг митохондрии		Печень микросомы	
	К	О	К	О	К	О
Самцы: К(6); О(7)	1.5 + 0.5	0.24 + 0.01	0.58 + 0.04	0.3 + 0.1	2.40 + 0.09	0.8 + 0.2
Самки: К(6); О(6)	2.1 + 0.2	0.3 + 0.2	0.8 + 0.2	0.31 + 0.08	3.02 + 0.01	0.9 + 0.3

Таким образом, введение ингибитора MAO-A моклобемида в течение недели привело к стойкому снижению активности фермента во всех исследованных органах опытных животных, что характерно для антидепрессантов этого типа. Возможно, что подавление активности MAO-A высокими дозами моклобемида у мышей стока CD-1 привело к накоплению норадреналина, адреналина и серотонина в центральной нервной системе и вызвало агрессивное поведение животных, что характерно для синдрома немотивированной агрессии при низкой активности MAO-A [7, 8]. Для анализа влияния дефицита MAO-A на содержание гормонов в крови животных отбирали пробы во второй половине суток и

определяли уровень ДГЭА-С, кортизола и пролактина, поскольку показано, что снижение скорости метаболизма серотонина и норадреналина у лабораторных крыс приводило к активации гипоталамо-адреноркортикального пути [8, 10] и повышению давления у КО МАО А мышей [12].

Интересно, что подавление активности МАО-А не оказывало влияния на уровень ДГЭА-С у мышей стока CD-1. В случае с кортизолом и пролактином наблюдали четкие гендерные различия. У самцов ингибирование активности МАО-А приводило к снижению уровня кортизола и пролактина на 60% и 62.5% ($p < 0.05$) соответственно. У самок, напротив, в этих же условиях выявлено повышение уровня кортизола и пролактина на 78% и 35% ($p < 0.05$) соответственно (табл. 2). По-видимому, гормональный ответ на изменение концентрации серотонина и норадреналина в центральной нервной системе во многих случаях зависит от пола животных. Известно, что кортизол способствует повышению артериального давления. Возможно, эффект кортизола обусловлен способностью гормона задерживать ионы натрия и влиять на сосудистый тонус и сенсбилизацию сосудов к вазоактивному эффекту норадреналина.

Табл. 2

Уровень гормонов в сыворотке крови мышей стока CD-1, получавших моклобемид в дозе 400 мг/кг (О), и контрольных животных (К) ($P = 0.95$)

Пол животных и число особей в группе	Дигидроэпиандростерон сульфат мкг/мл		Кортизол, пмоль/мл		Пролактин, мМЕ/л	
	К	О	К	О	К	О
Самцы: К(6); О(7)	0.26 + 0.01	0.29 + 0.02	78.8 + 0.2	31.4 + 0.2	3267 + 6	1224 + 15
Самки: К(6); О(6)	0.27 + 0.02	0.27 + 0.02	21.1 + 0.2	37.8 + 0.8	1245 + 25	1685 + 50

Известно, что стероидные гормоны являются регуляторами экспрессии и активности цитохромов P450 [13]. Возможно, изменение гормонального состояния опытных животных в условиях подавления активности МАО-А (табл. 2) может вызвать патологическое состояние всей системы детоксикации печени. Активность С-гидроксилирования эритромицина как маркера цитохрома P450 3A4 и N-деалкилирования флуоксетина как маркера цитохрома P450 2D6 достоверно снижалась у мышей, получавших моклобемид, независимо от пола особей (табл. 3).

Табл. 3

Активность цитохромов P450 3A4 и 2D6 в микросомах печени мышей стока CD-1, получавших моклобемид в дозе 400 мг/кг (О), и контрольных животных (К) ($P = 0.95$)

Пол животных и число особей в группе	3A4 с эритромицином, нмоль НАДН/нмоль СУР×мин		2D6 с флуоксетином, нмоль НАДН/ нмоль СУР×мин	
	К	О	К	О
Самцы: К(6); О(7)	6.3 + 0.7	3.1 + 0.2	5 + 1	4 + 1
Самки: К(6); О(6)	6.5 + 0.9	3.6 + 0.7	5.9 + 0.4	2.3 + 0.8

Следует отметить тот факт, что пролонгированное в течение 6 суток подавление активности МАО-А вызвало понижение активности двух самых

важных ферментативных систем детоксикации, цитохромов P450 3A4 и 2D6, на фоне изменения концентрации кортизола и пролактина в крови. Таким образом, можно признать, что ингибирование активности MAO-A и подавление активности цитохромов P450 печени вызвали классический стресс у опытных животных [8, 10, 12].

Белки S-100 представляют собой семейство Ca^{2+} -связывающих белков, которые в большом количестве экспрессируются в астроцитах и клетках нейроглии. Белки S-100 участвуют в регуляции фосфорилирования белков, энергетического обмена, сборки компонентов цитоскелета, миграции клеток, гомеостаза Ca^{2+} , а также в пролиферации и дифференциации клеток [2, 3]. Секретия белка S-100 в сыворотку крови считается маркером церебрального патологического процесса различной этиологии, геморрагического и ишемического инсультов [2, 3, 11], болезни Альцгеймера, нейродегенеративных процессов в результате хирургических операций и т. д. [14]. Белки S-100 присутствуют в тканях мозга в олигомерной форме с молекулярной массой около 10 кДа и в двумерной конформации [3].

В результате электрофоретического разделения сыворотки крови мышей стока CD-1 опытной и контрольной групп выделены фракции белков с молекулярным весом 37 и 12 кДа, которые предположительно соответствуют двумерной и олигомерной структурам S-100 [3] и обнаружены только в сыворотке крови мышей, получавших моклобемид в дозе 400 мг/кг (рис. 1).

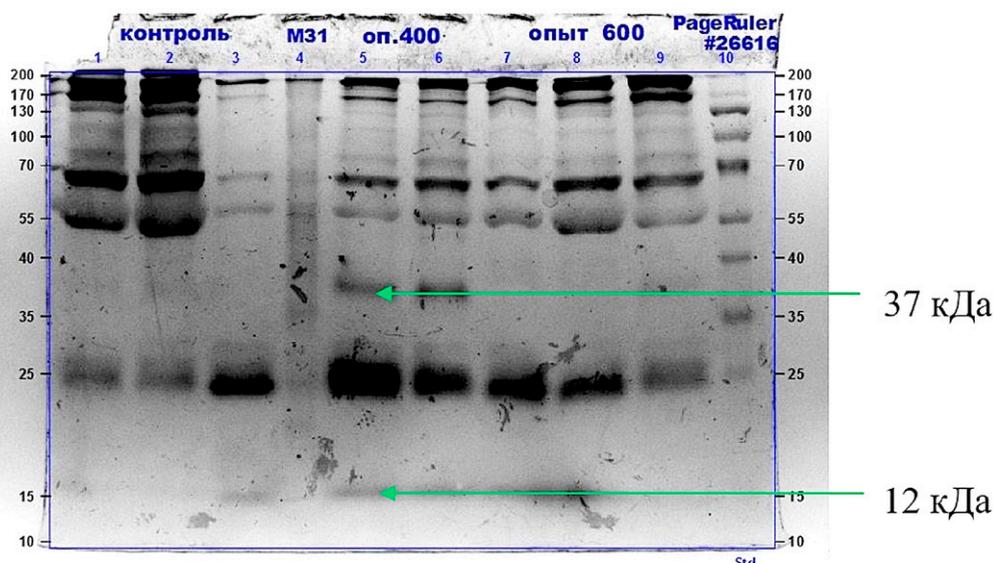


Рис. 1. Электрофореграмма белков в 12%-ном полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия: 1, 2, 3 – белки сыворотки крови мышей контрольной группы; 5, 6 – белки сыворотки крови мышей, получавших 400 мг/кг моклобемид; 7, 8, 9 – белки сыворотки крови мышей, получавших 600 мг/кг моклобемид; 4, 10 – маркеры молекулярного веса. Стрелкой указаны фракции 37 и 12 кДа

Вестерн-блот-анализ, в котором использовали первичные мышинные антитела против белка S-100 и вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой, показал, что в сыворотке крови мышей, получавших моклобемид в дозе 400 мг/кг, обнаружен белок S-100 в двумерной конформации и следы белка в

олигомерной конформации (рис. 2). Белок S-100В, член семейства S-100, является предиктором церебрального поражения у лабораторных животных [11]. Можно предположить, что высокие дозы ингибитора MAO-A моклобемида привели к возрастанию концентрации серотонина, норадреналина и вазоактивного амина N-ацетилсеротонина в ткани мозга мышей и, как следствие, к ишемии. Полученные данные о связи подавления активности MAO-A в мозге мышей и церебральной патологии подтверждаются результатами исследований ряда авторов [2, 3, 11].

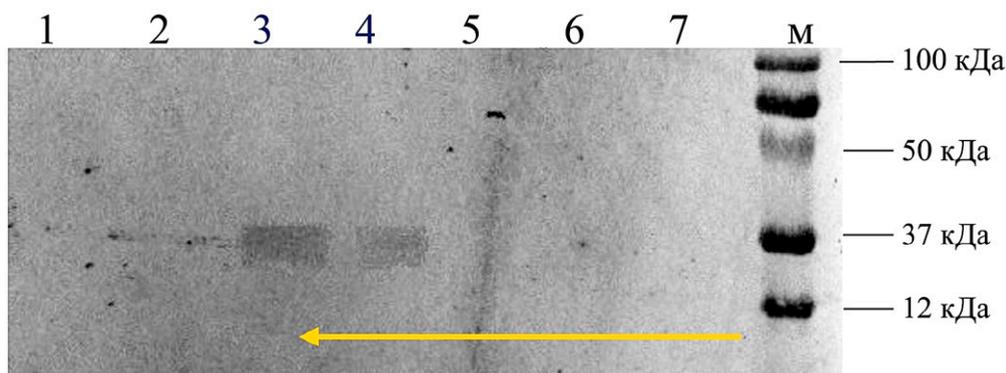


Рис. 2. Вестерн-блот-анализ белка S-100 после электрофоретического разделения в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия сыворотки крови мышей стока CD-1 контрольной и опытной групп. Детектирование белка S-100 проведено с помощью первичных моноклональных мышинных антител против белка S-100 и вторичных моноклональных антител, конъюгированных с пероксидазой, окраска диаминобензидином. 1, 2 – белки сыворотки крови мышей контрольной группы; 3, 4 – белки сыворотки крови мышей, получавших моклобеמיד в дозе 400 мг/кг; 5, 6, 7 – белки сыворотки крови мышей, получавших моклобеמיד в дозе 600 мг/кг; м – маркеры молекулярной массы. Стрелкой указаны следы белка S-100 в олигомерной форме

Таким образом, анализ биохимической картины состояния мышей в опытной группе до паралича задних конечностей показал, что подавление активности MAO-A под действием моклобемида в дозе 400 мг/кг (табл. 1) на фоне агрессивного поведения вызвало изменение содержания кортизола и пролактина в сыворотке крови (табл. 2), снижение активности главных систем детоксикации в печени, а именно CYP 3A4 и 2D6 (табл. 3), а также вызвало секрецию в кровь астроцитарного белка S-100 в двумерной конформации (рис. 1 и 2), что является маркером разрушения центральных астроцитов и ряда иных глиальных клеток [3, 4]. Известно, что белок S-100В в двумерной конформации секретируется астроцитами, пассивно высвобождается из поврежденных и/или некротических клеток. Наличие S-100В в плазме крови выше порогового уровня используется в диагностических/прогностических целях [3, 11].

2.2. Определение кортизола в ткани мозга мышей стока CD-1 с параличом задних конечностей. Для выявления патологических изменений в мозге мышей обоих полов с параличом задних конечностей криосрезы ткани мозга в зоне гиппокампа и коры (рис. 3, а) окрашивали крезильовым фиолетовым и анализировали методом световой микроскопии (рис. 3, б). Стрелками указаны неокрашенные включения.

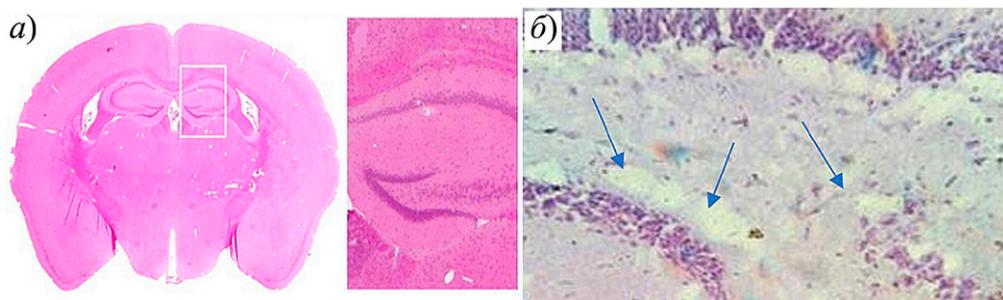


Рис. 3. Область исследования мозга на границе гиппокампа и коры мышей стока CD-1 с параличом задних конечностей: *a* – область мозга мышей CD-1, выбранная для исследования кровеносных капилляров и гранул кортизола; *б* – изображение световой микроскопии выбранной области исследования, краситель – крезильовый фиолетовый. Стрелками указаны включения, не являющиеся миелином или нейронами. Увеличение 400×

На криосрезах зоны гиппокампа и коры мозга мышей, получавших моклобемид в дозе 600 мг/кг и имевших паралич задних конечностей, обнаружено повышенное содержание кортизола независимо от пола (рис. 4, *a* и *б*), что, по нашему мнению, свидетельствует о значительном церебральном стрессе.

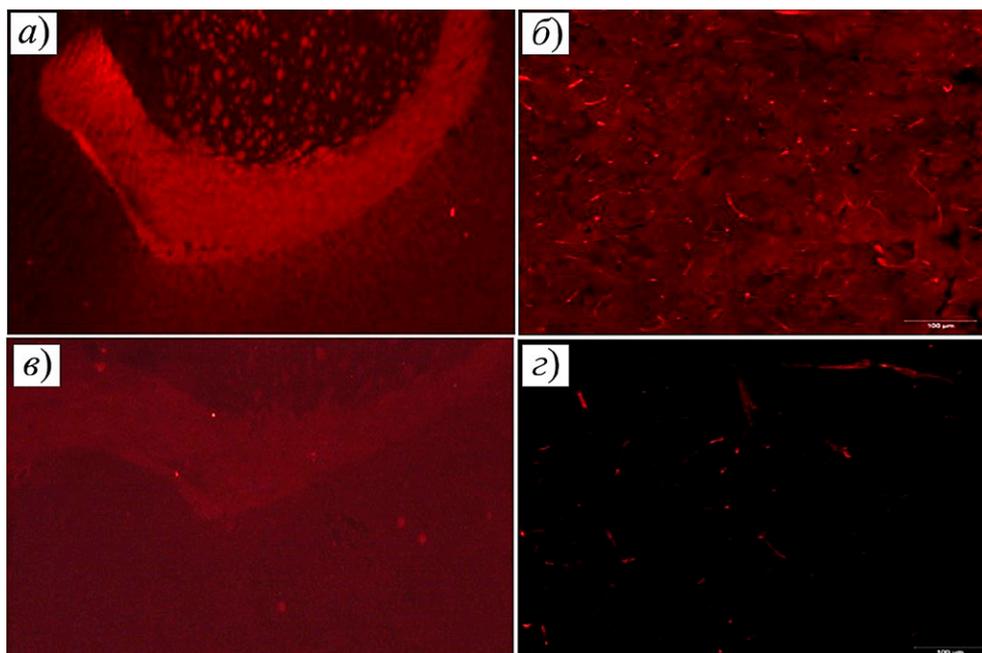


Рис. 4. Микрофотографии криосрезов мозга мышей стока CD-1 с параличом задних конечностей по данным конфокальной лазерной микроскопии: гранулы кортизола на криосрезах в области гиппокампа (*a*) и коры мозга (*б*) мышей опытной группы, получавших моклобемид в дозе 600 мг/кг; срез гиппокампа (*в*) и коры мозга (*г*) мышей, получавших 0.9%-ный NaCl. Увеличение 400×

Следует отметить, что содержание кортизола в сыворотке крови, установленное методом ИФА, отличалось у самцов и самок (табл. 2). Однако в криосрезах центральных областей гиппокампа и коры головного мозга независимо от гендерной принадлежности концентрация кортизола возрастала (рис. 4, *a–г*).

Вместе с тем, как известно, кортизол способствует адаптации к стрессу, повышенные концентрации этого гормона способствуют росту давления в ткани мозга [15] и, возможно, повышают вероятность разрушения астроцитов и нейронов и вероятность секреции астроцитарного белка S-100 (рис. 2).

2.3. Анализ ультратонких срезов мозга мышей. Анализ ультратонких срезов мозга (рис. 3, б) мышей опытной группы показал множественные кровоизлияния, нарушения капилляров и скопления атипичных эритроцитов (рис. 5, а). Подобные эффекты наблюдали ранее у лабораторных мышей и крыс при нарушении метаболизма нейроаминов [8, 10, 12]. Полученные в ходе проведенных исследований данные позволяют связать паралич задних конечностей с церебральным поражением, причиной которого является ингибитор МАО-А моклобемид в высокой дозе, превышающей терапевтические дозы для пациентов. В мозге мышей, получавших физиологический раствор, подобные нарушения целостности капилляров или скопления патологических эритроцитов не наблюдали (рис. 5, б).

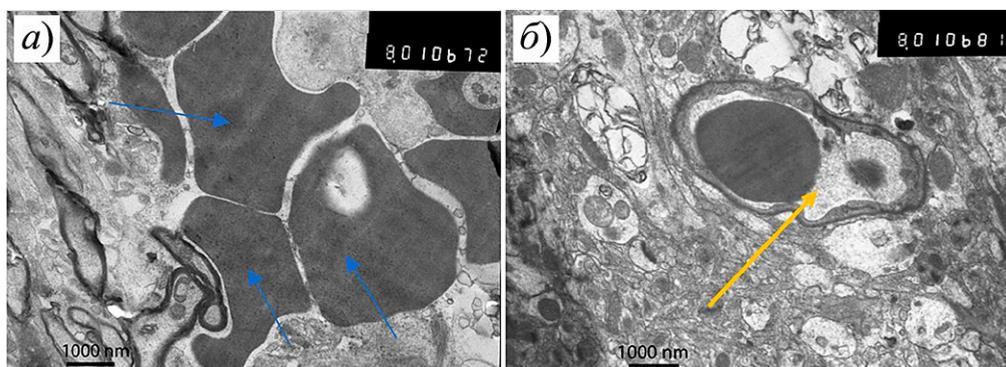


Рис. 5. Микрофотографии ультратонких срезов мозга мышей стока CD-1 с параличом задних конечностей: *а* – типичная картина ультратонкого среза мозга мышей, получавших моклобемид в дозе 600 мг/кг, голубыми стрелками показаны атипичные эритроциты вне кровеносного русла; *б* – типичная картина ультратонкого среза мозга мышей контрольной группы, желтой стрелкой показан кровеносный капилляр, окруженный непрерывной основной пластинкой, которая также покрывает поверхность перицитов, охватывающих эндотелий

Таким образом, проведено исследование патологического процесса на примере модели индуцированного фармакологического паралича задних конечностей у мышей, вызванного моклобемидом.

Заключение Комитета по этике. Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией 2000 г. «О гуманном отношении к животным», Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS N 123), и Директивой Европейского Парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС о защите животных, используемых для научных целей. Протокол исследования одобрен Комиссией по биоэтике Казанского (Приволжского) федерального университета (протокол № 43 от 24.10.2023).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. *Brainin M., Feigin V.L., Norrving B., Martins S.C.O., Hankey G.J., Hachinski V.* Global prevention of stroke and dementia: The WSO Declaration // *Lancet Neurol.* 2020. V. 19, No 6. P. 487–488. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(20\)30141-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30141-1).
2. *Sorci G., Bianchi R., Riuzzi F., Tubaro C., Arcuri C., Giambanco I., Donato R.* S100B protein, a damage-associated molecular pattern protein in the brain and heart, and beyond // *Cardiovasc. Psychiatry Neurol.* 2010. V. 2010. Art. 656481. <https://doi.org/10.1155/2010/656481>.
3. *Ercole A., Thelin E.P., Holst A., Bellander B.M., Nelson D.W.* Kinetic modelling of serum S100B after traumatic brain injury // *BMC Neurol.* 2016. V. 16, No 1. Art. 93. <https://doi.org/10.1186/s12883-016-0614-3>.
4. *Zhao Y., Zhang X., Chen X., Wei Y.* Neuronal injuries in cerebral infarction and ischemic stroke: From mechanisms to treatment // *Int. J. Mol. Med.* 2022. V. 49, No 2. Art. 15. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.5070>.
5. *Фаттахова А.Н.* Лабораторный практикум. Методическое руководство. Казань: Лаборатория оперативной печати Казанского педагогического колледжа, 2013. 30 с.
6. *Kuo J.* Electron microscopy // Walker J.M., Rapley R. (Eds.) *Molecular Biomechanics Handbook. Ser.: Springer Protocols Handbooks.* Totowa, NJ: Humana Press, 2008. P. 975–1008. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-375-6_54.
7. *Chen K., Kardys A., Chen Y., Flink S., Tabakoff B., Shih J.C.* Altered gene expression in early postnatal monoamine oxidase A knockout mice // *Brain Res.* 2017. V. 1669. P. 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.05.017>.
8. *Bortolato M., Godar S.C., Tambaro S., Li F.G., Devoto P., Coba M.P., Chen K., Shih J.C.* Early postnatal inhibition of serotonin synthesis results in long-term reductions of perseverative behaviors, but not aggression, in MAO A-deficient mice // *Neuropharmacology.* 2013. V. 75. P. 223–232. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.07.003>.
9. *Iwaki T., Yamashita T., Haykawa T.* A Color Atlas of Sectional Anatomy of the Mouse. Braintree Sci. Inc., 2001. P. 78.
10. *Zhao H., Yin Y., Lin T., Wang W., Gong L.* Administration of serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors tends to have less ocular surface damage in a chronic stress-induced rat model of depression than selective serotonin reuptake inhibitors // *Exp. Eye Res.* 2023. V. 231. Art. 109486. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2023.109486>.
11. *Суфьянова Г.З., Хлесткина М.С., Шапкин А.Г., Аргунова Г.А.* Концентрация нейроспецифических белков в плазме крови при моделировании фокального ишемического повреждения головного мозга у крыс // *International Scientific Review of the Problems of Modern Science and Education: Proc. LXII Int. Corresp. Sci. Pract. Conf. Boston,* 2019. P. 67–72.
12. *Lairez O., Calise D., Bianchi P., Ordener C., Spreux-Varoquaux O., Guilbeau-Frugier C., Escourrou G., Seif I., Roncalli J., Pizzinat N., Galinier M., Parini A., Mialet-Perez J.* Genetic deletion of MAO-A promotes serotonin-dependent ventricular hypertrophy by pressure overload // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2009. V. 46, No 4. P. 587–595. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.12.017>.
13. *Haduch A., Danek P.J., Kuban W., Pukło R., Alenina N., Gołębiowska J., Popik P., Bader M., Daniel W.A.* Cytochrome P450 2D (CYP2D) enzyme dysfunction associated with aging and serotonin deficiency in the brain and liver of female Dark Agouti rats // *Neurochem. Int.* 2022. V. 152. Art. 105223. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.105223>.
14. *Калинин П.Е., Пшенинников А.С., Зорин П.А., Сучков И.А., Соляник Н.А.* Биохимические показатели церебрального повреждения при операциях на сонных артериях (обзор

литературы) // *Ангиология и сосудистая хирургия*. 2022. Т. 28, № 1. С. 148–153. <https://doi.org/10.33029/1027-6661-2022-28-1-148-153>.

15. *Виноградов Д.Б., Паначев И.В., Бабин К.А.* Изменения уровня кортизола и лабораторных показателей обмена биогенных аминов при алкогольном делирии // *Непрерывное медицинское образование и наука*. 2018. Т. 13. № 4. С. 16–19.

Поступила в редакцию 30.10.2023

Принята к публикации 27.12.2023

Фаттахова Альфия Нурлимановна, кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии Института фундаментальной медицины и биологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: afattakh57@gmail.com

Евтюгин Владимир Геннадьевич, кандидат биологических наук, доцент кафедры зоологии и общей биологии Института фундаментальной медицины и биологии, директор Междисциплинарного центра «Аналитическая микроскопия»

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: vevtugyn@gmail.com

Бущмелева Ксения Николаевна, младший научный сотрудник лаборатории переработки растительного сырья для экологически чистого агрохозяйства

Институт органической и физической химии имени А.Е. Арбузова ФИЦ «Казанский научный центр РАН»

ул. Академика Арбузова, д. 8, г. Казань, 420088, Россия
E-mail: ks.bushmelewa09@yandex.ru

ISSN 2542-064X (Print)

ISSN 2500-218X (Online)

UCHENYE ZAPISKI KAZANSKOGO UNIVERSITETA. SERIYA ESTESTVENNYE NAUKI
(Proceedings of Kazan University. Natural Sciences Series)

2024, vol. 166, no. 2, pp. 283–296

ORIGINAL ARTICLE

doi: 10.26907/2542-064X.2024.2.283-296

Biochemical Characteristics of Pharmacologically Induced Hind Limb Paralysis in CD-1 Mice

A.N. Fattakhova^{a}, V.G. Evtugyn^{a**}, K.N. Bushmeleva^{b***}*

^a*Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia*

^b*Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, FRC Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Kazan, 420088 Russia*

E-mail: *afattakh57@gmail.com, **vevtugyn@gmail.com, ***ks.bushmelewa09@yandex.ru

Received October 30, 2023; Accepted December 27, 2023

Abstract

A model of pharmacological paralysis in the hind limbs of CD-1 mice was introduced. In the initial phase (before paralysis), the activity of MAO-A, a key enzyme of neuroamine metabolism, was inhibited, leading to increased levels of steroid hormones and prolactin, as well as to a decrease in hepatic CYP3A4 and CYP2D6 activities and astrocytic S-100 protein secretion into the blood serum. In the second phase (paralysis manifestation), the mice exhibited hind limb paralysis development, accumulation of cortisol

granules, destruction of capillaries, and aggregation of deformed red blood cells in the cerebral cortex and hippocampal regions.

Keywords: MAO-A, moclobemide, pharmacological paralysis in mice

Institutional Review Board Statement. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (2000) for the humane treatment of research animals, the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (ETS N 123), and the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes. The animal protocol was approved by the Commission on Bioethics of Kazan Federal University (protocol no. 43 dated October 24, 2023).

Conflicts of Interest. The authors declare no conflicts of interest.

Figure Captions

- Fig. 1. Electropherogram of serum proteins in 12% polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate: 1, 2, 3 – serum proteins of control mice; 5, 6 – serum proteins of mice treated with 400 mg/kg moclobemide; 7, 8, 9 – serum proteins of mice treated with 600 mg/kg moclobemide; 4, 10 – molecular weight markers. The arrow indicates the 37 and 12 kDa fractions.
- Fig. 2. Western blot analysis of S-100 protein after electrophoretic separation in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate of control and experimental CD-1 mice serum. Detection of S-100 protein was performed using primary monoclonal mouse antibodies against S-100 protein and secondary monoclonal antibodies conjugated to peroxidase, diaminobenzidine staining. 1, 2 – serum proteins of control mice; 3, 4 – serum proteins of mice treated with 400 mg/kg moclobemide; 5, 6, 7 – serum proteins of mice treated with 600 mg/kg moclobemide; m – molecular weight markers. The arrow indicates S-100 protein traces in the oligomeric form.
- Fig. 3. Region of interest in the brain of CD-1 mice with hind limb paralysis at the hippocampal–cortical interface: *a* – brain region of CD-1 mice selected for studying blood capillaries and cortisol granules; *b* – light microscopy image of the selected brain region, cresyl violet staining. The arrows indicate inclusions that are not myelin or neurons. Magnification 400×.
- Fig. 4. Microphotographs of the brain cryosections from CD-1 mice with hind limb paralysis based on confocal laser microscopy: cortisol granules on the cryosections in the hippocampal (*a*) and cerebral cortex (*b*) regions of experimental mice treated with 600 mg/kg moclobemide; cryosections of the hippocampal (*c*) and cerebral cortex (*d*) regions of mice treated with 0.9% NaCl. Magnification 400×.
- Fig. 5. Microphotographs of the ultrathin sections of the brain of CD-1 mice with hind limb paralysis. *a* – typical picture of an ultrathin section of the brain in mice treated with 600 mg/kg moclobemide, the blue arrows indicate atypical red blood cells outside the bloodstream; *b* – typical picture of an ultrathin section of the brain in control mice, the yellow arrow shows the blood capillary surrounded by a continuous base plate, which also covers the surface of pericytes enclosing the endothelium.

References

1. Brainin M., Feigin V.L., Norrving B., Martins S.C.O., Hankey G.J., Hachinski V. Global prevention of stroke and dementia: The WSO Declaration. *Lancet Neurol.*, 2020, vol. 19, no. 6, pp. 487–488. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(20\)30141-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30141-1).
2. Sorci G., Bianchi R., Riuzzi F., Tubaro C., Arcuri C., Giambanco I., Donato R. S100B protein, a damage-associated molecular pattern protein in the brain and heart, and beyond. *Cardiovasc. Psychiatry Neurol.*, 2010, vol. 2010, art. 656481. <https://doi.org/10.1155/2010/656481>.
3. Ercole A., Thelin E.P., Holst A., Bellander B.M., Nelson D.W. Kinetic modelling of serum S100B after traumatic brain injury. *BMC Neurol.*, 2016, vol. 16, no. 1, art. 93. <https://doi.org/10.1186/s12883-016-0614-3>.
4. Zhao Y., Zhang X., Chen X., Wei Y. Neuronal injuries in cerebral infarction and ischemic stroke: From mechanisms to treatment. *Int. J. Mol. Med.*, 2022, vol. 49, no. 2, art. 15. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.5070>.
5. Fattakhova A.N. *Laboratornyi praktikum. Metodicheskoe rukovodstvo* [A Practical Laboratory Course. Methodological Guide]. Kazan, Lab. Oper. Pechati Kazan. Pedagog. Koll., 2013. 30 p. (In Russian)

6. Kuo J. Electron microscopy. In: Walker J.M., Rapley R. (Eds.) *Molecular Biomechanics Handbook*. Ser.: Springer Protocols Handbooks. Totowa, NJ, Humana Press, 2008, pp. 975–1008. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-375-6_54.
7. Chen K., Kardys A., Chen Y., Flink S., Tabakoff B., Shih J.C. Altered gene expression in early postnatal monoamine oxidase A knockout mice. *Brain Res.*, 2017, vol. 1669, pp. 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.05.017>.
8. Bortolato M., Godar S.C., Tambaro S., Li F.G., Devoto P., Coba M.P., Chen K., Shih J.C. Early postnatal inhibition of serotonin synthesis results in long-term reductions of perseverative behaviors, but not aggression, in MAO A-deficient mice. *Neuropharmacology*, 2013, vol. 75, pp. 223–232. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.07.003>.
9. Iwaki T., Yamashita T., Haykawa T. *A Color Atlas of Sectional Anatomy of the Mouse*. Braintree Sci. Inc., 2001, p. 78.
10. Zhao H., Yin Y., Lin T., Wang W., Gong L. Administration of serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors tends to have less ocular surface damage in a chronic stress-induced rat model of depression than selective serotonin reuptake inhibitors. *Exp. Eye Res.*, 2023, vol. 231, art. 109486. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2023.109486>.
11. Sufianova G.Z., Khlestkina M.S., Shapkin A.G., Argunova G.A. Neurospecific proteins in the blood plasma when modeling focal ischemic brain injury in rats. *International Scientific Review of the Problems of Modern Science and Education: Proc. LXII Int. Corresp. Sci. Pract. Conf.* Boston, 2019, pp. 67–72. (In Russian)
12. Lairez O., Calise D., Bianchi P., Ordener C., Spreux-Varoquaux O., Guilbeau-Frugier C., Escourrou G., Seif I., Roncalli J., Pizzinat N., Galinier M., Parini A., Mialet-Perez J. Genetic deletion of MAO-A promotes serotonin-dependent ventricular hypertrophy by pressure overload. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2009, vol. 46, no. 4, pp. 587–595. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.12.017>.
13. Haduch A., Danek P.J., Kuban W., Puklo R., Alenina N., Golebiowska J., Popik P., Bader M., Daniel W.A. Cytochrome P450 2D (CYP2D) enzyme dysfunction associated with aging and serotonin deficiency in the brain and liver of female Dark Agouti rats. *Neurochem. Int.*, 2022, vol. 152, art. 105223. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.105223>.
14. Kalinin R.E., Pshennikov A.S., Zorin R.A., Suchkov I.A., Solyanik N.A. Biochemical parameters of cerebral lesions in carotid artery surgery (a literature review). *Angiol. Sosudistaya Khir.*, 2022, vol. 28, no. 1, pp. 148–153. <https://doi.org/10.33029/1027-6661-2022-28-1-148-153>. (In Russian)
15. Vinogradov D.B., Panachev I.V., Babin K.A. Changes in the level of cortisol and the laboratory parameters of biogenic amine metabolism in alcoholic delirium. *Nepreryvnoe Med. Obraz. Nauka*, 2018, vol. 13, no. 4, pp. 16–19. (In Russian)

Для цитирования: Фаттахова А.Н., Евтюгин В.Г., Бушмелева К.Н. Биохимическая характеристика индуцированного фармакологического паралича задних конечностей у мышей стока CD-1 // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2024. Т. 166, кн. 2. С. 283–296. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2024.2.283-296>.

For citation: Fattakhova A.N., Evtugyn V.G., Bushmeleva K.N. Biochemical characteristics of pharmacologically induced hind limb paralysis in CD-1 mice. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2024, vol. 166, no. 2, pp. 283–296. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2024.2.283-296>. (In Russian)

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

УДК 577.29+58.01/.07

doi: 10.26907/2542-064X.2024.2.297-311

ВЛИЯНИЕ ГИПЕРТЕРМИИ НА ИЗМЕНЕНИЕ ДЛИНЫ ТЕЛОМЕР РАСТЕНИЙ *Arabidopsis thaliana*

И.А. Агабекян, Д.Ю. Сабаева, Л.Р. Абдулкина

Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

Аннотация

Теломеры – это высококонсервативные нуклеопротеиновые структуры, которые участвуют в защитных процессах эукариотических организмов. Различные биотические и абиотические факторы могут влиять на изменение длины теломер, в том числе и стрессоры окружающей среды. Растения из-за прикрепленного образа жизни чаще всего подвергаются различным экологическим стрессам. В литературе практически отсутствуют данные о влиянии абиотических факторов на изменение длины теломер растений. Поэтому в работе оценено влияние теплового стресса на длину теломер растений *Arabidopsis thaliana*. Измерение длины теломер растений на отдельных хромосомных плечах показало, что гипертермия при 42 °С влияет на длину теломер некоторых хромосомных плеч растений дикого типа *A. thaliana*, а также на некоторые длинные теломеры нокаут-мутанта по гену *OL15/RPL5A*. Показано, что при воздействии высокой температуры на растения происходит укорачивание длины теломер, причем чем длиннее теломеры, тем больше влияние стресса на изменение их длины. Это позволяет предполагать, что сложная регуляция длины теломер может быть связана с воздействием стрессоров окружающей среды.

Ключевые слова: теломеры, *Arabidopsis thaliana*, тепловой шок, гипертермия, *OL15/RPL5A*.

Введение

Теломеры представляют собой эволюционно консервативные нуклеопротеиновые комплексы на физических концах линейных хромосом эукариот и защищают ДНК от ошибочных процессов репарации и рекомбинации, помогают организовывать хромосомы и регулировать экспрессию генов [1]. Теломерная ДНК состоит из множества копий коротких G-богатых повторов: ТТАGGG у позвоночных и ТТТАGGG у большинства растений. Надлежащее исполнение функций зависит от динамического равновесия специализированных белковых структур, собранных вокруг теломерных повторов ДНК (шелтерины) [2]. Важно отметить, что специфичная для теломер структура хроматина зависит от количества единиц тандемных повторов, так что длина теломерной ДНК является решающим фактором, определяющим поддержание и функцию генома [3].

Длина теломер регулируется балансом между удлинением и эрозией теломерной ДНК. Элонгация обычно опосредуется активацией работы специальной обратной транскриптазы, называемой теломеразой, или реже за счет процессов

гомологичной рекомбинации. Между тем эрозия теломер вызывается репликацией концов ДНК, нуклеазами и рекомбиназами.

В соматических клетках некоторых позвоночных экспрессия теломеразы подавляется в конце эмбриогенеза, что приводит к прогрессирующему укорочению длины теломер [4]. Для других организмов характерна экспрессия теломеразы на протяжении всей жизни [5], а длина теломер не снижается с возрастом [6]. У многих беспозвоночных и водных позвоночных постоянная активность теломеразы в соматических тканях может быть связана с их высоким регенеративным потенциалом.

Регуляция длины теломер – это сложный процесс. Ряд исследований показывает, что различные виды стрессовых условий, например, повышенная температура, приводят к укорочению длины теломер животных [7, 8]. В целом регуляция поддержания длины теломер определяется комбинацией генетических, биотических и абиотических факторов, которые влияют на процессы, ответственные за удлинение и укорочение теломер.

Допустимый диапазон длины теломер для каждого вида – строго генетически детерминированный признак. Интересно, что естественная длина теломер сильно различается между видами и внутри них, включая растения [9]. Изучение значений этих вариаций находится на стадии интенсивного исследования, в том числе оценка влияния на особенности жизненного цикла, а также адаптацию, позволяющую справляться с физиологическими и экологическими ограничениями [10–15]. Причинно-следственная связь между короткой длиной теломер, здоровьем и долголетием показана на генетических моделях растений, дрожжей, нематод, рыб-киллифишей, рыбок данио и мышей [16–21].

Экология теломер, исследование динамики длины теломер в экологическом контексте, является новой областью, которая стремится выявить эволюцию в длине теломер как части приспособленности к окружающей среде. Некоторые ранние работы, выполненные на птицах, показали, что выживаемость птиц *Tachycineta bicolor* выше у особей с более длинными теломерами по сравнению с особями с более короткими теломерами [22]. У *Sterna hirundo* длина теломер служит биомаркером репродуктивного успеха [23], а у *Acrocephalus arundinaceus* заражение малярийной инфекцией коррелирует с постепенной деградацией длины теломер, сокращением продолжительности жизни и снижением репродуктивного успеха [24]. Кроме того, в 2021 г. опубликована статья, в которой выявлена обратная зависимость между естественной изначально установленной длиной теломер у генотипов риса, кукурузы и *A. thaliana* и временем цветения, рассматриваемого в качестве ключевого аспекта стратегии жизненного цикла [25]. Несмотря на эти наблюдения, практически отсутствуют данные о взаимодействии между поддержанием длины теломер и приспособленностью организма к изменениям окружающей среды.

Ввиду своего прикрепленного образа жизни растения наиболее часто подвергаются различным экологическим стрессам. Абиотические стрессоры, например, нарушения водного режима, засоленность почв, аноксия, экстремально низкие и высокие температуры, оказывают значительное влияние как на рост и метаболизм растений, так и на биотический стресс, провоцируемый живыми организмами, в том числе бактериями [26].

Согласно данным, абиотический стресс приводит к изменению окислительно-восстановительного статуса клеток, что, в свою очередь, по данным экспериментов, проведенных на животных, способствует уменьшению длины теломер [27]. В литературе практически отсутствуют данные о влиянии абиотических факторов на изменение длины теломер растений. Известно, что такие факторы, как засуха и фосфорное голодание, не изменяют длину теломер растений дикого типа [28]. Однако, согласно результатам исследования [29], температурный стресс способствует изменению экспрессии генов растений, связанных с теломеразной активностью, что может приводить и к уменьшению длины теломер.

В ходе предыдущих исследований установлено, что мутация в гене *OLI5/RPL5A* приводит к уменьшению длины теломер в *A. thaliana* [30]. Этот ген кодирует рибосомный белок L5A, который связывается с 5S рРНК и участвует в его экспорте из ядра в цитоплазму [31]. Кроме того, он играет важную роль в пролиферации клеток органов растений и регуляции их размеров [32]. В настоящей работе проведена оценка влияния теплового шока на растения *Arabidopsis thaliana* дикого типа и мутанта по рибосомному гену *OLI5/RPL5A*, в частности влияния гипертермии на длину теломер растений *A. thaliana* дикого типа с длинными теломерами и мутантных растений с короткими теломерами.

1. Материалы и методы

1.1. Объект исследования, условия роста и культивирования, ПЦР-генотипирование. Семена *A. thaliana* мутантов по гену *OLI5/RPL5A*, обозначенные как *oli5-2* [32], и экотип Columbia дикого типа (Col-0; CS6673) получены из сток-центра коллекции семян ABRC. Семена вернализовали в течение нескольких дней при температуре 4 °С и стерилизовали в 50%-ном растворе гипохлорита натрия с добавлением 0.5% Triton X-100, затем высевали на среду Мурашиге-Скуга (МС), содержащую 50% среды Murashige and Skoog Basal Medium (Sigma-Aldrich, США), 0.5% агара и 1% сахарозы. Растения выращивали в климатической камере Sanyo (Япония) при 22 °С с фотопериодом 16 ч света и 8 ч темноты. Генотипирование проводили с использованием ДНК листьев, как это было описано ранее в работе [33]. Праймеры, используемые для генотипирования и других анализов, представлены в табл. 1.

1.2. Обработка растений тепловым шоком. Растения подвергали гипертермии в термостате Biosan (Латвия) при 37 °С и 42 °С в течение 1 ч на пятый день роста в стерильных условиях на среде МС. Затем чашку возвращали в стандартные условия роста при 22 °С 16/8 ч света/темноты для восстановления. Материал для выделения ДНК и измерения длины теломер отбирали на 3-ий, 18-ый ч роста после обработки теплом и на 7-ой день.

1.3. Анализ длины теломер с помощью амплификации теломерных повторов ПЦР-методом (PETRA). Наличие уникальных субтеломерных последовательностей у *Arabidopsis* позволило измерить длину теломер на отдельных хромосомных плечах. Метод основан на полимеразной цепной реакции, называемой амплификацией повторов теломер с удлинением праймера (PETRA), который требует наличия G-выступа, и позволяет точно определить длину теломер на нескольких концах хромосом из одного растения [34]. Геномную ДНК из от-

дельных растений выделяли стандартным методом с использованием цетилтри-метиламмония бромида [35]. PETRA-анализ включал два этапа: 1) добавление специфической нуклеотидной последовательности PETRA T, комплементарной 3'концу теломер (PETRA T реакция); 2) амплификация теломерной последовательности с использованием олигонуклеотида к субтеломерной области ДНК хромосомы (PETRA A реакция).

Табл. 1

Список олигонуклеотидов для генотипирования

Название исследуемого мутанта	Название олигонуклеотида	Последовательность олигонуклеотида
<i>oli5-2</i>	25520-LP	TGATCTAGTTCATCTTGTAGCAATG
	25520-RP	AGTCACACAATGAATCAGGCC
SALK T-DNA	LB1.3	ATTTTGCCGATTCGGAAC
Праймеры для анализа PETRA	PETRA T	CTCTAGACTGTGAGACTTGGACTACCCTAAACCCT
	PETRA A	CTCTAGACTGTGAGACTTGGACTAC
Специфичные праймеры к субтеломерным хромосомным плечам <i>Arabidopsis</i>	3L	CATAATTCTCACAGCAGCACCGTAGA
	4R	TGGGTGATTGTCATGCTACATGGTA
	5L	AGGTAGAGTGAACCTAACACTTGGGA

PETRA T реакция. Реакционная смесь объемом 20 мкл состояла из 2000 нг ДНК, 10 мМ дезоксирибонуклеотида трифосфата, 10 мМ PETRA-T олигонуклеотида, ExTaq полимеразы (Takara, Япония). Программа амплификации: (65 °C – 5 мин, 55 °C – 1 мин, 72 °C – 10 мин) 1 цикл, 4 °C – ∞.

PETRA A реакция. Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 1 мкл продукта реакции PETRA T, 10 мМ дезоксирибонуклеотида трифосфата, 10 мМ олигонуклеотида PETRA A, 10 мМ олигонуклеотида к определенному плечу хромосомы, полимеразу Dream Taq (ThermoFisher, США).

Для ПЦР-амплификации использовали праймеры к хромосомным плечам 4R, 3L, 5L. Выбор определенных хромосомных плеч обоснован разнородностью в средней длине теломер на этих плечах [34]. Программа амплификации: 96 °C – 4 мин, (94 °C – 30 с, 60 °C – 30 с, 72 °C – 3.5 мин) 16 циклов, 72 °C – 7 мин, 4 °C – ∞.

Далее проводили анализ амплифицированной теломерной ДНК методом Саузерн-блоттинга, как это было описано ранее в работе [36]. Электрофорез полученных ПЦР-продуктов проводили в 1%-ном агарозном геле, которые переносили на нейлоновую мембрану (Amersham TMHybond[®] GE Healthcare, США) и гибридизовали с зондом, меченным на 5'-конце дигоксигенином: 5'-Digoxigenin-[TTTAGGG]4-3'. Теломерные сигналы сканировали с использованием молекулярного транслюминатора Chemidocs XRS+ (Bio-Rad, США) с программным обеспечением Image LabTM (Bio-Rad, США). Данные анализировали с помощью программного обеспечения Quantity One v.4.6.5 (Bio-Rad, США).

2. Результаты

2.1. Оценка изменения длины теломер растений при гипертермии 37 °С.

По данным литературы, температура выше 30 °С негативно влияет на физиологию растений *A. thaliana*. Растения не погибают, однако высокая температура оказывает на них существенный стресс [37]. Для исследования влияния теплового стресса на длину теломер пятидневные проростки растений подвергли гипертермии в течение 1 ч при 37 °С. Семена мутантов *oli5-2*, заказанные в сток-центре семян, изначально содержали аллель Т-ДНК в гомозиготном состоянии. С помощью генотипирования подтверждена гомозиготная аллель во всех исследуемых мутантных растениях. Измерение длины теломер отдельных хромосомных плеч дикого типа и гомозиготных мутантов по Т-ДНК вставке рибосомного гена *OLI5/RPL5A* с помощью анализа РЕТРА проведено через 7 дней после возврата на 22 °С для восстановления от теплового шока.

В результате проведенного анализа установлено, что на хромосомных плечах 3L (рис. 1, а), 5L (рис. 1, б) и 4R (рис. 1, в) длина теломер дикого типа через неделю после гипертермии при 37 °С не изменяется. Подобные результаты наблюдаются у растений *oli5-2*, имеющих меньшую длину теломер, чем у дикого типа [30]. Длина теломер на тех же самых хромосомных плечах у мутантов по гену *OLI5/RPL5A* (рис. 1) через 7 дней после восстановления от гипертермии при 37 °С и без воздействия теплового стресса находится на одном уровне.

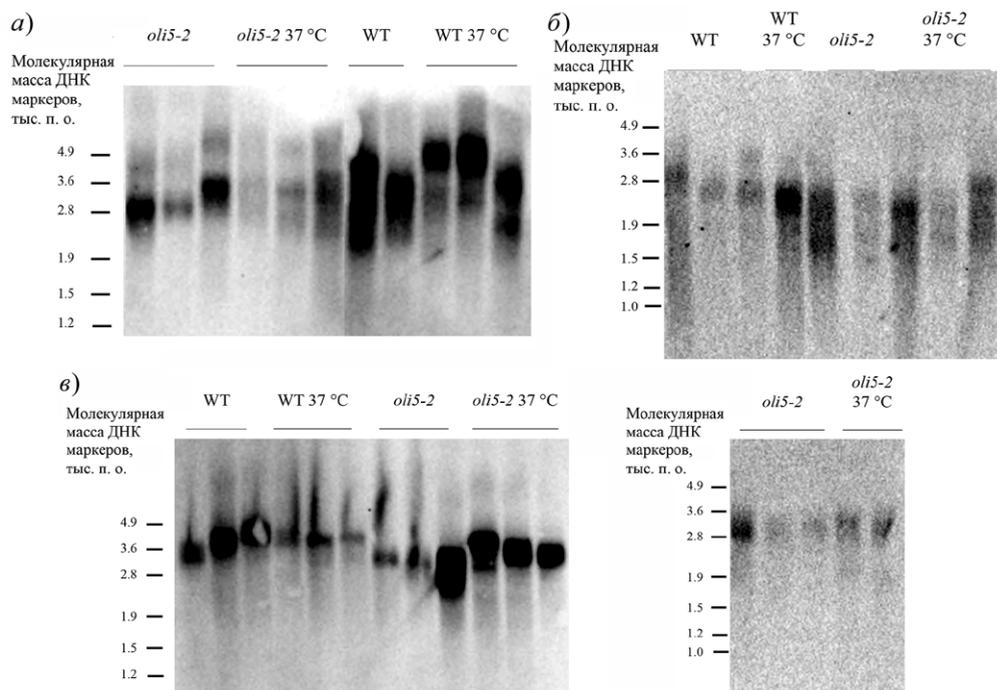


Рис. 1. Саузерн-блот длины теломер растений дикого типа (WT) и гомозиготных мутантов по гену *OLI5/RPL5A* в отсутствие теплового шока и после гипертермии в течение 1 ч при 37 °С. Анализ проводили через 7 дней после гипертермии (WT 37 °С, *oli5-2* 37 °С). Длина теломер левого плеча третьей хромосомы (3L) (а), левого плеча пятой хромосомы (5L) (б) и правого плеча четвертой хромосомы (4R) (в)

2.2. Оценка изменения длины теломер растений при гипертермии 42 °С.

Аналогичные исследования проведены при более высокой температуре окружающей среды, так как, по данным Lee с соавторами [29], эффект изменения длины теломер наблюдается у мутантов по гену *TEN1* через 3 и 18 ч после гипертермии при 42 °С в течение 1 ч. Такое тепловое воздействие рассмотрено на пятидневных проростках растений *A.thaliana* дикого типа (экотипа Columbia) и мутанта по гену *OLIS/RPL5A*. Измерение длины теломер хромосомных плеч 5L и 4R через 3 и 18 ч после возврата растений в нормальные условия роста показывает, что длина теломер на левом плече хромосомы 5 (5L) у дикого типа опускается ниже, чем у растения, которое росло при принятых как контрольные условиях (22 °С) (рис. 2, а). У мутанта по гену *OLIS/RPL5A* длина теломер через 18 ч после восстановления не меняется по сравнению с мутантом *oli5-2*, на который не воздействовали тепловым шоком (рис. 2, а). Вероятно, это связано с тем, что изначально у мутанта *oli5-2* [30] были короткие теломеры и длина на левом плече хромосомы 5 не могла опуститься ниже порогового значения.

Длина теломер на правом плече хромосомы 4 (4R) у дикого типа через 3 ч после восстановления немного уменьшается, но не остается на определенном уровне. Через 18 ч после восстановления длина теломер стабилизируется и становится ниже, чем длина теломер дикого типа растений, не подвергшихся влиянию теплового шока (рис. 2, б). У мутантов по гену *OLIS/RPL5A* на правом плече 4-ой хромосомы (4R) также наблюдается некоторое уменьшение длины теломер при воздействии теплового шока по сравнению с мутантами, которые росли при обычных условиях. Причем через 3 ч происходит едва заметное изменение длины теломер, тогда как через 18 ч наблюдается неоднородное распределение теломер по размерам, половина из которых была ниже длины контрольного мутанта (рис. 2, б).

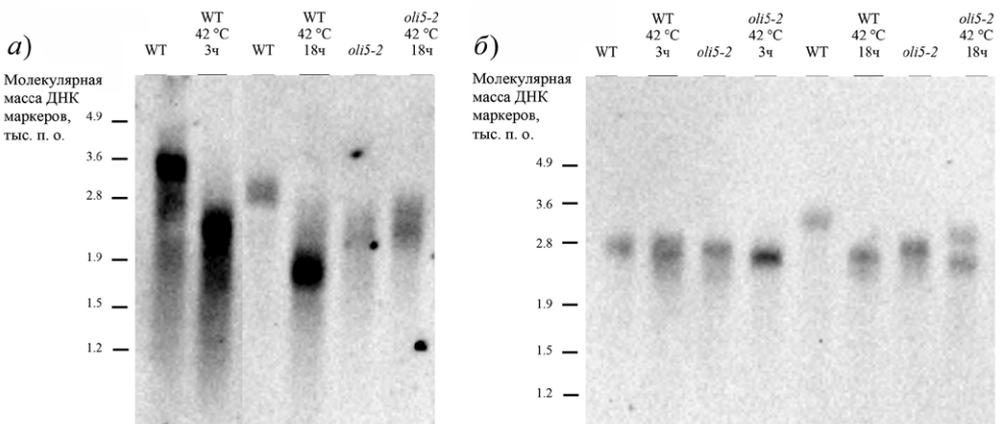


Рис. 2. Саузерн-блот длины теломер растений дикого типа (WT) и гомозиготных мутантов по гену *OLIS/RPL5A* в отсутствие теплового шока и после гипертермии в течение 1 ч при 42 °С. Анализ проводили через 3 и 18 ч после гипертермии (WT 42, *oli5-2* 42). Длина теломер левого плеча пятой хромосомы (5L) (а) и правого плеча четвертой хромосомы (4R) (б)

3. Обсуждение результатов

Теломеры представляют собой довольно динамичную область генома, которая в каждом клеточном цикле колеблется от закрытой конформации до полностью открытой, доступной для репликации [38]. В отличие от исследований на животных [39, 40], у различных экотипов *Arabidopsis* с короткой и средней длиной теломер обнаружено мало доказательств пластичности длины теломер в ответ на условия окружающей среды. Исключением является мутант *ku70* с длинными теломерами, демонстрирующий некоторые доказательства укорочения теломер в ответ на сухую среду при температуре 22 °C [28]. Белок Ku 70/80 участвует как в восстановлении повреждений ДНК, так и в защите теломер [41, 42]. Аномально длинные теломеры у мутантов *Arabidopsis ku70* по своей природе нестабильны и склонны к усечению посредством механизма, подобного быстрой делеции теломер [28, 43]. Резкое укорочение теломер у *Arabidopsis* также зарегистрировано у мутанта по гену *DDM1*, кодирующему фактор ремоделирования нуклеосом, и у мутанта по гену *TEN1*, кодирующему белок теломерного комплекса CST, защищающего концы хромосомы в ответ на воздействие факторов окружающей среды и геномные стрессоры [29, 44].

В настоящем исследовании установлено, что воздействие на растения высокой температурой, равной 37 °C, не приводит к изменению длины теломер растений как дикого типа, так и мутантных по гену *OLI5/RPL5A*. Этот ген кодирует высококонсервативный рибосомный белок L5 [31], участвует в пролиферации клеток и в детерминации формы листьев растений [32], а также является компонентом теломерного пути растений *A. thaliana* [30]. При повышении температуры до 42 °C растения испытывают больший стресс, что заметно сказывается на длине теломер исследуемых линий. Так, длина теломер дикого типа на различных хромосомных плечах заметно уменьшается. Это, вероятно, связано с тем, что дикий тип обладает довольно длинными теломерами – от 2.5 до 5 тыс. п.о. [45] и при воздействии сильного стресса на такие нестабильные структуры, как теломеры, происходит их резекция. Для мутантов *oli5-2* изначально характерна короткая длина теломер (1.8 тыс. п.о.), и при воздействии на них высокой температуры никаких видимых изменений на левом плече 5 хромосомы (5L) не наблюдается. Вероятно, это связано с тем, что отсутствие экспрессии гена *OLI5/RPL5A* негативно сказывается на физиологии растения [32], в том числе и на длине теломер [30], поэтому при гипертермии не наблюдается дополнительный фенотип изменения длины теломер. Тем не менее при исследовании длины теломер правого плеча хромосомы 4 (4R), которое изначально обладает более короткими теломерами по сравнению с 5L [34], обнаружен фенотип изменения их длины у дикого типа (экотип Columbia) и у мутанта по гену *OLI5/RPL5A*, но только через 18 ч после обработки тепловым шоком. Изначально растения дикого типа обладают более длинными теломерами на левом плече пятой хромосомы (5L) по сравнению с другими хромосомными плечами [34]. Можно предположить, что быстрое укорочение длины теломер дикого типа (через 3 ч) связано именно с длинными теломерами. Однако уменьшение длины теломер у мутантов по гену *OLI5/RPL5A* только на хромосоме 4R, вероятно, связано с характерной особенностью мутанта, в частности с тем, что длина теломер 4R плеча без воздействия гипертермии больше, чем 5L плеча. Более длинные теломеры на 4R плече также обнаружены у некоторых

других теломерных мутантов (например, *tert*) [34]. Это позволяет считать, что тепловой шок при 42 °С оказывает влияние на длину теломер растений и способствует быстрому удалению длинных теломер (уже через 3 ч).

Таким образом, укорочение относительно длинных теломер осуществляется намного легче, чем коротких, так как поддержание гомеостаза длины теломер – это энергозатратный процесс [9]. Поскольку геномы растений чувствительны к воздействию окружающей среды, а различные абиотические стрессоры, включая радиацию [46], тяжелые металлы [47] и повышенную температуру [48], и биотические стрессы в виде атаки патогенов [49] увеличивают частоту гомологичной рекомбинации, то можно предполагать, что воздействие высокой температуры оказывает влияние и на теломеры как важнейшие структуры генома эукариот, которые участвуют в защите хромосом.

Заключение

Полученные на растениях *Arabidopsis thaliana* данные показывают, что влияние высокой температуры оказывает значительный эффект на стабильность генома, в частности на длину теломер. Установлено, что гипертермия при 42 °С приводит к резкому уменьшению длины теломер дикого типа и правого плеча четвертой хромосомы (4R) мутанта по рибосомному гену *OLI5/RPL5A*. Для более коротких теломер, вероятно, существуют механизмы, не позволяющие теломерам укорачиваться ниже определенного для этого организма критического порогового значения. Так как поддержание необходимой длины теломер – фундаментальный и эволюционно-консервативный клеточный процесс, напрямую влияющий на пролиферацию клеток и стабильность генома, проведенные исследования подтверждают влияние высокой температуры на этот процесс.

Благодарности. Исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда (проект № 21-14-00147).

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета «Приоритет-2030».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Blackburn E.H., Epel E.S., Lin J. Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection // *Science*. 2015. V. 350, No 6265. P. 1193–1198. <https://doi.org/10.1126/science.aab3389>.
2. Giraud-Panis M.-J., Pisano S., Poulet A., Le Du M.-H., Gilson E. Structural identity of telomeric complexes // *FEBS Lett*. 2010. V. 584, No 17. P. 3785–3799. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.08.004>.
3. Maciejowski J., de Lange T. Telomeres in cancer: Tumour suppression and genome instability // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2017. V. 18, No 3. P. 175–186. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.171>.
4. Bonnell E., Pasquier E., Wellinger R.J. Telomere replication: Solving multiple end replication problems // *Front. Cell Dev. Biol*. 2021. V. 9. Art. 668171. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.668171>.

5. *Gomes N.M., Shay J.W., Wright W.E.* Telomere biology in Metazoa // *FEBS Lett.* 2010. V. 584, No 17. P. 3741–3751. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.07.031>.
6. *Remot F., Ronget V., Froy H., Rey B., Gaillard J.-M., Nussey D.H., Lemaitre J.-F.* Decline in telomere length with increasing age across nonhuman vertebrates: A meta-analysis // *Mol. Ecol.* 2021. V. 31, No 23. P. 5917–5932. <https://doi.org/10.1111/mec.16145>.
7. *Chatelain M., Drobniak S.M., Szulkin M.* The association between stressors and telomeres in non-human vertebrates: A meta-analysis // *Ecol. Lett.* 2020. V. 23, No 2. P. 381–398. <https://doi.org/10.1111/ele.13426>.
8. *Friesen C.R., Wapstra E., Olsson M.* Of telomeres and temperature: Measuring thermal effects on telomeres in ectothermic animals // *Mol. Ecol.* 2022. V. 31, No 23. P. 6069–6086. <https://doi.org/10.1111/mec.16154>.
9. *Shakirov E.V., Chen J.J.-L., Shippen D.E.* Plant telomere biology: The green solution to the end-replication problem // *Plant Cell.* 2022. V. 34, No 7. P. 2492–2504. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac122>.
10. *Monaghan P.* Telomeres and life histories: The long and the short of it // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2010. V. 1206, No 1. P. 130–142. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05705.x>.
11. *Morgan C.C., Mc Cartney A.M., Donoghue M.T.A., Loughran N.B., Spillane C., Teeling E.C., O'Connell M.J.* Molecular adaptation of telomere associated genes in mammals // *BMC Evol. Biol.* 2013. V. 13, No 1. Art. 251. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-251>.
12. *Young A.J.* The role of telomeres in the mechanisms and evolution of life-history trade-offs and ageing // *Philos. Trans. R. Soc., B.* 2018. V. 373, No 1741. Art. 20160452. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0452>.
13. *Saint-Leandre B., Christopher C., Levine M.T.* Adaptive evolution of an essential telomere protein restricts telomeric retrotransposons // *eLife.* 2020. V. 9. Art. e60987. <https://doi.org/10.7554/eLife.60987>.
14. *Augereau A., Mariotti M., Pousse M., Filipponi D., Libert F., Beck B., Gorbunova V., Gilson E., Gladyshev V.N.* Naked mole rat TRF1 safeguards glycolytic capacity and telomere replication under low oxygen // *Sci. Adv.* 2021. V. 7, No 8. Art. eabe0174. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abe0174>.
15. *Reichard M., Giannetti K., Ferreira T., Maouche A., Vrtilek M., Polačik M., Blažek R., Ferreira M.G.* Lifespan and telomere length variation across populations of wild-derived African killifish // *Mol. Ecol.* 2021. V. 31, No 23. P. 5979–5992. <https://doi.org/10.1111/mec.16287>.
16. *Ahmed S., Hodgkin J.* MRT-2 checkpoint protein is required for germline immortality and telomere replication in *C. elegans* // *Nature.* 2000. V. 403, No 6766. P. 159–164. <https://doi.org/10.1038/35003120>.
17. *Watson J.M., Riha K.* Telomeres, aging, and plants: From weeds to Methuselah – a mini-review // *Gerontology.* 2011. V. 57, No 2. P. 129–136. <https://doi.org/10.1159/000310174>.
18. *Kupiec M.* Biology of telomeres: Lessons from budding yeast // *FEMS Microbiol. Rev.* 2014. V. 38, No 2. P. 144–171. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12054>.
19. *Harel I., Benayoun B.A., Machado B., Singh P.P., Hu C.-K., Pech M.F., Valenzano D.R., Zhang E., Sharp S.C., Artandi S.E., Brunet A.* A platform for rapid exploration of aging and diseases in a naturally short-lived vertebrate // *Cell.* 2015. V. 160, No 5. P. 1013–1026. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.038>.
20. *Carneiro M.C., de Castro I.P., Ferreira M.G.* Telomeres in aging and disease: Lessons from zebrafish // *Dis. Models Mech.* 2016. V. 9, No 7. P. 737–748. <https://doi.org/10.1242/dmm.025130>.

21. Folgueras A.R., Freitas-Rodríguez S., Velasco G., López-Otín C. Mouse models to disentangle the hallmarks of human aging // *Circ. Res.* 2018. V. 123, No 7. P. 905–924. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.312204>.
22. Haussmann M.F., Winkler D.W., Vleck C.M. Longer telomeres associated with higher survival in birds // *Biol. Lett.* 2005. V. 1, No 2. P. 212–214. <http://doi.org/10.1098/rsbl.2005.0301>.
23. Bauch C., Becker P.H., Verhulst S. Within the genome, long telomeres are more informative than short telomeres with respect to fitness components in a long-lived seabird // *Mol. Ecol.* 2014. V. 23, No 2. P. 300–310. <https://doi.org/10.1111/mec.12602>.
24. Asghar M., Hasselquist D., Hansson D., Zehntindjiev P., Westerdahl H., Bensch S. Hidden costs of infection: Chronic malaria accelerates telomere degradation and senescence in wild birds // *Science.* 2015. V. 347, No 6220. P. 436–438. <https://doi.org/10.1126/science.126112>.
25. Choi J.Y., Abdulkina L.R., Yin J., Chastukhina I.B., Lovell J.T., Agabekian I.A., Young P.G., Razzaque S., Shippen D.E., Juenger T.E., Shakirov E.V., Purugganan M.D. Natural variation in plant telomere length is associated with flowering time // *Plant Cell.* 2021. V. 33, No 4. P. 1118–1134. <https://doi.org/10.1093/plcell/koab022>.
26. Ghosh D., Xu J. Abiotic stress responses in plant roots: A proteomics perspective // *Front. Plant Sci.* 2014. V. 5. Art. 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00006>.
27. Lin J., Epel E. Stress and telomere shortening: Insights from cellular mechanisms // *Ageing Res Rev.* 2022. V. 73. Art. 101507. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101507>.
28. Campitelli B.E., Razzaque S., Barbero B., Abdulkina L.R., Hall M.H., Shippen D.E., Juenger T.E., Shakirov E.V. Plasticity, pleiotropy and fitness trade-offs in Arabidopsis genotypes with different telomere lengths // *New Phytol.* 2022. V. 233, No 4. P. 1939–1952. <https://doi.org/10.1111/nph.17880>.
29. Lee J.R., Xie X., Yang K., Zhang J., Lee S.Y., Shippen D.E. Dynamic interactions of Arabidopsis TEN1: Stabilizing telomeres in response to heat stress // *Plant Cell.* 2016. V. 28, No 9, P. 2212–2224. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00408>.
30. Abdulkina L.R., Kobayashi C., Lovell J.T., Chastukhina I.B., Aklilu B., Agabekian I.A., Suescún A.V., Valeeva L.R., Nyamsuren C., Aglyamova G.V., Sharipova M.R., Shippen D.E., Juenger T.J., Shakirov E.V. Components of the ribosome biogenesis pathway underlie establishment of telomere length set point in Arabidopsis // *Nature Commun.* 2019. V. 10, No 1. Art. 5479. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13448-z>.
31. Pinon V., Etchells J.P., Rossignol P., Collier S.A., Arroyo J.M., Martienssen R.A., Byrne M.E. Three PIGGYBACK genes that specifically influence leaf patterning encode ribosomal proteins // *Development.* 2008. V. 135, No 7. P. 1315–1324. <https://doi.org/10.1242/dev.016469>.
32. Fujikura U., Horiguchi G., Ponce M.R., Micol J.L., Tsukaya H. Coordination of cell proliferation and cell expansion mediated by ribosome-related processes in the leaves of *Arabidopsis thaliana* // *Plant J.* 2009. V. 59, No 3. P. 499–508. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03886.x>.
33. Chastukhina I.B., Nigmatullina L.R., Valeeva L.R., Shakirov E.V. Selection of efficient Taq DNA polymerase to optimize T-DNA genotyping method for rapid detection of mutant *Arabidopsis thaliana* plants // *BioNanoSci.* 2016. V. 6, No 4. P. 407–410. <https://doi.org/10.1007/s12668-016-0253-6>.
34. Heacock M., Spangler E., Riha K., Puizina J., Shippen D.E. Molecular analysis of telomere fusions in *Arabidopsis*: Multiple pathways for chromosome end-joining // *EMBO J.* 2004. V. 23, No 11. P. 2304–2313. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600236>.

35. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // Focus. 1990. V. 12, No 1. P. 13–15.
36. Nigmatullina L.R., Sharipova M.R., Shakirov E.V. Non-radioactive TRF assay modifications to improve telomeric DNA detection efficiency in plants // BioNanoScience. 2016. V. 6, No 4. P. 325–328. <https://doi.org/10.1007/s12668-016-0223-z>.
37. Chen J., Burke J.J., Velten J., Xin Z. FtsH11 protease plays a critical role in *Arabidopsis* thermotolerance // Plant J. 2006. V. 48, No 1. P. 73–84. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02855.x>.
38. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Molecular Biology of the Cell. 4th ed. New York, NY: Garland Sci., 2002. 1616 p.
39. Haussmann M.F., Marchetto N.M. Telomeres: Linking stress and survival, ecology and evolution // Curr. Zool. 2010. V. 56, No 6. P. 714–727. <https://doi.org/10.1093/czoolo/56.6.714>.
40. Horn T., Robertson B.C., Gemmill N.J. The use of telomere length in ecology and evolutionary biology // Heredity. 2010. V. 105, No 6. P. 497–506. <https://doi.org/10.1038/hdy.2010.113>.
41. Boulton S.J., Jackson S.P. Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* Ku80 homologue: Roles in DNA double strand break rejoining and in telomeric maintenance // Nucleic Acids Res. 1996. V. 24, No 23. P. 4639–4648. <https://doi.org/10.1093/nar/24.23.4639>.
42. Kazda A., Zellinger B., Rössler M., Derboven E., Kusenda B., Riha K. Chromosome end protection by blunt-ended telomeres // Genes Dev. 2012. V. 26, No 15. P. 1703–1713. <https://doi.org/10.1101/gad.194944.112>.
43. Watson J.M., Shippen D.E. Telomere rapid deletion regulates telomere length in *Arabidopsis thaliana* // Mol. Cell. Biol. 2007. V. 27, No 5. P. 1706–1715. <https://doi.org/10.1128/MCB.02059-06>.
44. Xie X., Shippen D.E. DDM1 guards against telomere truncation in *Arabidopsis* // Plant Cell Rep. 2018. V. 37, No 3. P. 501–513. <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2245-6>.
45. Shakirov E.V., Shippen D.E. Length regulation and dynamics of individual telomere tracts in wild-type *Arabidopsis* // Plant Cell. 2004. V. 16, No 8. P. 1959–1967. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.023093>.
46. Lebel E.G., Masson J., Bogucki A., Paszkowski J. Stress-induced intrachromosomal recombination in plant somatic cells // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1993. V. 90, No 2. P. 422–426. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.2.42>.
47. Rahavi M.R., Migicovsky Z., Titov V., Kovalchuk I. Transgenerational adaptation to heavy metal salts in *Arabidopsis* // Front. Plant Sci. 2011. V. 2. Art. 91. <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00091>.
48. Boyko A., Blevins T., Yao Y., Golubov A., Bilichak A., Ilnytskyi Y., Hollunder J., Meins F., Jr., Kovalchuk I. Transgenerational adaptation of *Arabidopsis* to stress requires DNA methylation and the function of Dicer-like proteins // PLoS One. 2010. V. 5, No 3. Art. e9514. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009514>.
49. Kovalchuk I., Kovalchuk O., Kalck V., Boyko V., Filkowski J., Heinlein M., Hohn B. Pathogen-induced systemic plant signal triggers DNA rearrangements // Nature. 2003. V. 423, No 6941. P. 760–762. <https://doi.org/10.1038/nature01683>.

Поступила в редакцию 18.10.2023

Принята к публикации 04.12.2023

Агабекян Инна Андрониковна, младший научный сотрудник НИЛ «Агробиоинженерия», Институт фундаментальной медицины и биологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: agabekian.inna@gmail.com

Сабаева Диана Юрьевна, лаборант НИЛ «Агробиоинженерия», Институт фундаментальной медицины и биологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: diana.sabayeva@yandex.ru

Абдулкина Лилия Ринатовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник НИЛ «Агробиоинженерия», Институт фундаментальной медицины и биологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: nigmatullinalili@mail.ru

ISSN 2542-064X (Print)

ISSN 2500-218X (Online)

UCHENYE ZAPISKI KAZANSKOGO UNIVERSITETA. SERIYA ESTESTVENNYE NAUKI
(Proceedings of Kazan University. Natural Sciences Series)

2024, vol. 166, no. 2, pp. 297–311

ORIGINAL ARTICLE

doi: 10.26907/2542-064X.2024.2.297-311

Effects of Hyperthermia on Telomere Length Changes in *Arabidopsis thaliana* Plants

I.A. Agabekian*, D.Y. Sabaeva**, L.R. Abdulkina***

Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia

E-mail: *agabekian.inna@gmail.com, **diana.sabayeva@yandex.ru, ***nigmatullinalili@mail.ru

Received October 18, 2023; Accepted December 4, 2023

Abstract

Telomeres are highly conserved nucleoprotein structures involved in the defense mechanisms of eukaryotic organisms. Their length depends on a variety of biotic and abiotic factors, such as environmental stressors. Being stationary, plants are particularly susceptible to environmental stresses. This article explores the effects of heat stress on telomere length in *Arabidopsis thaliana*. Telomere length was measured for individual chromosome arms. It was shown that hyperthermia at 42 °C altered telomere length in some chromosome arms of the wild-type *A. thaliana* plants, as well as in the long telomeres of the knockout mutants for the gene *OLI5/RPL5A*. The high temperatures caused the telomeres to become shorter, with the longer telomeres showing a stronger response to the stress. This suggests that the complex regulation of telomere length may be associated with exposure to environmental stressors.

Keywords: telomeres, *Arabidopsis thaliana*, heat shock, hyperthermia, *OLI5/RPL5A*

Acknowledgments: This study was supported by the Russian Science Foundation (project no. 21-14-00147) and the Kazan Federal University Strategic Academic Leadership Program (PRIORITY-2030).

Conflicts of Interest. The authors declare no conflicts of interest.

Figure Captions

Fig. 1. Southern blot of telomere length in the wild-type (WT) plants and homozygous mutants for the gene *OLI5/RPL5A* without heat stress and after hyperthermia for 1 h at 37 °C. The analysis was performed 7 days after the heat exposure (WT 37 °C, *oli5-2* 37 °C). Telomere length for the left arm of chromosome 3 (3L) (a), the left arm of chromosome 5 (5L) (b), and the right arm of chromosome 4 (4R) (c).

Fig. 2. Southern blot of telomere length in the wild-type (WT) plants and homozygous mutants for the gene *OLI5/RPL5A* without heat stress and after hyperthermia for 1 h at 42 °C. The analysis was performed 3 and 18 h after the heat exposure (WT 42 °C, *oli5-2* 42 °C). Telomere length for the left arm of chromosome 5 (5L) (a) and the right arm of chromosome 4 (4R) (b).

References

1. Blackburn E.H., Epel E.S., Lin J. Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection. *Science*, 2015, vol. 350, no. 6265, pp. 1193–1198. <https://doi.org/10.1126/science.aab3389>.
2. Giraud-Panis M.-J., Pisano S., Poulet A., Le Du M.-H., Gilson E. Structural identity of telomeric complexes. *FEBS Lett.*, 2010, vol. 584, no. 17, pp. 3785–3799. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.08.004>.
3. Maciejowski J., de Lange T. Telomeres in cancer: Tumour suppression and genome instability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2017, vol. 18, no. 3, pp. 175–186. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.171>.
4. Bonnell E., Pasquier E., Wellinger R.J. Telomere replication: Solving multiple end replication problems. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2021, vol. 9, art. 668171. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.668171>.
5. Gomes N.M., Shay J.W., Wright W.E. Telomere biology in Metazoa. *FEBS Lett.*, 2010, vol. 584, no. 17, pp. 3741–3751. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.07.031>.
6. Remot F., Ronget V., Froy H., Rey B., Gaillard J.-M., Nussey D.H., Lemaître J.-F. Decline in telomere length with increasing age across nonhuman vertebrates: A meta-analysis. *Mol. Ecol.*, 2021, vol. 31, no. 23, pp. 5917–5932. <https://doi.org/10.1111/mec.16145>.
7. Chatelain M., Drobniak S.M., Szulkin M. The association between stressors and telomeres in non-human vertebrates: A meta-analysis. *Ecol. Lett.*, 2020, vol. 23, no. 2, pp. 381–398. <https://doi.org/10.1111/ele.13426>.
8. Friesen C.R., Wapstra E., Olsson M. Of telomeres and temperature: Measuring thermal effects on telomeres in ectothermic animals. *Mol. Ecol.*, 2022, vol. 31, no. 23, pp. 6069–6086. <https://doi.org/10.1111/mec.16154>.
9. Shakirov E.V., Chen J.J.-L., Shippen D.E. Plant telomere biology: The green solution to the end-replication problem. *Plant Cell*, 2022, vol. 34, no. 7, pp. 2492–2504. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac122>.
10. Monaghan P. Telomeres and life histories: The long and the short of it. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2010, vol. 1206, no. 1, pp. 130–142. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05705.x>.
11. Morgan C.C., Mc Cartney A.M., Donoghue M.T.A., Loughran N.B., Spillane C., Teeling E.C., O’Connell M.J. Molecular adaptation of telomere associated genes in mammals. *BMC Evol. Biol.*, 2013, vol. 13, no. 1, art. 251. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-251>.
12. Young A.J. The role of telomeres in the mechanisms and evolution of life-history trade-offs and ageing. *Philos. Trans. R. Soc., B.*, 2018, vol. 373, no. 1741, art. 20160452. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0452>.
13. Saint-Leandre B., Christopher C., Levine M.T. Adaptive evolution of an essential telomere protein restricts telomeric retrotransposons. *eLife*, 2020, vol. 9, art. e60987. <https://doi.org/10.7554/eLife.60987>.
14. Augereau A., Mariotti M., Pousse M., Filipponi D., Libert F., Beck B., Gorbunova V., Gilson E., Gladyshev V.N. Naked mole rat TRF1 safeguards glycolytic capacity and telomere replication under low oxygen. *Sci. Adv.*, 2021, vol. 7, no. 8, art. eabe0174. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abe0174>.
15. Reichard M., Giannetti K., Ferreira T., Maouche A., Vrtillek M., Polačik M., Blažek R., Ferreira M.G. Lifespan and telomere length variation across populations of wild-derived African killifish. *Mol. Ecol.*, 2021, vol. 31, no. 23, pp. 5979–5992. <https://doi.org/10.1111/mec.16287>.
16. Ahmed S., Hodgkin J. MRT-2 checkpoint protein is required for germline immortality and telomere replication in *C. elegans*. *Nature*, 2000, vol. 403, no. 6766, pp. 159–164. <https://doi.org/10.1038/35003120>.
17. Watson J.M., Riha K. Telomeres, aging, and plants: From weeds to Methuselah – a mini-review. *Gerontology*, 2011, vol. 57, no. 2, pp. 129–136. <https://doi.org/10.1159/000310174>.

18. Kupiec M. Biology of telomeres: Lessons from budding yeast. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2014, vol. 38, no. 2, pp. 144–171. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12054>.
19. Harel I., Benayoun B.A., Machado B., Singh P.P., Hu C.-K., Pech M.F., Valenzano D.R., Zhang E., Sharp S.C., Artandi S.E., Brunet A. A platform for rapid exploration of aging and diseases in a naturally short-lived vertebrate. *Cell*, 2015, vol. 160, no. 5, pp. 1013–1026. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.038>.
20. Carneiro M.C., de Castro I.P., Ferreira M.G. Telomeres in aging and disease: Lessons from zebrafish. *Dis. Models Mech.*, 2016, vol. 9, no. 7, pp. 737–748. <https://doi.org/10.1242/dmm.025130>.
21. Folgueras A.R., Freitas-Rodríguez S., Velasco G., López-Otín C. Mouse models to disentangle the hallmarks of human aging. *Circ. Res.*, 2018, vol. 123, no. 7, pp. 905–924. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.312204>.
22. Haussmann M.F., Winkler D.W., Vleck C.M. Longer telomeres associated with higher survival in birds. *Biol. Lett.*, 2005, vol. 1, no. 2, pp. 212–214. <http://doi.org/10.1098/rsbl.2005.0301>.
23. Bauch C., Becker P.H., Verhulst S. Within the genome, long telomeres are more informative than short telomeres with respect to fitness components in a long-lived seabird. *Mol. Ecol.*, 2014, vol. 23, no. 2, pp. 300–310. <https://doi.org/10.1111/mec.12602>.
24. Asghar M., Hasselquist D., Hansson D., Zehtindjiev P., Westerdahl H., Bensch S. Hidden costs of infection: Chronic malaria accelerates telomere degradation and senescence in wild birds. *Science*, 2015, vol. 347, no. 6220, pp. 436–438. <https://doi.org/10.1126/science.126112>.
25. Choi J.Y., Abdulkina L.R., Yin J., Chastukhina I.B., Lovell J.T., Agabekian I.A., Young P.G., Razzaque S., Shippen D.E., Juenger T.E., Shakirov E.V., Purugganan M.D. Natural variation in plant telomere length is associated with flowering time. *Plant Cell*, 2021, vol. 33, no. 4, pp. 1118–1134. <https://doi.org/10.1093/plcell/koab022>.
26. Ghosh D., Xu J. Abiotic stress responses in plant roots: A proteomics perspective. *Front. Plant Sci.*, 2014, vol. 5, art. 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00006>.
27. Lin J., Epel E. Stress and telomere shortening: Insights from cellular mechanisms. *Ageing Res Rev.*, 2022, vol. 73, art. 101507. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101507>.
28. Campitelli B.E., Razzaque S., Barbero B., Abdulkina L.R., Hall M.H., Shippen D.E., Juenger T.E., Shakirov E.V. Plasticity, pleiotropy and fitness trade-offs in Arabidopsis genotypes with different telomere lengths. *New Phytol.*, 2022, vol. 233, no. 4, pp. 1939–1952. <https://doi.org/10.1111/nph.17880>.
29. Lee J.R., Xie X., Yang K., Zhang J., Lee S.Y., Shippen D.E. Dynamic interactions of Arabidopsis TEN1: Stabilizing telomeres in response to heat stress. *Plant Cell*, 2016, vol. 28, no. 9, pp. 2212–2224. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00408>.
30. Abdulkina L.R., Kobayashi C., Lovell J.T., Chastukhina I.B., Aklilu B., Agabekian I.A., Suescún A.V., Valeeva L.R., Nyamsuren C., Aglyamova G.V., Sharipova M.R., Shippen D.E., Juenger T.J., Shakirov E.V. Components of the ribosome biogenesis pathway underlie establishment of telomere length set point in Arabidopsis. *Nat. Commun.*, 2019, vol. 10, no. 1, art. 5479. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13448-z>.
31. Pinon V., Etchells J.P., Rossignol P., Collier S.A., Arroyo J.M., Martienssen R.A., Byrne M.E. Three *PIGGYBACK* genes that specifically influence leaf patterning encode ribosomal proteins. *Development*, 2008, vol. 135, no. 7, pp. 1315–1324. <https://doi.org/10.1242/dev.016469>.
32. Fujikura U., Horiguchi G., Ponce M.R., Micol J.L., Tsukaya H. Coordination of cell proliferation and cell expansion mediated by ribosome-related processes in the leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 2009, vol. 59, no. 3, pp. 499–508. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03886.x>.
33. Chastukhina I.B., Nigmatullina L.R., Valeeva L.R., Shakirov E.V. Selection of efficient Taq DNA polymerase to optimize T-DNA genotyping method for rapid detection of mutant *Arabidopsis thaliana* plants. *BioNanoScience*, 2016, vol. 6, no. 4, pp. 407–410. <https://doi.org/10.1007/s12668-016-0253-6>.
34. Heacock M., Spangler E., Riha K., Puizina J., Shippen D.E. Molecular analysis of telomere fusions in *Arabidopsis*: Multiple pathways for chromosome end-joining. *EMBO J.*, 2004, vol. 23, no. 11, pp. 2304–2313. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600236>.
35. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 1990, vol. 12, no. 1, pp. 13–15.

36. Nigmatullina L.R., Sharipova M.R., Shakirov E.V. Non-radioactive TRF assay modifications to improve telomeric DNA detection efficiency in plants. *BioNanoScience*, 2016, vol. 6, no. 4, pp. 325–328. <https://doi.org/10.1007/s12668-016-0223-z>.
37. Chen J., Burke J.J., Velten J., Xin Z. FtsH11 protease plays a critical role in Arabidopsis thermotolerance. *Plant J.*, 2006, vol. 48, no. 1, pp. 73–84. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02855.x>.
38. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. New York, NY, Garland Sci., 2002. 1616 p.
39. Haussmann M.F., Marchetto N.M. Telomeres: Linking stress and survival, ecology and evolution. *Curr. Zool.*, 2010, vol. 56, no. 6, pp. 714–727. <https://doi.org/10.1093/czoolo/56.6.714>.
40. Horn T., Robertson B.C., Gemmell N.J. The use of telomere length in ecology and evolutionary biology. *Heredity*, 2010, vol. 105, no. 6, pp. 497–506. <https://doi.org/10.1038/hdy.2010.113>.
41. Boulton S.J., Jackson S.P. Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* Ku80 homologue: Roles in DNA double strand break rejoining and in telomeric maintenance. *Nucleic Acids Res.*, 1996, vol. 24, no. 23, pp. 4639–4648. <https://doi.org/10.1093/nar/24.23.4639>.
42. Kazda A., Zellinger B., Rössler M., Derboven E., Kusenda B., Riha K. Chromosome end protection by blunt-ended telomeres. *Genes Dev.*, 2012, vol. 26, no. 15, pp. 1703–1713. <https://doi.org/10.1101/gad.194944.112>.
43. Watson J.M., Shippen D.E. Telomere rapid deletion regulates telomere length in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Cell. Biol.*, 2007, vol. 27, no. 5, pp. 1706–1715. <https://doi.org/10.1128/MCB.02059-06>.
44. Xie X., Shippen D.E. DDM1 guards against telomere truncation in Arabidopsis. *Plant Cell Rep.*, 2018, vol. 37, no. 3, pp. 501–513. <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2245-6>.
45. Shakirov E.V., Shippen D.E. Length regulation and dynamics of individual telomere tracts in wild-type Arabidopsis. *Plant Cell*, 2004, vol. 16, no. 8, pp. 1959–1967. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.023093>.
46. Lebel E.G., Masson J., Bogucki A., Paszkowski J. Stress-induced intrachromosomal recombination in plant somatic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1993, vol. 90, no. 2, pp. 422–426. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.2.42>.
47. Rahavi M.R., Migicovs Z., Titov V., Kovalchuk I. Transgenerational adaptation to heavy metal salts in Arabidopsis. *Front. Plant Sci.*, 2011, vol. 2, art. 91. <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00091>.
48. Boyko A., Blevins T., Yao Y., Golubov A., Bilchak A., Ilnytskyy Y., Hollunder J., Meins F., Jr., Kovalchuk I. Transgenerational adaptation of *Arabidopsis* to stress requires DNA methylation and the function of Dicer-like proteins. *PLoS One*, 2010, vol. 5, no. 3, art. e9514. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009514>.
49. Kovalchuk I., Kovalchuk O., Kalck V., Boyko V., Filkowski J., Heinlein M., Hohn B. Pathogen-induced systemic plant signal triggers DNA rearrangements. *Nature*, 2003, vol. 423, no. 6941, pp. 760–762. <https://doi.org/10.1038/nature01683>.

⟨ Для цитирования: Агабекян И.А., Сабаяева Д.Ю., Абдулкина Л.Р. Влияние гипертермии на изменение длины теломер растений *Arabidopsis thaliana* // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2024. Т. 166, кн. 2. С. 297–311. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2024.2.297-311>. ⟩

⟨ For citation: Agabekyan I.A., Sabaeva D.Y., Abdulkina L.R. Effects of hyperthermia on telomere length changes in *Arabidopsis thaliana* plants. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennyye Nauki*, 2024, vol. 166, no. 2, pp. 297–311. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2024.2.297-311>. (In Russian) ⟩

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

УДК 574.51+574.587

doi: 10.26907/2542-064X.2024.2.312-323

РЕКОМЕНДАЦИИ К ПРИМЕНЕНИЮ МЕТОДА ЭТАЛОНОВ ДЛЯ БИОИНДИКАЦИОННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ СЕВЕРНОГО КАСПИЯ

Л.В. Дегтярева

Каспийский морской научно-исследовательский центр, г. Астрахань, 414045, Россия

Аннотация

Оценка качества морской среды западной части Северного Каспия методами биоиндикации не проводится, что обусловлено рядом методологических трудностей. В данной работе рассмотрена возможность применения метода эталонов для биоиндикации Северного Каспия при органическом загрязнении. На основе данных о диапазоне глубин в ареалах видов северо-каспийского зообентоса и экологической валентности видов к кислороду проведена дифференциация акватории Северного Каспия по изобатам и выделены диапазоны глубин с достаточным количеством оксифильных видов зообентоса (видов-биоиндикаторов), на которых возможно применение метода эталонов. Установлено, что для оценки качества морской среды Северного Каспия метод эталонов применим при выборе исследуемого и эталонного участков в диапазоне изобат 6–9 м и на глубинах 14–18 м. При этом донные отложения на участках должны быть представлены ракушей, песками и алевритами. На остальной части акватории оценка качества среды методом эталонов будет недостоверной.

Ключевые слова: Северный Каспий, зообентос, биоиндикация, метод эталонов.

Введение

В современный период в условиях активного антропогенного воздействия состояние экосистемы Северного Каспия ухудшается. В частности, наблюдается существенное возрастание и даже превышение предельно допустимых концентраций таких органических загрязняющих веществ, как нефтяные углеводороды, пестициды, фенолы [1–4].

Несмотря на многочисленные исследования органического загрязнения воды и донных отложений Северного Каспия, посвященные отклику биоты на ухудшение качества среды, число работ в этой области крайне мало. Оценка качества морской среды Северного Каспия методами биоиндикации не проводится. Однако под влиянием загрязнения происходит изменение структуры водных биоценозов [5], и биоиндикация позволяет получить полную информацию о последствиях изменения среды для биологических сообществ [6], а также дать комплексную оценку состояния экосистемы [7].

Отсутствие биоиндикационных исследований в Северном Каспии обусловлено рядом методологических трудностей: не составлены классификация северокаспийских видов по экологическим группам и список индикаторных

видов; не определена резистентность многих видов к изменению абиотических факторов среды, не выделены контрольные (эталонные) участки на акватории. Решению последней из вышеперечисленных проблем (выделению эталонных участков) посвящена данная работа. Применение метода эталонов рассмотрено для зообентоса.

Метод эталонов основывается на сравнении видового состава сообщества на исследуемом (загрязненном) и эталонном (чистом) участках [8–9]. Данный метод эффективен при индикации загрязнений [8]. Однако используется он достаточно редко, поскольку требует наличия зон, не затронутых антропогенным воздействием [8, 10, 11]. Сложность в применении метода эталонов для оценки состояния Северного Каспия состоит в том, что распределение северокаспийских бентобионтов и их видовой состав зависят прежде всего от солености [12], которая увеличивается с глубиной водоема [13], а значит, сравниваемые участки (исследуемый и эталонный) должны находиться в одном диапазоне глубин. Цель работы состояла в дифференциации акватории Северного Каспия по глубинам и в оценке возможности применения метода эталонов для биоиндикации.

1. Материалы и методы исследований

Работа выполнена на основе опубликованных данных, в том числе более ранних исследований, выполненных с участием автора [14–20]. Сбор данных охватывал период 2013–2017 гг. Площадь исследуемой акватории лежала в диапазоне глубин 1–29 м.

В расчетах использовали диапазон глубин в ареалах видов и экологическую валентность видов к кислороду. Поскольку низкое содержание органических веществ (включая органические загрязнители) обуславливает высокое содержание кислорода в придонном слое воды [21], то эталонным участком следует считать воды с насыщением кислородом не менее 50%, принятым за «нормальное». [22]. Поэтому в расчеты вошли сведения только об оксифильных видах северокаспийского бентоса, т. е. о видах, которые обитают при насыщении вод кислородом не менее 50%.

Дифференциация исследуемого района по глубинам была проведена по ранее предложенным, в том числе по Каспию, районированиям [23, 24]. Вид-биоиндикатор (в данном случае оксифильный) считался сопряженным, если он присутствовал на каждой глубине с шагом 1 м внутри выбранного диапазона глубин. Степень сопряженности индикатора с объектом индикации считалась достоверной, если доля сопряженных биоиндикаторов превышала 75% от бентобионтов, присутствующих во всем диапазоне глубин [25].

В работе проанализированы все оксифильные бентобионты Северного Каспия, кроме двух представителей семейства Gammaridae (*Gammarus behningi* (Mart.) и *Pontogammarus abbreviatus* (Sars G.O., 1894)), экстремальные глубины в ареале которых неизвестны.

2. Результаты и их обсуждение

Акватория Северного Каспия до 3-метровой изобаты является областью влияния стока р. Волга, трансформации речных вод (с соленостью < 2‰), высокого содержания взвешенных веществ при максимальной скорости их осажде-

ния [13]. Донные отложения представлены алевритами, песчаными алевритами, алевропелитами, алевритовыми песками с небольшим содержанием ракуши и ракушечного детрита. После падения уровня моря в этой области наблюдается усиление зарастания макрофитами [26].

До 3-метровой изобаты в диапазоне относительного содержания кислорода более 50%, принятом за эталонный, зообентос представлен 15 таксонами. Из них ареалы 11 таксонов (*Oligochaeta*; *Nematodes*; *Archaeobdella esmonti* (Grimm, 1876); *Paramysis intermedia* (Czerniavsky, 1882); *Paramysis lacustris* (Czerniavsky, 1882); *Paramysis ullskyi* (Czerniavsky, 1882); *Limnomysis benedeni* (Czerniavsky, 1882); *Pterocuma pectinatum* (Sowinsky, 1893); *Stenocuma tenuicauda*; *Adacna vitrea* (Eichwald, 1829) и *Didacna protracta* (Eichwald, 1829)) не покрывают весь выделенный диапазон глубин. И только 4 вида (*Echinogammarus warpachowskyi* (G.O. Sars, 1894); *Stenogammarus compressus* (G.O. Sars, 1894); *Niphargoides deminutus* (Stebbing, 1906) и *Niphargoides corpulentus* (Sars, 1895)) встречаются в каждом интервале глубин с шагом 1 м. Таким образом, процент общих для всего диапазона (сопряженных) таксонов составил 27 (табл. 1), что делает невозможным применение метода эталонов для исследований в этой части моря.

Табл. 1

Количество таксонов северокаспийского зообентоса по глубинам

Диапазон глубин, м	Количество таксонов	Количество сопряженных таксонов	Доля сопряженных таксонов, %
0–3 м	15	4	27
3–6 м	28	12	43
6–9 м	22	19	86
9–14 м	27	16	59
14–18 м	23	20	87
18–28 м	21	15	71

Свал глубин (3–6 м) – зона смешения соленых и пресных вод. В этой области расположена «иловая пробка» – область максимального содержания взвеси. Под воздействием электролитов соленых вод на свале глубин происходит активная коагуляция взвешенных веществ. Грунты здесь представлены преимущественно илами с высоким уровнем накопления органического вещества [27, 28].

В эталонном интервале относительного содержания кислорода между изобатами 3 и 6 м общее число оксифильных таксонов увеличилось до 28. В сообществе бентобионтов присутствуют все упомянутые 15 таксонов участка, расположенного до 3-метровой изобаты. Кроме того, сообщество пополняется 13 видами: *Manayunkia caspica* (Annenkova, 1929); *Gmelinopsis tuberculata* (G.O. Sars, 1896); *Paramysis (Metamysis) loxolepsis* (G.O. Sars); *Pseudocuma (Stenocuma) gracilis* (Sars, 1893); *Caspicocuma campylaspoides* (Sars, 1897); *Chelicorophium chelicorne* (G.O. Sars, 1895); *Chelicorophium mucronatum* (G.O. Sars, 1895); *Pseudocuma laevis* (Sars, 1894); *Chelicorophium curvispinum* (G.O. Sars, 1895); *Chelicorophium nobile* (G.O. Sars, 1895); *Niphargogammarus quadrimanus* (G.O. Sars, 1895); *Niphargogammarus aequimanus* (G.O. Sars, 1895)

и *Didacna trigonoides* (Pallas, 1771). В этой области 12 сопряженных таксонов: 4 сопряженных вида для диапазона глубин 0–3 м, а также *Oligochaeta*; *Nematodes*; *P. lacustris*; *P. pectinatum*; *S. tenuicauda*; *A. vitrea*; *D. protracta* и *A. esmonti*. Низкий процент сопряженных видов (табл. 1) указывает на невозможность использования метода эталонов для оценки качества морской среды в этой области.

За линией свала глубин, между изобатами 6 и 9 м, наблюдается активизация процессов флокуляции и сорбции [23]. Донные отложения преимущественно представлены ракушей [29].

На участке с относительным содержанием кислорода более 50% выявлено 22 оксифильных таксона. Из пула бентобионтов, обживающих глубины 3–6 м, исчезают 6 видов: *P. intermedia*; *L. benedeni*; *P. ullskyi*; *P. loxolepsis*; *C. campylaspoides*; *P. laevis*. Кроме *P. lacustris*; *A. esmonti* и *G. tuberculata*, остальные 19 являются сопряженными. Высокий процент сопряженных видов (табл. 1) обеспечивает надежность применения метода эталонов. Однако следует иметь в виду, что не все из сопряженных видов эвритопны. Олигохеты предпочитают песчаный грунт, тогда как *E. warpachowskyi*, *S. compressus*, *N. corpulentus*, *N. quadrimanus*, *C. curvispinum*, *C. chelicorne*, *C. mucronatum* и *D. protracta* – заиленный грунт [30–32]. Поэтому на участках развития илистых донных отложений доля сопряженных видов, из числа которых исключается 1 таксон, снижается с 86 до 82%. Таким образом, результат оценки является удовлетворительным. А на участках, где донные отложения представлены песками, из числа сопряженных бентобионтов исключаются 8 видов. Доля сопряженных таксонов снижается до 59%, что делает результаты оценки качества морской среды методом эталонов сомнительными.

Акватория в диапазоне глубин 9–14 м – биологическая часть маргинального фильтра. Здесь наблюдается высокая вариабельность показателей солености, интенсивное накопление органического вещества и карбонатов в донных отложениях [23, 33]. Гранулометрический состав грунтов, подстилающих эту область, разнообразен [34].

Число оксифильных таксонов, обитающих на этих глубинах, составляет 27. В этом диапазоне глубин не встречены *P. lacustris*, *A. esmonti* и *G. tuberculata*. Однако сообщество бентобионтов пополняется новыми видами: *Fabricia sabella ssp. caspica*; *Chelicorophium robustum* (G.O. Sars, 1895); *Niphargoides derzhavini* (Pjatakova, 1962); *Monodacna semipellucida* (Logvinenko & Starobogatov, 1967); *Theodoxus pallasi* Lindholm, 1924; *Didacna pyramidata* (Grimm); *Pseudocuma cercarioides* (Sars, 1894) и *Corophium spinolosum* (G.O. Sars). В этом диапазоне глубин только 16 видов являются сопряженными: *Oligochaeta*; *Nematodes*; *P. pectinatum*; *S. tenuicauda*; *S. compressus*; *N. deminutus*; *N. corpulentus*; *A. vitrea*; *D. protracta*; *P. gracilis*; *C. chelicorne*; *C. mucronatum*; *C. curvispinum*; *C. nobile*; *N. quadrimanus*; *N. aequimanus*. Доля сопряженных видов составляет 59%, что исключает надежность применения метода эталонов для исследований на этом участке моря.

Акватория Северного Каспия, расположенная на глубинах 14–18 м, характеризуется высокой интенсивностью продукционных процессов при слабом развитии деструкции [35]. В этой части акватории наиболее устойчивый солевой режим и происходит снижение содержания органического вещества в донных отложениях за счет разбавляющего влияния минерального материала [36].

Число оксифильных таксонов в этой части моря – 23. Видовой состав тот же, что и в диапазоне глубин 9–14 м, за исключением *E. warpachowskyi*; *M. caspica*; *D. trigonoides*; *F. sabella*. Кроме трех видов (*S. tenuicauda*; *A. vitrea*; *P. gracilis*), остальные 21 – сопряженные. Доля сопряженных видов составила 83%, что указывает на возможную применимость метода эталонов в исследованиях в этом районе. Вместе с тем следует учесть, что не все из сопряженных видов эвритопны. Олигохеты предпочитают песчаный грунт, *S. compressus*, *N. corpulentus*, *N. quadrimanus*, *C. curvispinum*, *C. chelicorne*, *C. mucronatum*, *D. protracta*, *C. robustum* и *N. derzhavini* – заиленный грунт, а *P. cercarioides* – ил [30–32]. Соответственно, на участках развития илистых донных отложений доля сопряженных видов, из числа которых исключается 1 таксон, снижается с 87 до 83%, что считается удовлетворительным. А на участках, где донные отложения представлены песками, из числа сопряженных гидробионтов исключаются 10 видов. Доля сопряженных таксонов снижается до 43%, что делает результаты оценки качества морской среды методом эталонов сомнительными.

Область за изобатой 18 м является зоной водообмена между северной и средней частью моря со сложным режимом течений. На западе преобладает перенос вод из Северного Каспия в Средний Каспий и подток морских вод на север в придонном слое, на востоке – поступление среднекаспийских вод в северную часть моря. Акватория характеризуется пониженным содержанием взвешенных и минеральных биогенных веществ. Наиболее распространенными типами донных отложений в этом районе являются разнoзернистый песок и ракуша. На отдельных участках встречаются оолиты [13, 37].

На участках с эталонным содержанием кислорода число таксонов составляет 21. Видовой состав тот же, что и на глубинах 14–18 м, за исключением *S. tenuicauda*; *A. vitrea*; *P. gracilis*. Также появляется новый вид *Pterocuma rostratum* (Sars, 1894). Кроме 6 видов (*D. Protracta*; *C. Curvispinum*; *M. semipellucida*; *T. Pallasii*; *D. pyramidata* и *P. rostratum*), остальные 15 являются сопряженными. Низкий процент сопряженных видов (табл. 1) свидетельствует о сомнительности применения метода эталонов для исследований в данном интервале глубин.

Таким образом, для оценки качества морской среды Северного Каспия метод эталонов по отношению к зообентосу применим при выборе исследуемого и эталонного участков в диапазоне изобат 6–9 м и на глубинах 14–18 м. Донные отложения на обоих участках должны быть представлены ракушей, песками и алевритами.

Заключение

Учитывая неоднородное распределение бентосных организмов по акватории Северного Каспия, оценка состояния морской среды методом эталонов осложняется необходимостью выбора диапазона глубин, в котором присутствовало бы достаточное количество видов-биоиндикаторов. В работе показано, что применительно к органическому загрязнению, когда видами-биоиндикаторами являются оксифильные виды бентоса, метод эталонов может использоваться на глубинах 6–9 м и 14–18 м при развитии ракушечных и алевритовых донных отложений. На остальной части акватории следует использовать другие методы биоиндикации.

Следует отметить, что оценку сравниваемых участков следует проводить синхронно, поскольку северокаспийский бентос испытывает сезонные вариации [38]. Кроме того, отсутствующее в настоящее время определение северокаспийских олигохет и нематод по видам должно поспособствовать уточнению оценки методом эталонов. Также необходимо учитывать, что наблюдающиеся изменения уровня Каспийского моря [39] могут повлечь за собой изменение пространственного распределения солёности северо-каспийских вод и, как следствие, экстремальных глубин ареала многих видов бентоса.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. *Гурбанпур Ш.Б.* Экологические проблемы Каспийского моря // Молодой ученый. 2010. Т. 1, № 5 (16). С. 128–131.
2. *Карыгина Н.В.* О содержании, распределении и генезисе углеводов в водах Северного Каспия // Проблемы сохранения экосистемы Каспия в условиях освоения нефтегазовых месторождений: материалы VII научно-практической конференции с международным участием (Астрахань, 18 октября 2019 г.). Астрахань: Изд-во КаспНИРХа, 2019. С. 83–88.
3. *Островская Е.В., Умриха А.В.* Нефтяное загрязнение северо-западной части Каспийского моря: современное состояние и основные источники // Труды ГОИН. 2019. № 220. С. 209–220.
4. *Карыгина Н.В., Попова Э.С., Львова О.А., Галлей Е.В., Яцун Е.В.* О нефтяном и пестицидном загрязнении низовьев Волги и северной части Каспийского моря // Экология и природопользование: материалы международной научно-практической конференции (Магас, 21–23 октября 2020 г.). Назрань: ООО «КЕП», 2020. С. 250–257.
5. *Ермолаева Н.И.* К вопросу о биоиндикации нефтяного загрязнения пресноводных лимнических экосистем с использованием зоопланктона на примере озера Самотлор (ХМАО) // Водные ресурсы. 2022. Т. 49, № 1. С. 77–90. <https://doi.org/10.31857/S0321059622010060>.
6. *Туровцев В.Д., Краснов В.С.* Биоиндикация: учебное пособие. Тверь: Тверской государственный университет, 2004. 260 с.
7. *Зенин А.А., Белоусова Н.В.* Гидрохимический словарь. Л.: Гидрометеиздат, 1988. 240 с.
8. *Ляшенко О.А.* Биоиндикация и биотестирование в охране окружающей среды: учебное пособие. СПб.: ГТУРП, 2012. 67 с.
9. *Герасимов Ю.Л.* Санитарная и техническая гидробиология: учебное пособие. Самара: Самарский университет, 2014. 48 с.
10. *Максимов В.Н.* Об одном способе оценки качества природных вод // Самоочищение и биоиндикация природных вод / под ред. М.М. Телитченко. М.: Наука, 1980. С. 212–219.
11. *Максимов В.Н., Ганьшина Л.А., Абакумов В.А.* Оценка качества воды в реке по видовому составу фитопланктона // Известия АН СССР. Серия биологическая. 1983. № 5. С. 731–743.
12. Каспийское море. Фауна и биологическая продуктивность / под ред. Е.А. Яблонской. М.: Наука, 1985. 276 с.
13. Каспийское море. Гидрология и гидрохимия. М.: Наука, 1986. 262 с.

14. Дегтярева Л.В., Даурова Д.С., Кострыкина Т.А., Письменная О.А., Кашин Д.В. Экологическая валентность к кислороду северокаспийских мизид и кузовых ракообразных // Вестник Астраханского государственного технического университета. Серия: Рыбное хозяйство. 2019. № 4. С. 32–41. <https://doi.org/10.24143/2073-5529-2019-4-32-41>.
15. Дегтярева Л.В., Кострыкина Т.А., Даурова Д.С., Кашин Д.В., Письменная О.А., Петренко Е.Л. Отношение кольчатых и круглых червей к кислороду в западной части Северного Каспия // Вестник Астраханского государственного технического университета. Серия: Рыбное хозяйство. 2019. № 1. С. 20–27. <https://doi.org/10.24143/2073-5529-2019-1-20-27>.
16. Дегтярева Л.В., Кострыкина Т.А., Кашин Д.В. Отношение организмов семейства Gammaridae к содержанию кислорода в придонном слое воды в Северном Каспии // Вестник Астраханского государственного технического университета. Серия: Рыбное хозяйство. 2020. № 1. С. 61–67. <https://doi.org/10.24143/2073-5529-2020-1-61-67>.
17. Дегтярева Л.В., Лардыгина Е.Г., Кашин Д.В., Кострыкина Т.А. Формирование сообщества северокаспийских моллюсков в зависимости от абиотических факторов среды // Биологическое разнообразие: изучение, сохранение, восстановление, рациональное использование: материалы II международной научно-практической конференции (Керчь, 27–30 мая 2020 г.). Симферополь: Ариал, 2020. С. 303–309.
18. Кашин Д.В., Дегтярева Л.В., Кострыкина Т.А. Экологическая валентность северокаспийских моллюсков к кислороду // Вестник Астраханского государственного технического университета. Серия Рыбное хозяйство. 2022. № 4. С. 29–38. <https://doi.org/10.24143/2073-5529-2022-4-29-38>.
19. Кашин Д.В., Зайцев В.Ф., Дегтярева Л.В., Даурова Д.С., Кострыкина Т.А. Толерантность северокаспийских корофид к кислороду как адаптация к газообмену // Каспий: прошлое, будущее, настоящее: сборник научных статей. Астрахань: Астраханский университет, 2021. С. 27–30.
20. Copilaș-Ciocianu D., Sidorov D. Taxonomic, ecological and morphological diversity of Ponto-Caspian gammaroidean amphipods: A review // Org. Divers. Evol. 2022. V. 22, No 2. P. 285–315. <https://doi.org/10.1007/s13127-021-00536-6>.
21. Плотников И.С. Многолетние изменения фауны свободноживущих водных беспозвоночных Аральского моря. СПб.: ЗИН РАН, 2016. 168 с.
22. Берникова Т.А., Демидова А.Г. Гидрология и гидрохимия. М.: Пищевая промышленность, 1977. 312 с.
23. Лисицын А.П. Маргинальный фильтр океанов // Океанология. 1994. Т. 34, № 5. С. 735–747.
24. Катунин Д.Н., Хрипунов И.А., Кашин Д.В., Дулимов А.Б. Продукционно-деструкционные процессы фитопланктона в Северном Каспии // Рыбохозяйственные исследования на Каспии. Результаты НИР за 2000 г. Астрахань: Изд-во КаспНИРХа, 2001. С. 39–51.
25. Мелехова О.П., Егорова Е.И., Евсеева Т.И. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование: учебное пособие. М.: Академия, 2007. 288 с.
26. Митина Н.Н., Малашенков Б.М., Телитченко Л.А. Подводные ландшафты Северного Каспия: структура, гидроэкология, охрана. М.: ИВП РАН; Типография Россельхозакадемии, 2016. 215 с.
27. Хрипунов И.А. Некоторые процессы осадкообразования в Северном Каспии, связанные с зарегулированием стока рек // Геолого-морфологические исследования Каспийского моря / под ред. Г.В. Воропаева, Л.И. Лебедева, О.К. Леонтьева. М.: Наука, 1983. С. 117–126.

28. *Немировская И.А., Бреховских В.Ф.* Генезис углеводородов во взвеси и в донных осадках северного шельфа Каспийского моря // *Океанология*. 2008. Т. 48, № 1. С. 48–58.
29. *Пахомова А.С.* К осадкообразованию в северной части Каспийского моря // *Труды ГОИН*. 1956. Вып. 31 (43). С. 80–106.
30. Атлас беспозвоночных Каспийского моря / под ред. Я.А. Бирштейна, Л.Г. Виноградовой, Н.Н. Кондакова, М.С. Кун, Т.В. Астаховой, Н.Н. Романовой. М.: Пищевая промышленность, 1968. 414 с.
31. *Сокольский А.Ф., Курашова Е.К., Степанова Т.Г.* Атлас основных кормовых организмов рыб Нижней Волги и Каспийского моря. Астрахань: Изд-во КаспНИРХа, 2002. 394 с.
32. *Батурина М.А., Лоскутова О.А.* Олигохеты некоторых пресных водоемов Арктики // *Журнал Сибирского федерального университета. Биология*. 2010. Т. 3, № 2. С. 177–198.
33. *Карыгина Н.В., Дегтярева Л.В., Лардыгина Е.В.* Накопление органических соединений в донных отложениях маргинального фильтра Каспийского моря // *Проблемы сохранения экосистемы Каспия в условиях освоения нефтегазовых месторождений: материалы V международной научно-практической конференции (Астрахань, 26–27 сентября 2013 г.)*. Астрахань: Изд-во КаспНИРХа, 2013. С. 100–103.
34. *Хрипунов И.А., Катунин Д.Н., Азаренко А.В.* Многолетние изменения гранулометрического состава и пространственного распределения донных отложений Северного Каспия // *Водные ресурсы*. 2010. Т. 37, № 6. С. 709–716.
35. *Катунин Д.Н.* Гидроэкологические основы формирования экосистемных процессов в Каспийском море и дельте реки Волги. Астрахань: Изд-во КаспНИРХа, 2014. 478 с.
36. *Романкевич Е.А.* Геохимия органического вещества в океане. М.: Наука, 1977. 256 с.
37. *Холодов В.Н., Хрусталеv Ю.П., Лубченко И.Ю., Ковалев В.В., Туровский Д.С.* Каспийское море: проблемы седиментогенеза. М.: Наука, 1989. 184 с.
38. *Асаева К.И., Войнова М.В.* Сезонные и многолетние изменения пространственного распределения численности планктона и зообентоса в западной части Северного Каспия // *Проблемы региональной экологии, экономики и географии: материалы I международной научно-практической конференции (Астрахань, 28 марта 2018 г.)*. Астрахань: АГТУ, 2018. С. 47–56.
39. *Болгов М.В.* Колебания уровня Каспийского моря: история исследований и методы прогнозирования // *Изменение климата в регионе Каспийского моря: материалы международной научно-практической конференции (Астрахань, 27–28 октября 2021 г.)*. Астрахань: ИП Сорокин Р.В., 2022. С. 107–111.

Поступила в редакцию 11.12.2023

Принята к публикации 17.03.2024

Дегтярева Лариса Вячеславна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник
ФГБУ «Каспийский морской научно-исследовательский центр»
ул. Ширяева, д. 14, г. Астрахань, 414045, Россия
E-mail: kaspmniz@mail.ru

ORIGINAL ARTICLE

doi: 10.26907/2542-064X.2024.2.312-323

**Recommendations for Using the Method of Standards
in Bioindication Studies of the Northern Caspian Sea**

L.V. Degtyareva

Caspian Marine Scientific Research Center, Astrakhan, 414045 Russia

E-mail: kaspmniz@mail.ru

Received December 11, 2023; Accepted March 17, 2024

Abstract

Despite the increasing water and sediment pollution in the western part of the Northern Caspian Sea, the quality of its marine environment has never been assessed through bioindication, largely due to methodological issues. In this article, the method of standards, which involves comparing the species composition between the polluted and clean (reference) sites, was used for the bioindication of organic pollutants in the Northern Caspian Sea. The study area was segmented based on isobaths. The segments were determined depending on the range of depths inhabited by zoobenthos species and their ecological valence to oxygen. The depths with a sufficient abundance of oxyphilic zooplankton species (bioindicators) to apply the method of standards were located. The obtained results show that the method of standards is a good and reliable choice to assess the marine environment quality in the Northern Caspian Sea at isobaths of 6–9 m and within depths of 14–18 m for polluted and reference sites. However, the sediments must contain shells, sand, and siltstones. Therefore, while the method of standards has clear merits, it does not suffice for the rest of the Caspian Sea area.

Keywords: Northern Caspian Sea, zoobenthos, bioindication, method of standards

Conflicts of Interest. The author declares no conflicts of interest.

References

1. Gurbanpur Sh.B. Ecological problems of the Caspian Sea. *Molodoi Uch.*, 2010, vol. 1, no. 5 (16), pp. 128–131. (In Russian)
2. Karygina N.V. On the content, distribution, and genesis of hydrocarbons in the Northern Caspian Sea. *Problemy sokhraneniya ekosistemy Kaspiya v usloviyakh osvoeniya neftegazovykh mestorozhdenii: materialy VII nauchno-prakticheskoi konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem (Astrakhan', 18 oktyabrya 2019 g.)* [Problems of the Caspian Ecosystem Conservation under the Conditions of Oil and Gas Field Development: Proc. VII Sci.-Pract. Conf. with Int. Participation (Astrakhan, Oct. 18, 2019)]. Astrakhan, Izd. KaspNIRKha, 2019, pp. 83–88. (In Russian)
3. Ostrovskaya E.V., Umrikha A.V. Oil pollution in the northwestern part of the Caspian Sea: Current state and major sources. *Tr. GOIN*, 2019, no. 220, pp. 209–220. (In Russian)
4. Karygina N.V., Popova E.S., L'vova O.A., Gallei E.V., Yatsun E.V. Oil and pesticide pollution of the Lower Volga River and the northern part of the Caspian Sea. *Ekologiya i prirodopol'zovanie: materialy mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii (Magas, 21–23 oktyabrya 2020 g.)* [Ecology and Nature Management: Proc. Int. Sci.-Pract. Conf. (Magas, Oct. 21–23, 2020)]. Nazran, OOO “KEP”, 2020, pp. 250–257. (In Russian)
5. Ermolaeva N.I. To the problem of bioindication of oil pollution of freshwater limnic ecosystems using zooplankton on the example of Lake Samotlor (KhMAO). *Water Resour.*, 2022, vol. 49, no. 1, pp. 109–121. <https://doi.org/10.1134/S0097807822010067>.

6. Turovtsev V.D., Krasnov V.S. *Bioindikatsiya: uchebnoe posobie* [Bioindication: A Study Guide]. Tver, Tver. Gos. Univ., 2004. 260 p. (In Russian)
7. Zenin A.A., Belousova N.V. *Gidrokhimicheskii slovar'* [Hydrochemical Dictionary]. Leningrad, Gidrometeoizdat, 1988. 240 p. (In Russian)
8. Lyashenko O.A. *Bioindikatsiya i biotestirovanie v okhrane okruzhayushchei sredy: uchebnoe posobie* [Bioindication and Biotesting in Nature Conservation: A Study Guide]. St. Petersburg, GTURP, 2012. 67 p. (In Russian)
9. Gerasimov Yu.L. *Sanitarnaya i tekhnicheskaya gidrobiologiya: uchebnoe posobie* [Sanitary Hydrology and Hydrological Engineering: A Study Guide]. Samara, Samar. Univ., 2014. 48 p. (In Russian)
10. Maksimov V.N. A method for natural water quality assessment. In: Telitchenko M.M. (Ed.) *Samoochishchenie i bioindikatsiya prirodnikh vod* [Self-Purification and Bioindication of Natural Waters]. Moscow, Nauka, 1980, pp. 212–219. (In Russian)
11. Maksimov V.N., Gan'shina L.A., Abakumov V.A. Evaluation of river water quality according to the species composition of the phytoplankton. *Biol. Bull. Acad. Sci. USSR*, 1983, vol. 10, no. 4. pp. 426–436.
12. *Kaspiiskoe more. Fauna i biologicheskaya produktivnost'* [Caspian Sea. Fauna and Biological Productivity]. Yablonskaya E.A. (Ed.). Moscow, Nauka, 1985. 276 p. (In Russian)
13. *Kaspiiskoe more. Gidrologiya i gidrokimiya* [Caspian Sea. Hydrology and Hydrochemistry]. Moscow, Nauka, 1986. 262 p. (In Russian)
14. Degtyareva L.V., Dairova D.S., Kostrykina T.A., Pismennaya O.A., Kashin D.V. Ecological valency to oxygen in mysids and cumaceans. *Vestn. Astrakh. Gos. Tekh. Univ. Ser.: Rybn. Khoz.*, 2019, no. 4, pp. 32–41. <https://doi.org/10.24143/2073-5529-2019-4-32-41>. (In Russian)
15. Degtyareva L.V., Kostrykina T.A., Dairova D.S., Kashin D.V., Pismennaya O.A., Petrenko E.L. Dependence of segmented and round worms on oxygen in the western part of the Northern Caspian Sea. *Vestn. Astrakh. Gos. Tekh. Univ. Ser.: Rybn. Khoz.*, 2019, no. 1, pp. 20–27. <https://doi.org/10.24143/2073-5529-2019-1-20-27>. (In Russian)
16. Degtyareva L.V., Kostrykina T.A., Kashin D.V. Reaction of Gammaridae to oxygen contained in the bottom layer of the North Caspian Sea. *Vestn. Astrakh. Gos. Tekh. Univ. Ser.: Rybn. Khoz.*, 2020, no. 1, pp. 61–67. <https://doi.org/10.24143/2073-5529-2020-1-61-67>. (In Russian)
17. Degtyareva L.V., Lardygina E.G., Kashin D.V., Kostrykina T.A. The impact of abiotic environmental factors on the development of the Northern Caspian mollusk community. *Biologicheskoe raznoobrazie: izuchenie, sokhranenie, vosstanovlenie, ratsional'noe ispol'zovanie: materaily II mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii (Kerch, 27–30 maya 2020 g.)* [Biological Diversity: Study, Conservation, Restoration, and Sustainable Use: Proc. II Int. Sci.-Pract. Conf. (Kerch, May 27–30, 2020)]. Simferopol, Arial, 2020, pp. 303–309. (In Russian)
18. Kashin D.V., Degtyareva L.V., Kostrykina T.A. Ecological valence of the Northern Caspian mollusks to oxygen. *Vestn. Astrakh. Gos. Tekh. Univ. Ser.: Rybn. Khoz.*, 2022, no. 4. pp. 29–38. <https://doi.org/10.24143/2073-5529-2022-4-29-38>. (In Russian)
19. Kashin D.V., Zaitsev V.F., Degtyareva L.V., Dairova D.S., Kostrykina T.A. Oxygen tolerance of corophiids from the Northern Caspian Sea as an adaptation to gas exchange. In: *Kaspii: proshloe, budushchee, nastoyashchee: sbornik nauchnykh statei* [Caspian Sea: Past, Future, and Present: A Collection of Articles]. Astrakhan, Astrakh. Univ., 2021, pp. 27–30. (In Russian)
20. Copilaş-Ciocianu D., Sidorov D. Taxonomic, ecological and morphological diversity of Ponto-Caspian gammaroidean amphipods: A review. *Org. Diversity Evol.*, 2022, vol. 22, no. 2, pp. 285–315. <https://doi.org/10.1007/s13127-021-00536-6>.
21. Plotnikov I.S. *Mnogoletnie izmeneniya fauny svobodnozhivushchikh vodnykh bespozvonochnykh Aral'skogo morya* [Long-Term Changes in the Fauna of Free-Living Aquatic Invertebrates of the Aral Sea]. St. Petersburg, ZIN Ross. Akad. Nauk, 2016. 168 p. (In Russian)
22. Bernikova T.A., Demidova A.G. *Gidrologiya i gidrokimiya* [Hydrology and Hydrochemistry]. Moscow, Pishch. Prom-st', 1977. 312 p. (In Russian)

23. Lisitzin A.P. Marginal filter in the oceans. *Oceanology*, 1995, vol. 34, no. 5, pp. 671–682.
24. Katunin D.N., Khripunov I.A., Kashin D.V., Dulimov A.B. Production and destruction processes of phytoplankton in the Northern Caspian Sea. In: *Rybokhozyaistvennyye issledovaniya na Kaspii. Rezul'taty NIR za 2000 g.* [Fish Surveys in the Caspian Sea. RD Findings for 2000]. Astrakhan, Izd. KaspNIRKha, 2001. pp. 39–51. (In Russian)
25. Melekhova O.P., Egorova E.I., Evseeva T.I. *Biologicheskii kontrol' okruzhayushchei sredy: bioindikatsiya i biotestirovanie: uchenoe posobie* [Biological Environmental Control: Bioindication and Biotesting: A Study Guide]. Moscow, Akademiya, 2007. 288 p. (In Russian)
26. Mitina N.N., Malashenkov B.M., Telitchenko L.A. *Podvodnye landshafty Severnogo Kaspiya: struktura, gidroekologiya, okhrana* [Underwater Landscapes of the North Caspian Sea: Structure, Hydroecology, and Conservation]. Moscow, IVP Ross. Akad. Nauk, Tip. Rossel'khozakad., 2016. 215 p. (In Russian)
27. Khripunov I.A. Some sediment formation processes in the North Caspian Sea associated with river runoff regulation. In: *Geologo-morfologicheskie issledovaniya Kaspiiskogo morya* [Studies on the Geology and Geomorphology of the Caspian Sea]. Voropaev G.V., Lebedev L.I., Leont'ev O.K. (Eds.). Moscow, Nauka, 1983, pp. 117–122. (In Russian)
28. Nemirovskaya I.A., Brekhovskikh V.F. Origin of hydrocarbons in the particulate matter and bottom sediments of the northern shelf of the Caspian Sea. *Oceanology*, 2008, vol. 48, no. 1, pp. 43–53. <https://doi.org/10.1134/S0001437008010062>.
29. Pakhomova A.S. Sedimentation in the northern part of the Caspian Sea. *Trudy GOIN*, 1956, no. 31 (43), pp. 80–106. (In Russian)
30. *Atlas bespozvonochnykh Kaspiiskogo morya* [Atlas of the Caspian Sea Invertebrates]. Birshtein Ya.A., Vinogradova L.G., Kondakov N.N., Kun M.S., Astakhova T.V., Romanova N.N. (Eds.). Moscow, Pishch. Prom-st', 1968. 414 p. (In Russian)
31. Sokol'skii A.F., Kurashova E.K., Stepanova T.G. *Atlas osnovnykh kormovykh organizmov ryb Nizhnei Volgi i Kaspiiskogo morya* [Atlas of Main Food Organisms for Fishes in the Lower Volga River and the Caspian Sea]. Astrakhan, Izd. KaspNIRKha, 2002. 394 p. (In Russian)
32. Baturina M.A., Loskutova O.A. Oligochaeta of some Arctic freshwater ecosystems. *Zh. Sib. Fed. Univ. Biol.*, 2010, vol. 3, no 2, pp. 177–198. (In Russian)
33. Karygina N.V., Degtyareva L.V., Lardygina E.V. Accumulation of organic compounds in the bottom sediments of the Caspian Sea marginal filter. *Problemy sokhraneniya ekosistemy Kaspiya v usloviyakh osvoeniya neftegazovykh mestorozhdenii: materialy V mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii (Astrakhan', 26–27 sentyabrya 2013 g.)* [Problems of the Caspian Sea Ecosystem Conservation under the Conditions of Oil and Gas Fields Development (Astrakhan, Sept. 26–27, 2013)]. Astrakhan, Izd. KaspNIRKha, 2013, pp. 100–103. (In Russian)
34. Khripunov I.A., Katunin D.N., Azarenko A.V. Long-term variations in the granulometric composition and spatial distribution of bottom sediments in the Northern Caspian Sea. *Water Resour.*, 2010, vol. 37, no. 6, pp. 834–841. <https://doi.org/10.1134/S0097807810060096>.
35. Katunin D.N. *Gidroekologicheskie osnovy formirovaniya ekosistemnykh protsessov v Kaspiiskom more i del'ye reki Volgi* [Hydroecological Principles of the Formation of Ecosystem Processes in the Caspian Sea and the Volga Delta]. Astrakhan, Izd. KaspNIRKha, 2014. 478 p. (In Russian)
36. Romankevich E.A. *Geokhimiya organicheskogo veshchestva v okeane* [Geochemistry of Organic Matter in Ocean]. Moscow, Nauka, 1977. 256 p. (In Russian)
37. Kholodov V.N. *Kaspiiskoe more. Problemy sedimentogeneza* [The Caspian Sea. Problems of Lithogenesis]. Moscow, Nauka, 1989. 184 p. (In Russian)
38. Asaeva K.I., Voinova M.V. Seasonal and long-term changes in the spatial distribution of plankton and zoobenthos abundance in the western part of the North Caspian Sea. *Problemy regional'noi ekologii, ekonomiki i geografii: materialy I mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii (Astrakhan', 28 marta 2018 g.)* [Problems of Regional Ecology, Economics, and Geography: Proc. I Int. Sci.-Pract. Conf. (Astrakhan, Mar. 28, 2018)]. Astrakhan, AGTU, 2018, pp. 47–56. (In Russian)

39. Bolgov M.V. Caspian Sea level fluctuations: A history of studies and methods of predictions. *Izmeneniye klimata v regione Kaspiiskogo morya: materialy mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii (Astrakhan', 27–28 oktyabrya 2021 g.)* [Climate Change in the Caspian Sea Region: Proc. Int. Sci.-Pract. Conf. (Astrakhan, Oct. 27–28, 2021)]. Astrakhan, IP Sorokin R.V., 2022, pp. 107–111. (In Russian)

Для цитирования: Дегтярева Л.В. Рекомендации к применению метода эталонов для биоиндикационных исследований Северного Каспия // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2024. Т. 166, кн. 2. С. 312–323. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2024.2.312-323>.

For citation: Degtyareva L.V. Recommendations for using the method of standards in bioindication studies of the Northern Caspian Sea. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2024, vol. 166, no. 2, pp. 312–323. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2024.2.312-323>. (In Russian)

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

УДК 631.41+551.1/4

doi: 10.26907/2542-064X.2024.2.324-341

ДИАГНОСТИКА КИСЛЫХ СУЛЬФАТНЫХ ПОЧВ В УГЛЕДОБЫВАЮЩЕМ РАЙОНЕ В ТАЕЖНОЙ ЗОНЕ

Н.В. Митракова, Е.А. Меньшикова, Е.А. Хайрулина, Н.В. Порошина
Пермский государственный национальный исследовательский университет,
г. Пермь, 614068, Россия

Аннотация

Процессы окисления и гидролиза минералов в извлеченных на поверхность породах в горнодобывающих районах приводят к возникновению техногенных почв. Их диагностика опирается на комплекс анализов, часто трудоемких и дорогостоящих. Для сульфатных почв Кизеловского угольного бассейна (Пермский край) применен метод определения pH после разложения пероксидом водорода. Изучены почвы на участках влияния стоков с породных отвалов, самоизливов и водосбросов шахтных вод. Результаты показали наличие горизонтов, где pH после обработки H_2O_2 (pH- H_2O_2) ниже 2.5, что свидетельствует о наличии сульфидов. Кроме того, для почв характерно превышение в десятки-сотни раз содержания подвижных форм серы и железа, валовой серы, а также сульфатов относительно фона. Рентгенофазовый анализ показал наличие гётита и ярозита в исследованных почвах, что также подтверждает эффективность применения метода определения pH- H_2O_2 для экспресс-диагностики кислых сульфатных почв в горнодобывающих районах.

Ключевые слова: Кизеловский угольный бассейн, уголь, кислые сульфатные почвы, кислотность, гётит, ярозит.

Введение

Добыча угля – мощный фактор трансформации почвенного покрова [1]. Основные негативные эффекты от добычи угля связаны с загрязнением атмосферного воздуха, поверхностных вод и почв, интенсификацией эрозии и снижением биоразнообразия. Породы угольных отвалов подвергаются выветриванию, что приводит к высвобождению и активной миграции тяжелых металлов и токсичных элементов [2–4] и образованию кислых шахтных вод [5, 6]. Воздействие кислых шахтных вод на почвы в горнодобывающих районах приводит к их химической и физической трансформации [7, 8] и, как следствие, образованию кислых сульфатных почв.

Задачи диагностики и характеристики почв в районах с поступлением в окружающую среду кислых шахтных дренажей остро стоят на горнодобывающих территориях, особенно на месторождениях пирита [9], золота [10], меди, свинца [11] и угля [12, 13].

Для горнодобывающих районов России, вскрышные породы которых характеризуются высоким содержанием серы, существует проблема диагностики

техногенных почв, образованных в результате влияния кислых шахтных дренажей. Так, в Пермском крае воздействие кислых шахтных вод на почвы приурочено к территории Кизеловского угольного бассейна (КУБ). Он расположен в западной части Пермского края, его площадь составляет 1500 км². Шахты были ликвидированы в конце XX – начале XXI вв. В настоящее время наибольшее воздействие на окружающую среду (поверхностные водные объекты и почвы) оказывают кислые шахтные воды [8, 14, 15]. Их распространение связано с самоизливами из шурфов, скважин и штолен закрытых шахт, а также с образующимися стоками с породных отвалов. Кислые шахтные воды образуются в результате окисления в аэробных условиях сульфидных минералов и серы, которыми богаты угленосные породы [16, 17]. Шахтные воды имеют сильно кислую реакцию, обогащены ионами Fe, Al, Mn, Be, Li, B, V, Cu, Cr, Zn, As и Ni, при этом содержание ионов Fe, Al, Mn, Be в сотни раз превышает предельно допустимые концентрации [6, 15]. В результате воздействия кислых шахтных вод на почвы происходит их закисление и загрязнение. Почвы, в свою очередь, являются источником загрязнения поверхностных вод за счет миграции веществ от элювиальных ландшафтов, на которых расположены отвалы, к аккумулятивным.

Природные кислые сульфатные почвы распространены в прибрежных районах морей и лагун, они образуются под воздействием высокоминерализованных вод на пойменные почвы, богатые органическим материалом [18–20]. При анаэробизации в почвах происходит замещение кислорода другими элементами, в частности, сульфат, распространенный в морской воде, восстанавливается до сульфида, железо при этом восстанавливается до Fe²⁺ [21]. В результате этих процессов в почвенных горизонтах образуются сульфиды железа. Пирит является наиболее распространенным сульфидом железа в мире. В кислых сульфатных почвах также обнаружены такие вторичные минералы, как швертманнит (Fe³⁺₁₆(OH₂SO₄)₁₂₋₁₃O₁₆ · 10–12H₂O) и ярозит (KFe³⁺₃(SO₄)₂(OH)₆) [22–24]. Выветривание сульфидных и сульфатных минералов способствует снижению рН водной вытяжки из почвы (рН-H₂O) до значений 2.5–3.0, что приводит к высокой токсичности почвы.

В литературе [18, 25, 26] предложены способы диагностики кислых сульфатных почв. В настоящее время основной метод заключается в определении их кислотности после окисления сульфидных минералов (главным образом пирита (FeS₂)) пероксидом водорода [18, 26]. Однако некоторые исследования показывают, что этот метод не является окончательным для диагностики кислых сульфатных почв. Дополнительно или самостоятельно применяется метод инкубации, основанный на выдерживании почвы на воздухе в течение определенного периода времени. При этом в почве протекают реакции окисления сульфидов бактериями с образованием кислоты [18]. Инкубация проводится в два этапа до снижения рН водной вытяжки почвы ниже 4.5 [27, 28]. Сравнительно недавно разработан метод определения кислотности ультракислых почв спектрофотометрическим методом с бромкрезоловым зеленым, который апробирован на гиперсульфидных почвах южной Австралии [29]. Метод показал высокую корреляцию ($r > 0.99$) с рН-метрией в кислых средах.

Метод определения рН после обработки почв пероксидом водорода использован для исследования почв на побережьях и техногенных почв. Для почв на территории угольных, медных и золотодобывающих месторождений этот способ ранее не применялся.

1. Объекты и методы исследования

1.1. Территория и объекты исследования. Территория исследований приурочена к Уральской геохимической провинции, к области остаточных горных массивов западного склона Среднего Урала в Пермском Предуралье. Климат здесь континентальный, почвенный покров представлен в основном дерново-подзолистыми почвами. Физико-географическая характеристика Кизеловского угольного бассейна подробно приведена в работе [6].

В качестве объектов исследования рассмотрены:

- почва участка водосброса шахтных вод – дерново-подзолистая, погребенная под техногенным слоем (ДП);
- рекультивированная почва участка водосброса шахтных вод – технозем (Т);
- почвы участков стоков с угольных отвалов – серогумусовая химически-преобразованная (СГХ), серогумусовая техногенно-трансформированная (СГТ);
- почва участка самоизлива шахтных вод – серогумусовая техногенно-трансформированная оглеенная (СГ).

Сформировавшиеся техногенные почвы, или почвогрунты, образованы из природных в результате долговременного воздействия шахтных вод, т. е. основным фактором почвообразования является техногенез. В качестве фоновых отобраны серогумусовые и дерново-подзолистые почвы. Проанализировано 75 почвенных проб, из них 13 проб – фоновых. География исследования включает территории Кизеловского, Губахинского и Гремячинского районов Пермского края, изучен также почвенный покров шахт Усьва-3, Центральная, Нагорная, 40 лет Октября, Гореловская, Северная.

1.2. Методы исследования. Актуальную и потенциальную кислотность определяли потенциометрическим методом [30], гидролитическую кислотность (ГК) – методом Каппена (в 1 М CH_3COONa вытяжке), основанным на титровании 1 н щелочью в присутствии фенолфталеина [30], обменную кислотность (ОК) – по методу Соколова, основанному на обработке почвы раствором 1 М KCl с последующим титрованием щелочью для обнаружения суммы обменных алюминия и водорода [31]. Обменный алюминий определяли спектрофотометрически в виде комплекса с ксиленоловым оранжевым согласно методике [32]. Содержание подвижного железа устанавливали спектрофотометрически по реакции с *o*-фенантролином [33]. Сульфат-ионы определяли в водной вытяжке почвы [34], а подвижную серу – после извлечения сульфат-ионов 1 М раствором KCl (в солевой вытяжке) [35]. Для определения валовой серы проводили кислотное разложение навески почвы смесью хлорной и азотной кислот согласно [36]. Для установления содержания сульфат-ионов в вышеперечисленных вытяжках использовали турбидиметрический метод с хлоридом бария в присутствии стабилизатора – глицерина [36].

Рентгенофазовый анализ образцов проводили на рентгеновском порошковом дифрактометре D2 Phaser (“Bruker”, Германия) с излучением CuK_α ($\lambda = 1.54060 \text{ \AA}$), генератором с напряжением 30 кВ и силой тока 10 мА и линейным детектором

LYNXEYE. Порошковую пробу помещали в кювету и регистрировали дифрактограмму при следующих условиях: расходящаяся щель 0.6 мм, первичная и вторичная щели Соллера 2.5°, диапазон углов 2θ от 5 до 70°, экспозиция 1.0 с в точке, шаг сканирования 0.03°. Обработка кривых (сглаживание, поиск пиков) и качественный анализ выполняли с помощью программного пакета Diffrac.Eva. Для поиска минеральных фаз использовали базу данных порошковой дифрактометрии PDF-2.

Количественный анализ валового состава пробы выполняли с помощью программного обеспечения Toras 4.2, которое реализует безэталонный анализ на основе метода Ритвельда – процедуры минимизации отклонения между экспериментальной и теоретически рассчитанной дифрактограммами. Сумму минеральных фаз рассчитывали по отношению к 100%.

Определение кислотности почв после обработки пероксидом водорода проводили для оценки окисления сульфидных минералов, присутствующих в отвалах и стоках с них. Согласно работе [37], предварительный предел $pH-H_2O_2$ для опасных кислых сульфатных почв после обработки пероксидом водорода составляет 2.5. Для потенциометрического определения pH после обработки почвы 30%-ным пероксидом водорода использовали иономер рХ-150 МИ (НПО «Измерительная техника», Россия) в сочетании с комбинированным стеклянным электродом ЭСК-10603/7 (НПО «Измерительная техника», Россия).

Для статистического анализа использовали программное обеспечение STATISTICA 7 (Statsoft, США), MS Exel (Microsoft, США) и Past 4.03. Для статистической обработки полученных данных использовали регрессионный и корреляционный анализ при доверительной вероятности 95%. Образцы почв сравнивали дисперсионным непараметрическим методом (критерий Краскела – Уоллиса). Значимые различия между сравниваемыми средними значениями рассчитывали на уровне достоверности 95% и выше ($p < 0.05$).

2. Результаты и обсуждение

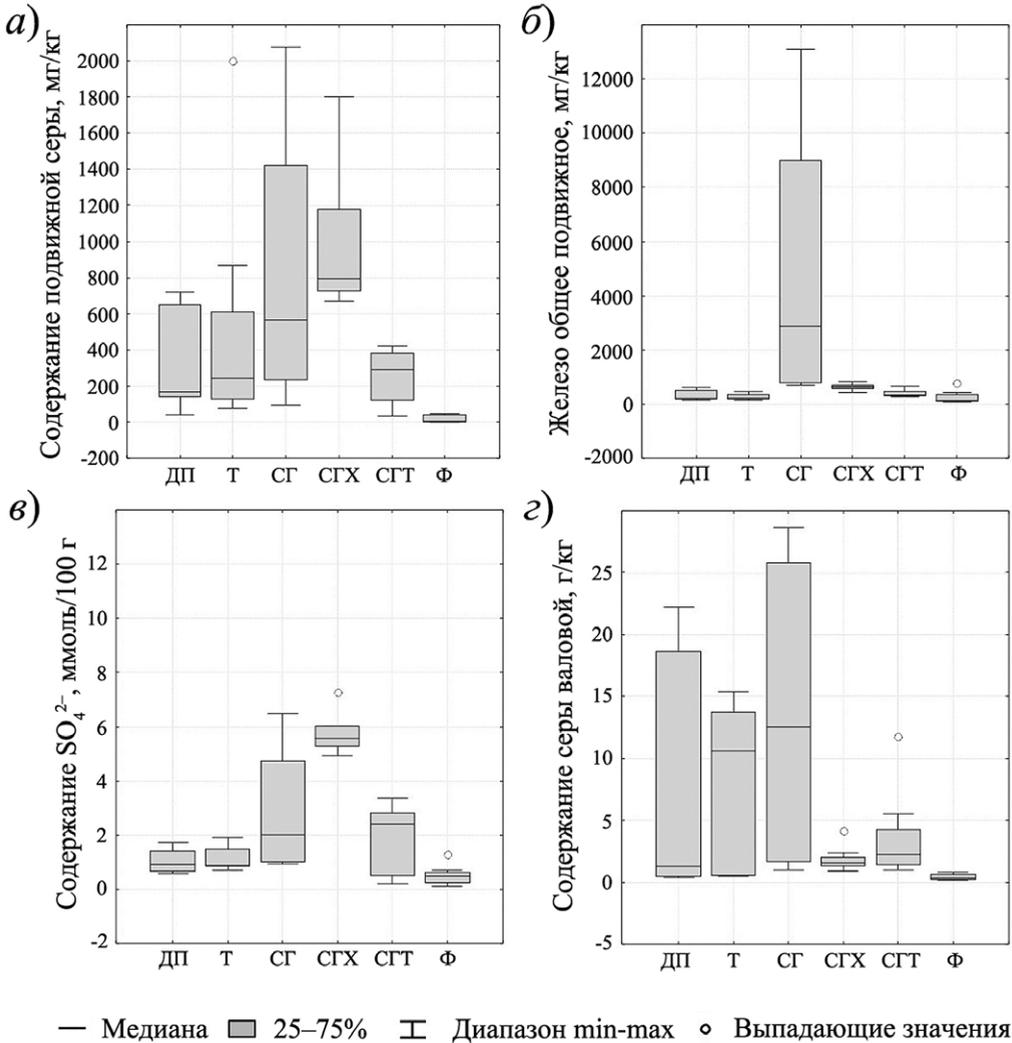
За трехлетний период исследования почв КУБ нами были диагностированы как антропогенно-сконструированные, так и химически-преобразованные почвы. Основным фактором формирования техногенных почв являются процессы гипергенеза сульфидных минералов шахт и отвалов.

Кислые сульфатные почвы на территории КУБ образовались под воздействием кислых шахтных вод на участках влияния водосброса, стоков отвалов и самоизливов. Часто у этих почв наблюдается наличие техногенного слоя, образованного в результате наносов.

На участке водосброса шахты Широковская исследованы две почвы: ДП и Т. ДП почва характеризуется наличием техногенных наносов мощностью около 40 см. Горизонт, состоящий из техногенных наносов, отличается низким pH ($pH-H_2O = 3.0$), максимальным содержанием органического углерода (8.2%), сульфатов (800 мг/кг), подвижных железа (620 мг/кг) и серы (730 мг/кг) [8], а также валовой серы (22 г/кг) (рис. 1, з). Ниже техногенного слоя сохранен профиль дерново-подзолистой почвы со слабокислой реакцией среды $pH-H_2O = 4.1-4.4$, низким содержанием сульфатов (30–40 мг/кг), подвижной серы (158 мг/кг) и валовой серы (0.4–0.6 г/кг) (рис. 1 и 2). При этом количество обменного алюминия в погребенной дерново-подзолистой почве в 20–30 раз

превышает этот показатель в слое техногенных наносов. Растительность полностью отсутствует.

Рис. 1. Химические показатели почв: *a* – содержание подвижной серы; *б* – железо общее



подвижное; *в* – содержание SO_4^{2-} ; *г* – содержание серы валовой. Почвы: ДП – дерново-подзолистая, погребенная под техногенным слоем; Т – технозем; СГ – серогумусовая техногенно-трансформированная на излив; СГХ – серогумусовая химически-преобразованная; СГТ – серогумусовая техногенно-трансформированная на стоке с отвала; Ф – фоновые

Данная тенденция также наблюдается в почвах Подмосквовного бурогоугольного бассейна [38], почвы которого характеризуются кислой реакцией, высоким содержанием обменного алюминия и подвижного железа(III) и наличием техногенных наносов, составляющих техногенный горизонт разного состава.

Т образован на участке водосброса после проведения рекультивационных мероприятий в начале 2000-х гг. Рекультивация проведена с использованием отходов содового производства и активного ила [8]. Т имеет кислую среду

($pH-H_2O = 3.3-5.3$), характеризуется высоким содержанием органического углерода в срединной части профиля (около 65%), количество валовой серы снижается с 15 г/кг на поверхности до 10 г/кг на глубине 50 см, наибольшее количество сульфатов (7.4 смоль/кг) обнаружено в верхнем слое, содержание подвижной серы и железа уменьшается с глубиной. В связи с уменьшением кислотности и увеличением количества органического углерода в верхних слоях Т на данной почве произошло развитие растительности, которая представлена в основном растениями семейства осоковых *Carex* sp. и злаками *Poaceae* sp., а из древесных растений на участке обнаружена только береза *Betula* spp.

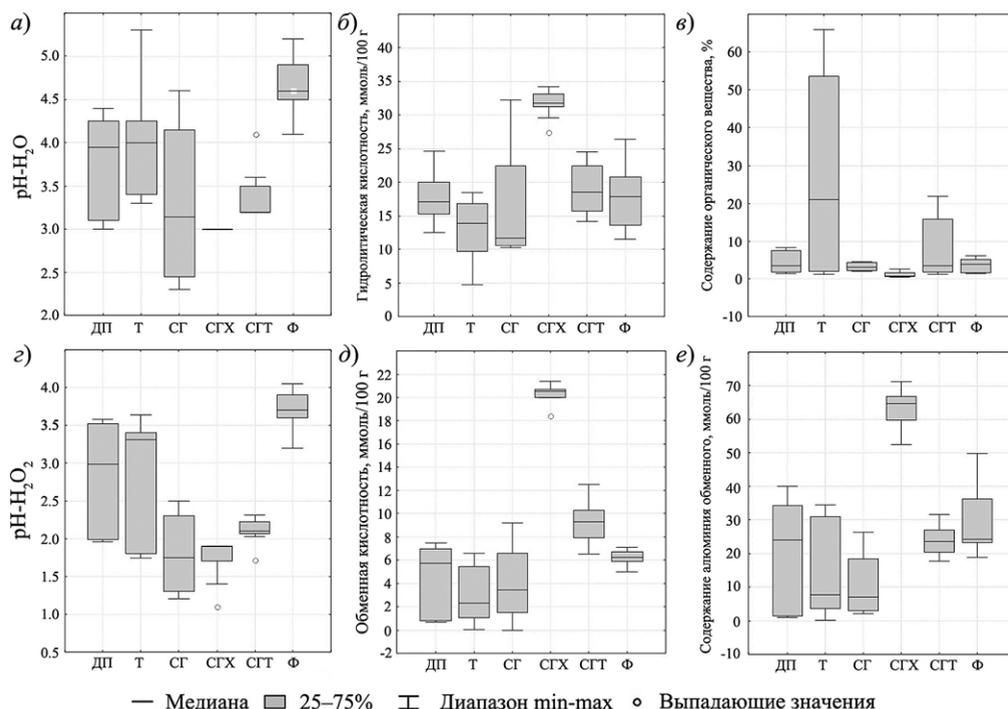


Рис. 2. Кислотность почв: а – $pH-H_2O$; б – гидролитическая кислотность; в – содержание органического вещества; г – $pH-H_2O_2$; д – обменная кислотность; е – содержание алюминия обменного. Обозначения почв аналогичны представленным на рис. 1

СГ почва диагностирована на участке самоизлива кислых шахтных вод. В результате поступления кислых вод со взвесями из шурфа и процессов окисления на поверхности фоновой серогумусовой почвы образовался слой техногенных наносов, представленный в основном гидроксидами железа. Излишняя обводненность также привела к оглеению почвы. Содержание органического углерода увеличивается с глубиной, наибольшие значения наблюдаются на глубине 30–40 см (4.5%). По сравнению с фоновыми показателями данная почва более кислая ($pH-H_2O = 2.3-4.6$), содержание подвижного Fe(II) в нижнем слое составляет 4.5 г/кг, а в верхнем слое оно очень высокое (13 г/кг). Такая же тенденция наблюдается для сульфатов (6.5 смоль/кг), подвижной серы (2080 мг/кг) и валовой серы (13 г/кг) (рис. 1), с увеличением глубины значения данных показателей снижаются. Растительность представлена единичными видами *Betula* spp.

У подножия породных отвалов также обнаружены кислые почвы. Такие почвы испытывают меньшее воздействие агрессивных вод, что связано с периодичностью осадков и возрастанием количества рекультивированных отвалов. На территориях стока с отвала образуются химически-преобразованные почвы и техногенно-трансформированные, т. е. помимо изменения химических свойств почв происходят их морфологические трансформации. Химически-преобразованные почвы образуются при отсутствии наносов. СГХ почва (сток с отвала шахты Гореловская) является сильнокислой ($\text{pH-H}_2\text{O} = 2.8\text{--}3.1$) (рис. 2), характеризуется высоким содержанием сульфатов, подвижной и валовой серы (рис. 1). При этом максимальные значения свойственны для верхнего слоя (12.7 смоль/кг, 1480–1800 мг/кг и 4.1 г/кг для сульфатов, подвижной и валовой серы соответственно). Подвижное железо представлено в основном Fe(III), количество которого снижается с ростом глубины от 2794 мг/кг. Количество обменного алюминия соответствует уровню фона (50–70 ммоль/100 г) и превышает его содержание в остальных почвах, образованных при воздействии кислых шахтных вод. Гранулометрический анализ почвы показал увеличение доли частиц размером 0.05–0.01 мм и снижение доли частиц размером 0.01– < 0.002 мм относительно фоновой почвы. Растительность представлена единичными видами *Betula* spp.

СГТ почва, диагностированная на стоке с шахты Усьва, характеризуется изменением химических свойств и морфологической структуры в результате поступления на этот участок глинистых наносов с отвала. Отвал расположен на возвышенности, высота над уровнем моря составляет 275 м. Наносы образовались в результате смыва вещества отвала и глины, которой был экранирован отвал при рекультивации. После рекультивации отвал сохранил крутые склоны, поэтому глина стекает во время сильных дождей и снеготаяния к подножию отвала и далее вниз по склону. В результате наносов на поверхности почвы образовался слой мощностью 34 см, который представлен слоем 0–6 см, состоящим из чередующихся слоев глины и подстилки из листьев березы, и слоем 6–34 см, представляющим собой измельченный материал отвала с включениями угля. СГТ почва характеризуется кислой реакцией ($\text{pH-H}_2\text{O} = 4.1$ в верхнем слое и уменьшается с ростом глубины до 3.2). Содержание сульфат-ионов и подвижной серы увеличивается с глубиной, при этом максимальное содержание валовой серы отмечено на глубине 21–4 см и составило 11.7 г/кг. Содержание органического углерода максимально в слоях 6–24 и 24–31 см и равно 19.7% и 21.9% соответственно, с глубины 41 см содержание органического углерода составляет около 2%. Судя по всему, высокое содержание органического углерода в верхних слоях связано с наличием включений угля. Гидролитическая кислотность незначительно уменьшается по профилю с 24.5 до 14.2 ммоль/100 г. Обменная кислотность и содержание обменного алюминия по профилю изменяются незначительно. Растительность также представлена единичными видами *Betula* spp.

Таким образом, исследованные почвы территории КУБ характеризуются кислой реакцией (рис. 2 а, б, г, д), причем техногенные наносы имеют более низкие значения $\text{pH-H}_2\text{O}$, чем погребенная под ними почва. Анализ Краскела – Уоллиса показал, что гидролитическая кислотность Т достоверно ниже, чем

для ДП почвы и серогумусовых почв, образованных на участке влияния стока с отвала (рис. 2, б). Серогумусовые почвы (СГ, СГХ, СГТ) имеют более кислую реакцию, чем Т. Наибольшая величина обменной кислотности характерна для СГХ почвы (рис. 2, д). Анализ рН почв после обработки пероксидом водорода показал, что во всех исследованных почвах присутствуют горизонты с рН-Н₂О₂ менее 2.5 (рис. 2, з), что является признаком наличия сульфидов.

Следует отметить, что значения соответствующих показателей в фоновых почвах были в несколько десятков-сотен раз меньше по сравнению с техногенными почвами.

Минимальные значения рН-Н₂О₂ в Т характерны для глубины 20–50 см (рис. 3), в ДП почве – для слоя техногенных наносов. Серогумусовые трансформированные и химически-преобразованные почвы имеют низкие показатели рН-Н₂О₂ по всему профилю (рис. 3).

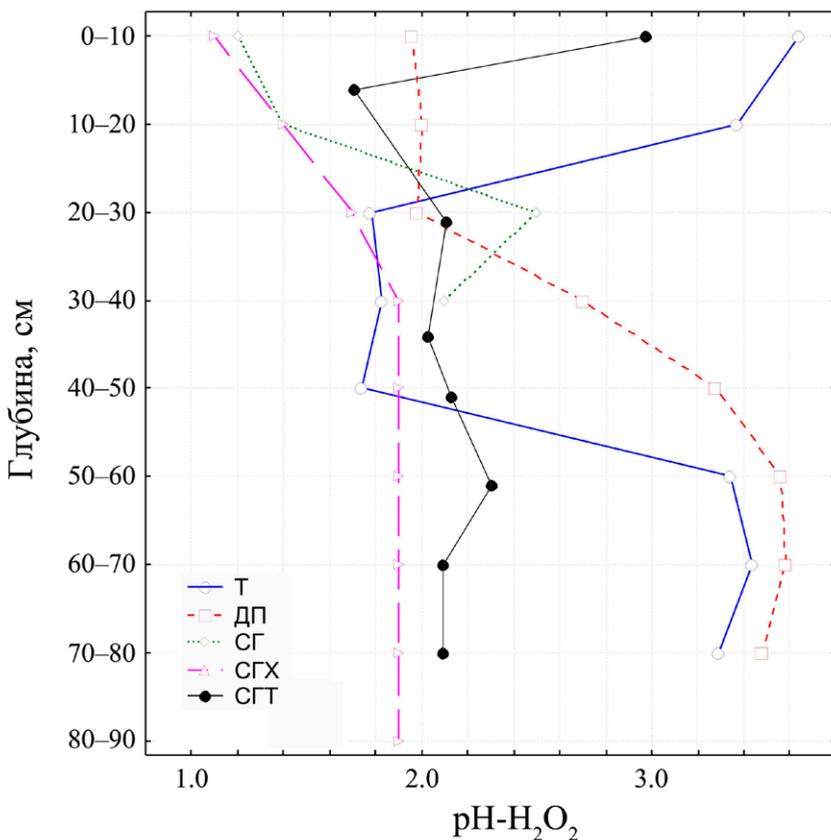


Рис. 3. Распределение рН-Н₂О₂ по профилям техногенных почв

Следует отметить, что в пробе фоновой серогумусовой грубогумусированной почвы, верхний слой которой представлен горизонтом со слабо разложившимся органическим веществом, рН-Н₂О₂ составил 1.9. Такое значение связано с тем, что органическое вещество пробы сильно окислилось при взаимодействии с пероксидом водорода, что также отмечено в работе [26]. Однако подобные образцы, кроме описанного выше, отсутствовали. рН-Н₂О₂ в фоновых пробах варьируется в диапазоне 3.2–4.05.

Для Т и СГТ почвы типично наличие пятен желтой окраски в слое, характеризующемся минимальным значением $\text{pH-H}_2\text{O}_2$ и максимальным содержанием органического вещества. Судя по всему, эти пятна указывают на наличие вторичного ярозита, который выпадает из сульфатных вод за счет контакта с кислородом воздуха. Так, образование ярозита в кислых сульфатных почвах при выветривании сульфидов описано в техногенных почвах в заброшенных угольных шахтах в Польше [39]. При этом наличие ярозита способствует сохранению сильной кислотности почв [20].

Наибольшее содержание подвижной серы, как и сульфатов, характерно для СГХ почвы (рис. 1, *а* и *в*). Для подвижного железа данная тенденция наблюдается для СГ почвы (рис. 1, *б*), в которой высокое содержание подвижного железа обусловлено постоянным поступлением кислых сульфатных вод на поверхность почвы и последующим образованием глеевой обстановки на глубине. Содержание валовой серы в техногенных почвах значительно превышает фоновый уровень (рис. 3, *з*), при этом значимых отличий по содержанию валовой серы в техногенных почвах не выявлено.

Статистическая обработка (корреляция Пирсона) показала, что между кислотностью и содержанием подвижной серы и сульфатов существует сильная отрицательная корреляция (табл. 1), а корреляция с валовой серой несколько меньше (табл. 1). Обменная и гидролитическая кислотность также коррелируют с содержанием подвижной серы и сульфатов, т. е. количество серы и сульфатов в почвах обосновывают ее кислотность. Обнаружена положительная корреляция между содержаниями подвижных железа и серы, при этом наибольший вклад оказывает Fe(III) (табл. 1). Между содержанием валовой серы и подвижного железа также установлена положительная корреляция. Содержание органического углерода положительно коррелирует лишь с уровнем сульфатов и валовой серы. При этом наблюдается его отрицательная корреляция с pH после обработки почвы пероксидом водорода (табл. 1). Корреляция содержания органического углерода с соединениями серы объясняется тем, что количество углерода связано с углями, которые обогащены сернистыми соединениями.

Для проверки достоверности применения метода $\text{pH-H}_2\text{O}_2$ для диагностики кислых сульфатных почв проведен рентгенофазовый анализ Т и ДП почв (рис. 4). Установлено, что обе почвы содержат гётит ($\text{FeO}(\text{OH})$), что обусловлено техногенными наносами, сформированными за счет осаждения Fe(III) из кислых вод, и непосредственным окислением сульфидов железа. При этом его доля в техногенном горизонте ДП почвы составляет более 90%. В Т обнаружен ярозит. Судя по всему, к его образованию причастны кислые сульфатные воды и добавление активного ила при рекультивации. Как известно, ярозит образуется в кислых сульфатных почвах при высоком содержании сульфатов и органического вещества. Этот минерал играет ключевую роль в сохранении химически агрессивных условий в сульфатно-кислых почвах [24]. Гётит, как и ярозит, способен образовываться за счет окисления сульфидных минералов, если они присутствуют в отходах. Сходный процесс обнаружен на хвостохранилищах Дальнего Востока [40].

Табл. 1

Корреляция химических показателей почв (указаны достоверные корреляционные связи)

Показатель	pH-H ₂ O	pH-KCl	pH-H ₂ O ₂	SO ₄ ²⁻	Fe _{подв}	S _{подв}	Al _{обменный}	Гидролитическая кислотность	Обменная кислотность	Fe (II)	Fe (III)	S _{растворимая}	C _{орг}
pH-H ₂ O	1.00	0.98	0.93	-0.68	-0.30	-0.73	-0.36	-0.59	-0.44	-	-0.36	-0.53	-
pH-KCl	0.98	1.00	0.92	-0.67	-	-0.73	-0.32	-0.57	-0.41	-	-0.36	-0.57	-
pH-H ₂ O ₂	0.93	0.92	1.00	-0.71	-0.37	-0.76	-0.37	-0.61	-0.44	-	-0.36	-0.52	-0.33
SO ₄ ²⁻	-0.68	-0.67	-0.71	1.00	-	0.89	0.49	0.74	0.55	-	0.30	0.41	0.38
Fe _{подв}	-0.30	-	0.37	-	1.00	0.49	-	-	-	0.31	0.95	0.59	-
S _{подв}	-0.73	-0.73	-0.76	0.89	0.49	1.00	0.36	0.68	0.40	-	0.53	0.55	-
Гидролитическая кислотность	-0.59	-0.57	-0.61	0.74	-	0.68	0.77	1.00	0.79	-	-	-	-
Обменная кислотность	-0.44	-0.41	-0.44	0.55	-	0.40	0.96	0.79	1.00	-	-	-	-
Fe(II)	-	-	-	-	0.31	-	-	-	-	-	-	-	-
Fe(III)	-0.36	-0.36	-0.36	0.30	0.95	0.53	-	0.35	-	-	-	0.64	-
Al _{обменный}	-0.36	-0.32	-0.37	0.49	-	0.36	1.00	0.77	0.96	-	-	-	-
S _{растворимая}	-0.53	-0.57	-0.52	0.41	0.59	0.55	-	-	-	-	0.64	1.00	0.41
C _{орг}	-	-	0.33	0.38	-	-	-	-	-	-	-	0.41	-

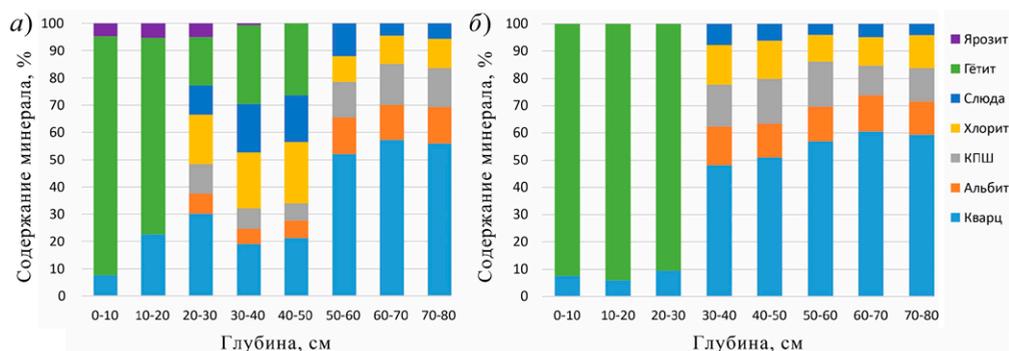


Рис. 4. Результаты рентгенофазового анализа технозема (а) и дерново-подзолистой погребенной под техногенным слоем почвы (б). КПШ – калиевый полевоый шпат

Закключение

Исследования территории КУБ показали, что на участках влияния стоков с породных отвалов, самоизливов и водосброса шахтных вод образуются кислые сульфатные почвы. Образование техногенных сульфатных почв происходит в результате воздействия на природные почвы кислых шахтных вод, при этом отмечаются коренные изменения физических и химических свойств исходных почв.

При воздействии кислых шахтных вод на почвы происходит увеличение их кислотности ($\text{pH-H}_2\text{O}$ – 2.3–3.0), содержания валовой серы, сульфатов, подвижных серы и железа в десятки и сотни раз относительно фоновых значений. Для техногенных почв характерно изменение гранулометрического состава, потеря ила, возрастание содержания крупных фракций. Почвы претерпевают морфологические изменения в связи с возникновением техногенных слоев или изменением водного режима.

Эффективным способом диагностики кислых сульфатных почв на территориях, связанных с горнодобывающей деятельностью, является определение pH после обработки почв пероксидом водорода. Данный метод является наиболее доступным и быстрым способом идентификации кислых сульфатных почв и может использоваться для целей экологического мониторинга территорий, подверженных влиянию горнодобывающей промышленности.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ (проект FSNF-2020-0021), а также Пермского научно-образовательного центра мирового уровня «Рациональное недропользование», 2023 г.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Rouhani A., Gusiatin M.Z., Hejzman M. An overview of the impacts of coal mining and processing on soil: Assessment, monitoring, and challenges in the Czech Republic // *Environ. Geochem. Health*. 2023. V. 45, No 11. P. 7459–7490. <https://doi.org/10.1007/s10653-023-01700-x>.
2. Abliz A., Shi Q., Keyimu M., Sawut R. Spatial distribution, source, and risk assessment of soil toxic metals in the coal-mining region of northwestern China // *Arabian J. Geosci.* 2018. V. 11, No 24. Art. 793. <https://doi.org/10.1007/s12517-018-4152-8>.

3. *Ribeiro J., Flores D.* Occurrence, leaching, and mobility of major and trace elements in a coal mining waste dump: The case of Douro Coalfield, Portugal // *Energy Geosci.* 2021. V. 2, No 2. P. 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.engeos.2020.09.005>.
4. *Thomas G., Sheridan C., Holm P.E.* Arsenic contamination and rare earth element composition of acid mine drainage impacted soils from South Africa // *Miner. Eng.* 2023. V. 203. Art. 108288. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2023.108288>.
5. *Nordstrom K.D., Blowes D.W., Ptacek C.J.* Hydrogeochemistry and microbiology of mine drainage: An update // *Appl. Geochem.* 2015. V. 57. P. 3–16. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2015.02.008>.
6. *Максимович Н.Г., Пьянков С.В.* Кизеловский угольный бассейн: экологические проблемы и пути решения. Пермь: Пермский государственный национальный исследовательский университет, 2018. 288 с.
7. *Kostin A.S., Krechetov P.P., Chernitsova O.V., Terskaya E.V.* Data on physico-chemical characteristics and elemental composition of gray forest soils (Greyzemic Phaeozems) in natural-technogenic landscapes of Moscow brown coal basin // *Data Brief.* 2021. V. 35. Art. 106817. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2021.106817>.
8. *Mitrakova N.V., Khayrulina E.A., Blinov S.M., Perevoshchikova A.A.* Efficiency of acid sulphate soils reclamation in coal mining areas // *J. Min. Inst.* 2023. V. 260, No 2. P. 266–278. <https://doi.org/10.31897/PMI.2023.31>.
9. *Alvarenga P., Mourinha C., Palma P., Cruz N., Rodrigues S.M.* Assessment of soil physicochemical characteristics and As, Cu, Pb and Zn contamination in non-active mines at the Portuguese sector of the Iberian Pyrite Belt // *Environments.* 2022. V. 9, No 8. Art. 105. <https://doi.org/10.3390/environments9080105>.
10. *Mimba M.E., Mbafor P.U.T., Fils S.C.N., Nforba M.T.* Environmental impact of artisanal and small-scale gold mining in East Cameroon, Sub-Saharan Africa: An overview // *Ore Energy Resour. Geol.* 2023. V. 15. Art. 100031. <https://doi.org/10.1016/j.oreoa.2023.100031>.
11. *Fernández-Caliani J.C., Barba-Brioso C., González I., Galán E.* Heavy metal pollution in soils around the abandoned mine sites of the Iberian Pyrite Belt (Southwest Spain) // *Water, Air, Soil Pollut.* 2009. V. 200, No 1–4. P. 211–226. <https://doi.org/10.1007/s11270-008-9905-7>.
12. *Солнцева Н.П., Рубилина Н.Е., Герасимова М.И., Алистратов С.В.* Изменение морфологии выщелоченных черноземов в районах добычи угля // *Почвоведение.* 1992. № 1. С. 17–29.
13. *Kostin A., Krechetov P., Chernitsova O.* Alteration of physico chemical and morphological characteristics of sod-podzolic soils in technogenically-affected landscapes of Moscow Brown Coal Basin // *Mine water: Technological and Ecological Challenges: Proc. IMWA 2019 Conf.* (Perm, July 15–19, 2019). Perm: Perm State University, 2019. P. 725–731.
14. *Menshikova E., Osovetsky B., Blinov S., Belkin P.* Mineral formation under the influence of mine waters (The Kizel Coal Basin, Russia) // *Minerals.* 2020. V. 10, No 4. Art. 364. <https://doi.org/10.3390/min10040364>.
15. *Ushakova E., Menshikova E., Blinov S., Osovetsky B., Belkin P.* Environmental assessment impact of acid mine drainage from Kizel Coal Basin on the Kosva Bay of the Kama Reservoir (Perm Krai, Russia) // *Water.* 2022. V. 14, No 5. Art. 727. <https://doi.org/10.3390/w14050727>.
16. *Имайкин А.К., Имайкин К.К.* Гидрогеологические условия Кизеловского угольного бассейна во время и после окончания его эксплуатации, прогноз их изменений. Пермь: Пермский государственный национальный исследовательский университет, 2013. 112 с.

17. *Barthen R., Sulonen M.L.K., Peräniemi S., Jain R., Lakaniemi A.-M.* Removal and recovery of metal ions from acidic multi-metal mine water using waste digested activated sludge as biosorbent // *Hydrometallurgy*. 2022. V. 207. Art. 105770. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2021.105770>.
18. *Fitzpatrick R., Shand P.* (Eds.) *Inland acid sulfate soil systems across Australia*. CRC LEME Open File Report 249. Perth: CRC LEME, 2008. 303 p.
19. *Nyman A., Johnson A., Yu C., Sohlenius G., Becher M., Dopson M., Åström M.* A nationwide acid sulfate soil study – a rapid and cost-efficient approach for characterizing large-scale features // *Sci. Total Environ.* 2023. V. 869. Art. 161845. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.161845>.
20. *Salo H., Virtanen S., Laine-Kaulio H., Koivusalo H., Jacques D., Kokkonen T.* Evolution of pH, redox potential and solute concentrations in soil and drainage water at a cultivated acid sulfate soil profile // *Geoderma*. 2023. V. 436. Art. 116559. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2023.116559>.
21. *Boman A., Åström M., Fröjdö S.* Sulfur dynamics in boreal acid sulfate soils rich in metastable iron sulfide – the role of artificial drainage // *Chem. Geol.* 2008. V. 255, No 1–2. P. 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2008.06.006>.
22. *Bigham J.M., Schwertmann U., Traina S.J., Winland R.L., Wolf M.* Schwertmannite and the chemical modeling of iron in acid sulfate waters // *Geochim. Cosmochim. Acta*. 1996. V. 60, No 12. P. 2111–2121. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(96\)00091-9](https://doi.org/10.1016/0016-7037(96)00091-9).
23. *Vithana C.L., Sullivan L.A., Burton E.D., Bush R.T.* Stability of schwertmannite and jarosite in an acidic landscape: Prolonged field incubation // *Geoderma*. 2015. V. 239–240. P. 47–57. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2014.09.022>.
24. *Trueman A.M., McLaughlin M.J., Mosley L.M., Fitzpatrick R.W.* Composition and dissolution kinetics of jarosite-rich segregations extracted from an acid sulfate soil with sulfuric material // *Chem. Geol.* 2020. V. 543. Art. 119606. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2020.119606>.
25. *Lin C., Melville M.D.* Acid sulphate soil-landscape relationships in the Pearl River Delta, southern China // *Catena*. 1994. V. 22, No 2. P. 105–120. [https://doi.org/10.1016/0341-8162\(94\)90020-5](https://doi.org/10.1016/0341-8162(94)90020-5).
26. *Sullivan L., Ward N., Toppler N., Lancaster G.* *National Acid Sulfate Soils Guidance: National Acid Sulfate Soils Sampling and Identification Methods Manual*. Water Quality Australia. Canberra: Dep. Agric. Water Resour., 2018. 62 p.
27. *Creeper N., Fitzpatrick R., Shand P., Self P., Kingham R.* A systematic analysis procedure incorporating the chip-tray incubation method for the hazard assessment of Acid Sulfate Soils in the Murray-Darling Basin // *Proc. 19th World Congr. of Soil Science; Soil Solutions for a Changing World (Brisbane, August 1–6, 2010)*. Brisbane: Int. Union of Soil Sci., 2010. P. 75–78.
28. *Hulisz P., Rożański S.L., Boman A., Rauchfleisz M.* Can acid sulfate soils from the southern Baltic zone be a source of potentially toxic elements (PTEs)? // *Sci. Total Environ.* 2022. V. 825. Art. 154003. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154003>.
29. *Bargrizan S., Smernik R.J., Fitzpatrick R.W., Mosley L.M.* The application of a spectrophotometric method to determine pH in acidic (pH < 5) soils // *Talanta*. 2018. V. 186. P. 421–426. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.04.074>.
30. *Воробьева Л.А.* Теория и практика химического анализа почв. М.: ГЕОС, 2006. 400 с.
31. *Аринушкина Е.В.* Руководство по химическому анализу почв. 2-е изд. М.: Изд-во Московского университета, 1970. 488 с.
32. ГОСТ 26485-85. Почвы. Определение обменного (подвижного) алюминия по методу ЦИНАО. М.: Издательство стандартов, 1985. 5 с.

33. ГОСТ 27395-87. Почвы. Метод определения подвижных соединений двух- и трехвалентного железа по Веригиной-Аринушкиной. М.: Издательство стандартов, 1987. 11 с.
34. ГОСТ 26426-85. Почвы. Методы определения иона сульфата в водной вытяжке. М.: Издательство стандартов, 1985. 7 с.
35. ГОСТ 26490-85. Почвы. Определение подвижной серы по методу ЦИНАО. М.: Издательство стандартов, 1985. 4 с.
36. ПНД Ф 16.1:2.2:3.37-2002. Количественный химический анализ почв. Методика измерений валового содержания серы в почвах, грунтах, донных отложениях и отходах турбидиметрическим методом. М., 2002. 18 с.
37. *Brinkman R., Pons L.J.* Recognition and prediction of acid sulphate soil conditions // *Acid Sulphate Soils: Proc. Int. Symp. on Acid Sulphate Soils / Dost H. (Ed.). Publ. 18. Wageningen: Int. Inst. Land Reclam. Improv., 1973. V. 1. P. 169–203.*
38. *Костин А.С., Кречетов П.П.* Трансформация почв в зоне влияния отвалов подмосковного бурогоугольного бассейна // *Почвы и земельные ресурсы: современное состояние, проблемы рационального использования, геоинформационное картографирование: материалы международной научно-практической конференции. Минск: Белорусский государственный университет, 2018. С. 213–219.*
39. *Uzarowicz Ł., Skiba S.* Technogenic soils developed on mine spoils containing iron sulphides: Mineral transformations as an indicator of pedogenesis // *Geoderma. 2011. V. 163, No 1–2. P. 95–108. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2011.04.008>.*
40. *Зверева В.П., Фролов К.Р., Лысенко А.И.* Химические реакции и условия минералобразования на хвостохранилищах Дальнего Востока России // *Горные науки и технологии. 2021. Т. 6, № 3. С. 181–191. <https://doi.org/10.17073/2500-0632-2021-3-181-191>.*

Поступила в редакцию 25.09.2023

Принята к публикации 27.12.2023

Митракова Наталья Васильевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биогеохимии техногенных ландшафтов Естественнонаучного института

Пермский государственный национальный исследовательский университет
ул. Букирева, д. 15, г. Пермь, 614068, Россия
E-mail: mitrakovanatalya@mail.ru

Меньшикова Елена Александровна, доктор геолого-минералогических наук, доцент, заведующий кафедрой минералогии и петрографии геологического факультета, ведущий научный сотрудник Естественнонаучного института

Пермский государственный национальный исследовательский университет
ул. Букирева, д. 15, г. Пермь, 614068, Россия
E-mail: menshikova_e@list.ru

Хайрулина Елена Александровна, доктор географических наук, доцент, заведующий лабораторией биогеохимии техногенных ландшафтов, директор Естественнонаучного института

Пермский государственный национальный исследовательский университет
ул. Букирева, д. 15, г. Пермь, 614068, Россия
E-mail: elenakhay@gmail.com

Порошина Наталья Витальевна, кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории биогеохимии техногенных ландшафтов Естественнонаучного института

Пермский государственный национальный исследовательский университет
ул. Букирева, д. 15, г. Пермь, 614068, Россия
E-mail: navit1@yandex.ru

ORIGINAL ARTICLE

doi: 10.26907/2542-064X.2024.2.324-341

Diagnostics of Acid Sulfate Soils in a Coal Mining Area of the Taiga Zone*N.V. Mitrakova**, *E.A. Menshikova*** , *E.A. Khayrulina****, *N.V. Poroshina******Perm State University, Perm, 614068 Russia**E-mail: *mitrakovanatalya@mail.ru, **menshikova_e@list.ru, ***elenakhay@gmail.com, ****navit1@yandex.ru*

Received September 25, 2023; Accepted December 27, 2023

Abstract

Technogenic soils result from the oxidation and hydrolysis of minerals in rocks extracted from mining areas and brought to the surface. Diagnostics of such soils involve a set of detailed tests, which can be both time-consuming and costly. In this study, the pH of sulfate soils in the Kizel Coal Basin (Perm krai, Russia) was determined using hydrogen peroxide. Particularly, the soils affected by runoff from rock dumps, outflow, and mine water discharge were examined. The findings showed pH-H₂O₂ below 2.5 in certain horizons, indicating the presence of sulfides. Additionally, the soils exhibited significantly higher levels of mobile sulfur and iron, total sulfur, and sulfates, ranging from tens to hundreds of times above the background content. XRD analysis revealed that the soils contained goethite and jarosite, thereby confirming the efficacy of pH determination with hydrogen peroxide for the prompt diagnostics of acid sulfate soils.

Keywords: Kizel Coal Basin, coal, acid sulfate soils, acidity, goethite, jarosite

Acknowledgments. This study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (project no. FSNF-2020-0021) and the Perm Scientific and Educational Center “Rational Subsoil Use” (2023).

Conflicts of Interest. The authors declare no conflicts of interest.

Figure Captions

Fig. 1. Chemical parameters of soils: *a* – mobile sulfur content; *b* – total mobile iron content; *c* – SO₄²⁻ content; *d* – gross sulfur content. Soils: SP – sod-podzolic soil buried under the technogenic soil layer; T – technosol; GH – gray-humus ortsteinic gleyic clayey technosol; GHCh – gray-humus chemically transformed soil; GHT – grey-humus technogenically transformed soil on the runoff from the rock dump; B – background soils.

Fig. 2. Soil acidity: *a* – pH-H₂O; *b* – hydrolytic acidity; *c* – organic matter content; *d* – pH-H₂O₂; *e* – exchangeable acidity; *f* – exchangeable aluminum content. See Fig. 1 for soil type designations.

Fig. 3. pH-H₂O₂ distribution across the technogenic soil profiles.

Fig. 4. Results of the XRD analysis of technosol (*a*) and sod-podzolic soil buried under the technogenic soil layer (*b*). PFS – potassium feldspar.

References

1. Rouhani A., Gusiatiin M.Z., Hejcman M. An overview of the impacts of coal mining and processing on soil: Assessment, monitoring, and challenges in the Czech Republic. *Environ. Geochem. Health*, 2023, vol. 45, no. 11, pp. 7459–7490. <https://doi.org/10.1007/s10653-023-01700-x>.
2. Abliz A., Shi Q., Keyimu M., Sawut R. Spatial distribution, source, and risk assessment of soil toxic metals in the coal-mining region of northwestern China. *Arabian J. Geosci.*, 2018, vol. 11, no. 24, art. 793. <https://doi.org/10.1007/s12517-018-4152-8>.

3. Ribeiro J., Flores D. Occurrence, leaching, and mobility of major and trace elements in a coal mining waste dump: The case of Douro Coalfield, Portugal. *Energy Geosci.*, 2021, vol. 2, no. 2, pp. 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.engeos.2020.09.005>.
4. Thomas G., Sheridan C., Holm P.E. Arsenic contamination and rare earth element composition of acid mine drainage impacted soils from South Africa. *Miner. Eng.*, 2023, vol. 203, art. 108288. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2023.108288>.
5. Nordstrom K.D., Blowes D.W., Ptacek C.J. Hydrogeochemistry and microbiology of mine drainage: An update. *Appl. Geochem.*, 2015, vol. 57, pp. 3–16. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2015.02.008>.
6. Maksimovich N.G., Pyankov S.V. *Kizelovskii ugl'nyi bassein: ekologicheskie problemy i puti resheniya* [Kizel Coal Basin: Ecological Problems and Solutions]. Perm, Permsk. Gos. Nats. Issled. Univ., 2018. 288 p. (In Russian)
7. Kostin A.S., Krechetov P.P., Chernitsova O.V., Terskaya E.V. Data on physico-chemical characteristics and elemental composition of gray forest soils (Greyzemic Phaeozems) in natural-technogenic landscapes of Moscow brown coal basin. *Data Brief*, 2021, vol. 35, art. 106817. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2021.106817>.
8. Mitrakova N.V., Khayrulina E.A., Blinov S.M., Perevoshchikova A.A. Efficiency of acid sulphate reclamation in coal mining areas. *J. Min. Inst.*, 2023, vol. 260, no. 2, pp. 266–278. <https://doi.org/10.31897/PMI.2023.31>.
9. Alvarenga P., Mourinha C., Palma P., Cruz N., Rodrigues S.M. Assessment of soil physicochemical characteristics and As, Cu, Pb and Zn contamination in non-active mines at the Portuguese sector of the Iberian Pyrite Belt. *Environments*, 2022, vol. 9, no. 8, art. 105. <https://doi.org/10.3390/environments9080105>.
10. Mimba M.E., Mbafor P.U.T., Fils S.C.N., Nforba M.T. Environmental impact of artisanal and small-scale gold mining in East Cameroon, Sub-Saharan Africa: An overview. *Ore Energy Resour. Geol.*, 2023, vol. 15, art. 100031. <https://doi.org/10.1016/j.oreoa.2023.100031>.
11. Fernández-Caliani J.C., Barba-Brioso C., González I., Galán E. Heavy metal pollution in soils around the abandoned mine sites of the Iberian Pyrite Belt (Southwest Spain). *Water, Air, Soil Pollut.*, 2009, vol. 200, nos. 1–4. P. 211–226. <https://doi.org/10.1007/s11270-008-9905-7>.
12. Solntseva N.P., Rubilina N.E., Gerasimova M.I., Alistratov S.V. Alteration of the morphology of leached chernozems in a coal-mining district. *Eurasian Soil Sci.*, 1992, vol. 24, no. 4, pp. 46–58.
13. Kostin A., Krechetov P., Chernitsova O. Alteration of physico chemical and morphological characteristics of sod-podzolic soils in technogenically-affected landscapes of Moscow Brown Coal Basin. *Mine Water: Technological and Ecological Challenges: Proc. IMWA 2019 Conf. (Perm, July 15–19, 2019)*. Perm, Perm State Univ., 2019, pp. 725–731.
14. Menshikova E., Osovetsky B., Blinov S., Belkin P. Mineral formation under the influence of mine waters (the Kizel coal basin, Russia). *Minerals*, 2020, vol. 10, no. 4, art. 364. <https://doi.org/10.3390/min10040364>.
15. Ushakova E., Menshikova E., Blinov S., Osovetsky B., Belkin P. Environmental assessment impact of acid mine drainage from Kizel Coal Basin on the Kosva Bay of the Kama Reservoir (Perm Krai, Russia), *Water*, 2022, vol. 14, no. 5, art. 727. <https://doi.org/10.3390/w14050727>.
16. Imaykin A.K., Imaykin K.K. *Gidrogeologicheskie usloviya Kizelovskogo ugl'nogo basseina vo vremya i posle okonchaniya ego ekspluatatsii, prognoz ikh izmenenii* [Hydrogeological Conditions of the Kizel Coal Basin during and after of Its Exploitation, Prediction of Their Changes]. Perm, Permsk. Gos. Nats. Issled. Univ., 2013. 112 p. (In Russian)
17. Barthen R., Sulonen M.L.K., Peräniemi S., Jain R., Lakaniemi A.-M. Removal and recovery of metal ions from acidic multi-metal mine water using waste digested activated sludge as biosorbent. *Hydrometallurgy*, 2022, vol. 207, art. 105770. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2021.105770>.
18. Fitzpatrick R., Shand P. (Eds.) *Inland Acid Sulfate Soil Systems across Australia*. CRC LEME Open File Report 249. Perth, CRC LEME, 2008. 303 p.
19. Nyman A., Johnson A., Yu C., Sohlenius G., Becher M., Dopson M., Åström M. A nationwide acid sulfate soil study – a rapid and cost-efficient approach for characterizing large-scale features. *Sci. Total Environ.*, 2023, vol. 869, art. 161845. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.161845>.

20. Salo H., Virtanen S., Laine-Kaulio H., Koivusalo H., Jacques D., Kokkonen T. Evolution of pH, redox potential and solute concentrations in soil and drainage water at a cultivated acid sulfate soil profile. *Geoderma*, 2023, vol. 436, art. 116559. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2023.116559>.
21. Boman A., Åström M., Fröjdö S. Sulfur dynamics in boreal acid sulfate soils rich in metastable iron sulfide – the role of artificial drainage. *Chem. Geol.*, 2008, vol. 255, nos. 1–2, pp. 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2008.06.006>.
22. Bigham J.M., Schwertmann U., Traina S.J., Winland R.L., Wolf M. Schwertmannite and the chemical modeling of iron in acid sulfate waters. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 1996, vol. 60, no. 12, pp. 2111–2121. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(96\)00091-9](https://doi.org/10.1016/0016-7037(96)00091-9).
23. Vithana C.L., Sullivan L.A., Burton E.D., Bush R.T. Stability of schwertmannite and jarosite in an acidic landscape: Prolonged field incubation. *Geoderma*, 2015, vols. 239–240, pp. 47–57. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2014.09.022>.
24. Trueman A.M., McLaughlin M.J., Mosley L.M., Fitzpatrick R.W. Composition and dissolution kinetics of jarosite-rich segregations extracted from an acid sulfate soil with sulfuric material. *Chem. Geol.*, 2020, vol. 543, art. 119606. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2020.119606>.
25. Lin C., Melville M.D. Acid sulphate soil-landscape relationships in the Pearl River Delta, southern China. *Catena*, 1994, vol. 22, no. 2, pp. 105–120. [https://doi.org/10.1016/0341-8162\(94\)90020-5](https://doi.org/10.1016/0341-8162(94)90020-5).
26. Sullivan L., Ward N., Toppler N., Lancaster G. *National Acid Sulfate Soils Guidance: National Acid Sulfate Soils Sampling and Identification Methods Manual*. Water Quality Australia. Canberra, Dep. Agric. Water Resour., 2018. 62 p.
27. Creeper N., Fitzpatrick R., Shand P., Self P., Kingham R. A systematic analysis procedure incorporating the chip-tray incubation method for the hazard assessment of Acid Sulfate Soils in the Murray-Darling Basin. *Proc. 19th World Congr. of Soil Science; Soil Solutions for a Changing World (Brisbane, August 1–6, 2010)*. Brisbane, Int. Union of Soil Sci., 2010, pp. 75–78.
28. Hulisz P., Rożański S.Ł., Boman A., Rauchfleisz M. Can acid sulfate soils from the southern Baltic zone be a source of potentially toxic elements (PTEs)? *Sci. Total Environ.*, 2022, vol. 825, art. 154003. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154003>.
29. Bargrizan S., Smernik R.J., Fitzpatrick R.W., Mosley L.M. The application of a spectrophotometric method to determine pH in acidic (pH < 5) soils. *Talanta*, 2018, vol. 186, pp. 421–426. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.04.074>.
30. Vorob'eva L.A. *Teoriya i praktika khimicheskogo analiza pochv* [Theory and Practice of Soils Chemical Analysis]. Moscow, GEOS, 2006. 400 p. (In Russian)
31. Arinushkina E.V. *Rukovodstvo po khimicheskomu analizu pochv* [Handbook on Soils Chemical Analysis]. 2nd ed. Moscow, Izd. Mosk. Univ., 1970. 488 p. (In Russian)
32. State Standard 26485-85. Soils. Determination of exchangeable (mobile) aluminium by CINAO method. Moscow, Izd. Standartov, 1985. 5 p. (In Russian)
33. State Standard 27395-87. Soils. Determination of mobile two- and trivalent iron compounds by Verigina–Arinushkina method. Moscow, Izd. Standartov, 1987. 11 p. (In Russian)
34. State Standard 26426-85. Soils. Methods for determination of sulphate ion in water extract. Moscow, Izd. Standartov, 1985. 7 p. (In Russian)
35. State Standard 26490-85. Soils. Determination of mobile sulfur by CINAO method. Moscow, Izd. Standartov, 1985. 4 p. (In Russian)
36. Federal Environmental Regulation 16.1:2.2:3.37-2002. Quantitative chemical analysis of soils. Measuring the gross sulfur content in soils, soils, bottom sediments, and waste by the turbidimetric method. Moscow, 2002. 18 p. (In Russian)
37. Brinkman R., Pons L.J. Recognition and prediction of acid sulphate soil conditions. *Acid Sulphate Soils: Proc. Int. Symp. on Acid Sulphate Soils*. Dost H. (Ed.). Publ. 18. Vol. 1. Wageningen, Int. Inst. Land Reclam. Improv., 1973, pp. 169–203.
38. Kostin A.S., Krechetov P.P. Transformation of soils in the area affected by mine dumps of the Moscow Brown Coal Basin. *Pochvy i zemel'nye resursy: sovremennoe sostoyanie, problemy ratsional'nogo ispol'zovaniya, geoinformatsionnoe kartografirovaniye: materialy mezhdunarodnoi nauchno-*

prakticheskoi konferentsii [Soils and Land Resources: Current State, Problems of Sustainable Use, and Geoinformation Mapping: Proc. Int. Sci.-Pract. Conf.]. Minsk, Belarus. Gos. Univ., 2018, pp. 213–219. (In Russian)

39. Uzarowicz L., Skiba S. Technogenic soils developed on mine spoils containing iron sulphides: Mineral transformations as an indicator of pedogenesis. *Geoderma*, 2011, vol. 163, nos. 1–2, pp. 95–108. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2011.04.008>.
40. Zvereva V.P., Frolov K.R., Lysenko A.I. Chemical reactions and conditions of mineral formation at tailings storage facilities of the Russian Far East. *Gorn. Nauki Tekhnol.*, 2021, vol. 6, no. 3, pp. 181–191. <https://doi.org/10.17073/2500-0632-2021-3-181-191>.

Для цитирования: Митракова Н.В., Меньшикова Е.А., Хайрулина Е.А., Порошина Н.В. Диагностика кислых сульфатных почв в угледобывающем районе в таежной зоне // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2024. Т. 166, кн. 2. С. 324–341. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2024.2.324-341>.

For citation: Mitrakova N.V., Menshikova E.A., Khayrulina E.A., Poroshina N.V. Diagnostics of acid sulfate soils in a coal mining area of the taiga zone. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennyye Nauki*, 2024, vol. 166, no. 2, pp. 324–341. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2024.2.324-341>. (In Russian)

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

УДК 562+551.7

doi: 10.26907/2542-064X.2024.2.342-367

КЛАССИФИКАЦИЯ ЗАЩИТНЫХ СТРУКТУР ИСКОПАЕМЫХ МШАНОК

З.А. Толоконникова^{1,2}, П.В. Федоров³, Д.М. Михненко¹

¹*Кубанский государственный университет, г. Краснодар, 350040, Россия*

²*Казанский (Приволжский) федеральный университет,
г. Казань, 420008, Россия*

³*Санкт-Петербургский государственный университет,
г. Санкт-Петербург, 199034, Россия*

Аннотация

В работе впервые проведена типизация по функциональному критерию защитных структур мшанок из четырех отрядов – Trepostomata, Cryptostomata, Fenestrata и Cheilostomata. Предложенная классификация включает пять групп, отвечающих за: 1) снижение давления воды; 2) увеличение питающей площади за счет возрастания расстояния между апертурами автозооидов, повышение устойчивости и целостности колонии, ее укрепление; 3) физическую защиту полипида, прикрепление мускулатуры; 4) отпугивание хищников; 5) физическую защиту от хищников, очистку от осадка, личинок и мелких беспозвоночных. Анализ эволюции гетерозооидов, стилей и авикулярий показал появление длительно существующих полиморф в раннем ордовике, позднем девоне и раннем мелу. Среди абиотических и биотических факторов наиболее влияющими на эволюционные изменения мшанок были колебания уровня Мирового океана, климата, объема фитопланктона и состава хищников. Для защиты от хищников у мшанок формировались отпугивающие стили и физически препятствующие поеданию гетерозооиды разных модификаций. Возникновение авикулярий и подобных им гетерозооидов происходило неоднократно: в раннем ордовике и раннем девоне у фенестрат, в середине карбона у криптостомат, в начале мела у хейлостомат.

Ключевые слова: мшанки, гетерозооэци, авикулярии, ордовик, девон, пермь, мел, эволюция, стили защиты.

Введение

Мшанки (Bryozoa) – колониальные организмы-фильтраторы, наиболее разнообразно представленные в бентосных экосистемах. Колонии этих беспозвоночных построены питающими особями – автозооидами и не питающими – гетерозооидами. Любая особь колонии состоит из полипида (полного или редуцированного), образованного мягкими тканями, не сохраняющимися в ископаемом состоянии, и цистидом, который после фоссилизации называется зооэцием. Тип Bryozoa Ehrenberg, 1831 включает класс пресноводных мшанок – Phylactolaemata Allman, 1856 без минерального скелета и два класса морских – Stenolaemata Borg, 1926 и Gymnolaemata Allman, 1856 с обызвествленными стенками зооидов. К стенолематам относятся преимуще-

ственно палеозойско-мезозойские отряды, вымершие в середине девонского периода (*Esthonioporata* Astrova, 1978), конце пермского (*Fenestrata* Elias and Condra, 1957) или на протяжении триасового (*Cryptostomata* Vine, 1884, *Cystoporata* Astrova, 1964, *Trepostomata* Ulrich, 1882) [1]. До настоящего времени из стенолемат дожил единственный отряд *Cyclostomata* Buck, 1852, зародившийся в ордовике. Разнообразие современных гимнолемат ограничено мшанками из отряда *Stenostomata* Buck, 1852, известного с ордовика, и *Cheilostomata* Buck, 1852, возникшего в меловом периоде [2]. Каждый отряд отличается определенным набором гетерозооидов с различным строением и предназначением (рис. 1).

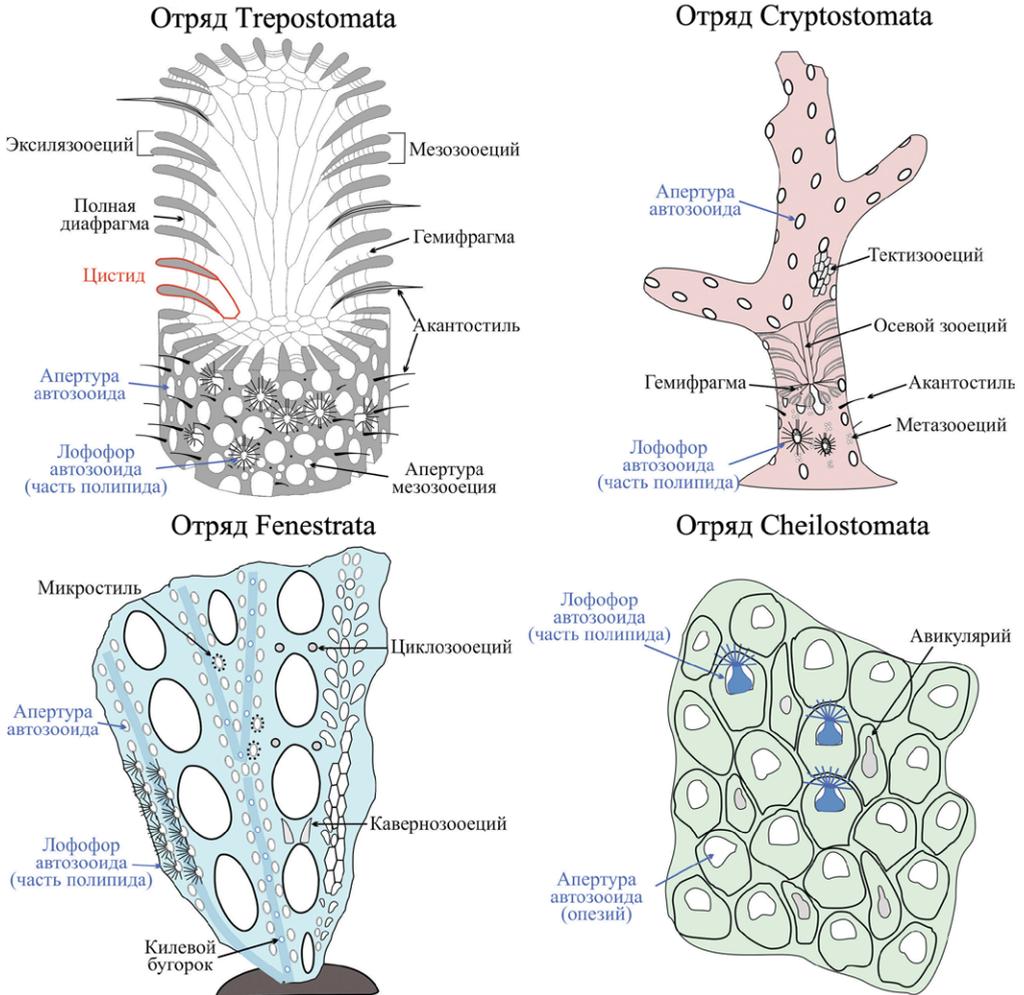


Рис. 1. Принципиальные схемы строения колоний ископаемых мшанок из разных отрядов

Мшанки характеризуются долгой эволюционной историей развития почти в 500 млн лет [1, 3, 4]. Их биологический успех объясняется колониальной организацией, распределением функций между структурными единицами колонии и различными типами личинок [5, 6]. Развитие разнообразных защитных структур (гетерозооидов, стилей, авикуляриев) стало одним из приоритетных направлений

эволюции типа Мшанки на протяжении всего фанерозоя. В статье рассматриваются эволюционные изменения в численно доминирующих палеозойско-мезозойских отрядах *Trepostomata*, *Cryptostomata* (класс *Stenolaemata*), палеозойском *Fenestrata* и мезо-кайнозойском *Cheilostomata* (класс *Gymnolaemata*) на следующих временных отрезках: ордовик, поздний девон – ранний карбон, пермь и мел. Выбор данных интервалов определен приуроченностью к ним крупнейших массовых вымираний среди биоты Земли и принципиальных перестроек у представителей типа Мшанки (рис. 2).

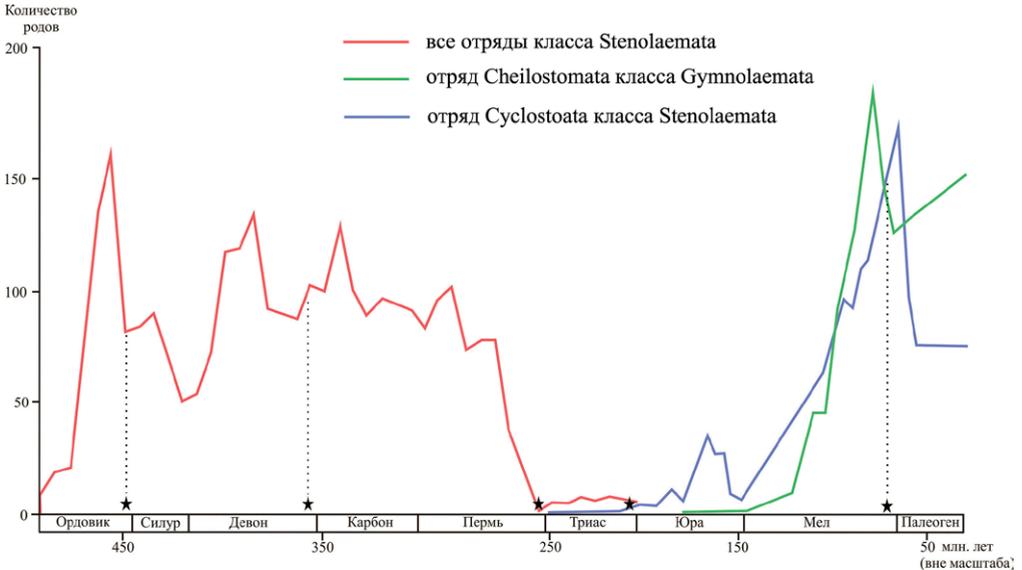


Рис. 2. Родовое богатство ископаемых мшанок и события крупнейших массовых вымираний (звезды) на протяжении ордовика-палеогена. Адаптировано из [1, 7, 8, 9]

Цель настоящей работы – типизация защитных структур мшанок из господствующих палеозойских и мезо-кайнозойских отрядов по функциональному критерию. Основой послужили авторские коллекции из более чем 50 местонахождений разного возраста с территории Евразии, музейные материалы и литературные данные.

Фрагменты колоний ископаемых мшанок изучали преимущественно по ориентированным шлифам методом световой микроскопии при различных увеличениях. Отдельные колонии либо фрагменты колоний описывали по результатам сканирующей электронной микроскопии и рентгеновской компьютерной микротомографии. Эти исследования выполнены в Ресурсном центре Санкт-Петербургского государственного университета «Рентгенодифракционные методы исследования» и Научно-образовательном центре «Диагностика структуры и свойств наноматериалов» Кубанского государственного университета.

1. Ордовик

Достоверные находки первых мшанок известны из нижнеордовикских отложений Южного Китая [4, 10–12] и Балтоскандии [13, 14]. Наиболее многочисленны и разнообразны в ордовикских ассоциациях трепостоматы и криптостоматы.

В массивных, ветвистых, инкрустирующих колониях трепостоматных мшанок полиморфизм был выражен мезозооидами (например, роды *Diplotrypa* Nicholson, 1879, *Dittopora* Dybowski, 1877) или эксилязооидами (роды *Anaphragma* Ulrich and Bassler, 1904, *Cyphotrypa* Ulrich and Bassler, 1904, *Monotrypa* Nicholson, 1879). Эти трубчатые структуры полигонального сечения располагались между автозооидами в один или несколько рядов (рис. 1, а, и рис. 3, а, б).

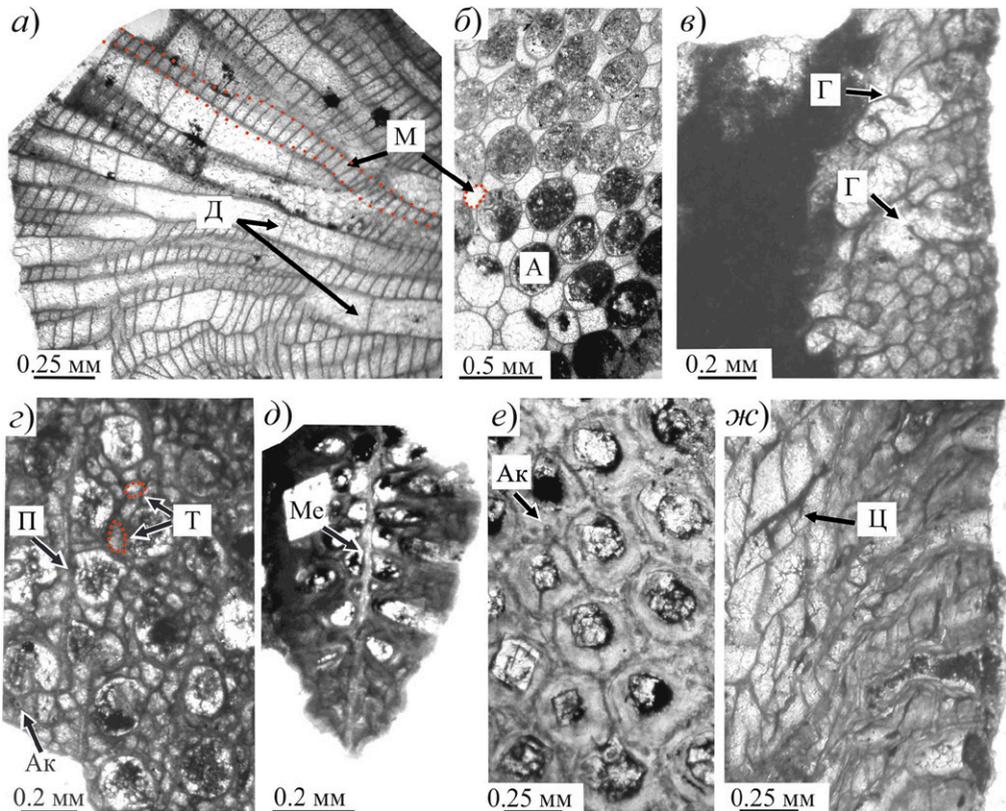


Рис. 3. Структуры в колониях ордовикских мшанок отрядов Trepostomata и Cryptostomata (верхний ордовик, сандбийский ярус, хревицкая свита; Ленинградская область РФ, р. Хревица): а, б – *Diplotrypa abnormis* (Modzalevskaya, 1953), экз. ЦНИГР музей, № 4/13403; в, з – *Nematotrypa robusta* (Spjeldnaes, 1984), экз. ЦНИГР музей, № 1/13403; д – *Prophyllodictya khrevitsa* Tolokonnikova et Fedorov, 2023, экз. ЦНИГР музей, № 16/13403; е, ж – *Amplexopora* sp., экз. ЦНИГР музей, № 11/13403. Условные обозначения: А – апертюра автозооидов, Ак – акантоциль, Г – гемифрагма, Д – диафрагма, М – мезозооид, Ме – мезотека, П – пауростиль, Т – тектизооид, Ц – цистифрагма

Отличительной особенностью мезозоидов являлось наличие в их полостях многочисленных диафрагм [15]. У эксилязоидов диафрагмы отсутствовали (рис. 1, а). Оба типа гетерозоидов способствовали упорядоченному расположению автозоидов, тем самым повышая эффективность питания [16]. Их присутствие в колонии также способствовало ее устойчивости [1]. Аналогичные функции в колониях криптостоматных мшанок, вероятно, выполняли тектизоиды, например, род *Nematotrypa* Bassler, 1911 (рис. 3, з) [21].

Фенестраты подотряда *Phylloporina* отличались особым типом гетерозооидов – лептозооидами [17]. Эти трубчатые структуры округлого сечения без диафрагм располагались в экзозоне колоний хаотично (род *Phylloporina* Ulrich and Foerste, 1887). Считается, что они эквивалентны авикуляриям хейлостоматных мшанок [1, 17].

Впячивание лофофора щупалец в камеру цистида и его вытягивание для улавливания пищевых частиц происходит за счет мускулатуры. Существует мнение [18, 19], что у ископаемых мшанок мышцы крепились к латеральным выростам стенок цистида – диа-, цисти-, гемифрагмам, гемисептам (рис. 1, а, б и рис. 3, а, в, ж), перекрывающим полость камеры полностью или частично. Их многочисленность объясняется дегенерацией полипида в растущем цистиде и дальнейшей регенерацией полипида [15]. Дополнительно в литературе обсуждается предназначение этих структур для защиты мягкого полипида и деления камеры полипида на части [1, 20]. Данные структуры были развиты у представителей всех палеозойских отрядов: диафрагмы – роды *Amplexopora* (трепостомата), *Fistulipora* М'Сой, 1849 (цистопората), *Dianulites* Vinassa and Regny, 1921 (эстониопората), *Phylloporina* (фенестрата); цистифрагмы – роды *Homotrypa* Ulrich, 1882 (трепостомата), гемифрагмы – род *Nematotrypa* (криптостомата), гемисепты – роды *Pseudohornera* Roemer, 1876 (фенестрата) и *Trepocryptopora* Yang, 1957 (криптостомата).

Рост сетчатых колоний криптостомат (например, роды *Prophyllodictya* Gorjunova, 1987, *Stictopora* Hall, 1847) происходил путем двустороннего почкования автозооидов вокруг мезотеки – срединной пластинки с капиллярами или без них (рис. 3, д). Билатеральный план строения повышал эффективность питания, поскольку лофофоры щупалец располагались на обеих сторонах колонии во время фильтрации воды.

Пассивную защиту многих стенолематных мшанок обеспечивали разного рода стили. Акантостили (например, роды *Amplexopora* Ulrich, 1882, *Anaphragma* Ulrich and Bassler, 1904, *Nematotrypa*) – тоненькие стержни одинакового диаметра на всем своем протяжении с четко выраженными стенками ламинарного или поперечного строения, частично выступающие над поверхностью колонии в виде игл (рис. 1, а, б, и рис. 3, з, е). Вероятно, при жизни колоний они препятствовали их поеданию хищниками (рыбами, моллюсками, членистоногими, иглокожими). Согласно [21, 22], хищничество – одна из причин развития защитных морфологических адаптаций. С середины ордовика стала закладываться дифференциация акантостилей (роды *Heterotrypa* Nicholson, 1879, *Mesotrypa* Ulrich, 1893) на крупные – макроакантостили и мелкие – микроакантостили, ярко проявившаяся у девонских и более молодых трепостомат [15]. Однако у некоторых мшанок акантостили не развивались вообще (род *Monotrypa*). Пауростили мельче акантостилей, без выраженного ядра и неслоистого строения. Они известны только у криптостомат, например, у родов *Prophyllodictya* и *Nematotrypa* (рис. 3, з).

Таким образом, функциональное разделение зооидов колонии изначально стало залогом успешного развития группы. Родовое разнообразие мшанок с тремадока стабильно повышалось (рис. 2), достигнув пика в конце сандбья – начале

катия [3, 4]. Уже на первом этапе эволюции группы появились различные формы колоний (ветвистые, двуслойно-симметричные, сетчатые, массивные, инкрустирующие) как результат приспособления к гетерогенным условиям водной среды обитания. Наличие в полости автозооидов диа-, цисти-, гемифрагм, гемисепт способствовало регенерации и защите мягкого полипида, развитию мускулатуры венчика щупалец. Это, в свою очередь, обеспечивало питание, а значит, и рост, развитие колонии. У мшанок каждого из существовавших отрядов различные по облику гетерозооиды (мезо-, эксила-, тектизооиды) выполняли единые функции – укрепление колонии и повышение эффективности питания автозооидов. Аканто- и пауростили стали неизменными средствами «пассивной» защиты палео-мезозойских мшанок.

В самом конце ордовика известно крупнейшее массовое вымирание биоты, связанное с похолоданием на планете, изменениями уровня моря, содержания углекислого газа и кислорода в воде, тектонической активностью, увеличением биомассы фитопланктона в катии, служащего пищей организмам-фильтраторам [1, 3, 4, 23]. На мшанках этот глобальный кризис отразился достаточно сильно. Они пережили три волны вымираний (в начале и конце катия, хирнанте), в течение которых исчезло от 16.0% до 22.7% существовавших таксонов родового ранга [3]. Тем не менее все известные с начала ордовика защитные структуры в колониях мшанок передались их потомкам без качественных изменений.

2. Поздний девон – ранний карбон

На протяжении силура – девона среди мшанок продолжали процветать трепостоматы, постепенно уступая экологические ниши фенестратам [5, 19]. Зародившиеся в ордовике защитные структуры сохранялись и модифицировались в колониях стенолематных мшанок, и вместе с тем происходило накопление новых морфологических адаптаций к изменяющимся условиям окружающей среды. Это обусловило всплеск родообразования в живетском веке девонского периода (рис. 2) [1].

В раннем и среднем девоне билатеральный план строения колонии получил широкое распространение у цистопоратных (роды *Sulcoretepora* d'Orbigny, 1849, *Meekopora* Ulrich, 1889) и трепостоматных мшанок (роды *Triznotrypa* Lavrenyjeva, 1997, *Petalotrypa* Ulrich, 1890), а в конце девона и у криптостомат (род *Mysticella* Gorjunova, 2007) (рис. 4, а). Центральные части колоний для повышения их устойчивости, прочности в условиях активной гидродинамики, увеличения диаметра колонии преобразовывались в осевой зооид (роды *Rhabdomeson* Young and Young, 1874, *Ipmorella* Goriunova, 1985), пучок осевых зооидов (роды *Ascopora* Trautschold, 1876, *Strebloascopora* Bassler, 1952, *Eodyscritella* Troizkaya, 1970 (рис. 4, ж)) или расширенную эндозону (род *Rhombotrypella* Nikiforova, 1933, *Nikiforopora* Dunaeva, 1964). Появлялись новые типы гетерозооидов. Структуры, подобные авикуляриям современных хейлостоматных мшанок, – паразооиды установлены у ранне-среднедевонских родов *Fenestrapora* Hall, 1885 и *Mirifenestella* Morozova, 1974, относимых к фенестратам [24].

К концу девона у криптостомат в колониях формировались крупные макроакантостили (род *Rhombopora* Meek, 1872) и/или обильные мелкие микроакантостили. Дифференциация акантостилей по размерам прослеживалась и у трепостомат (например, роды *Dyscritella* Girty, 1911, *Eostenopora* Duncan, 1939). У некоторых мшанок (роды *Atactotoechus* Duncan, 1939, *Eridotrypa* Ulrich, 1893) размеры акантостилей снижались на фоне возрастания их количества на единицу площади колонии. Актинотостили – тип стилей звездчатого строения в поперечном сечении – в разном количестве присутствовали в колониях криптостоматных мшанок (например, роды *Mysticella* (рис. 4, б), *Primorella* Romantchuk and Kiseleva, 1968).

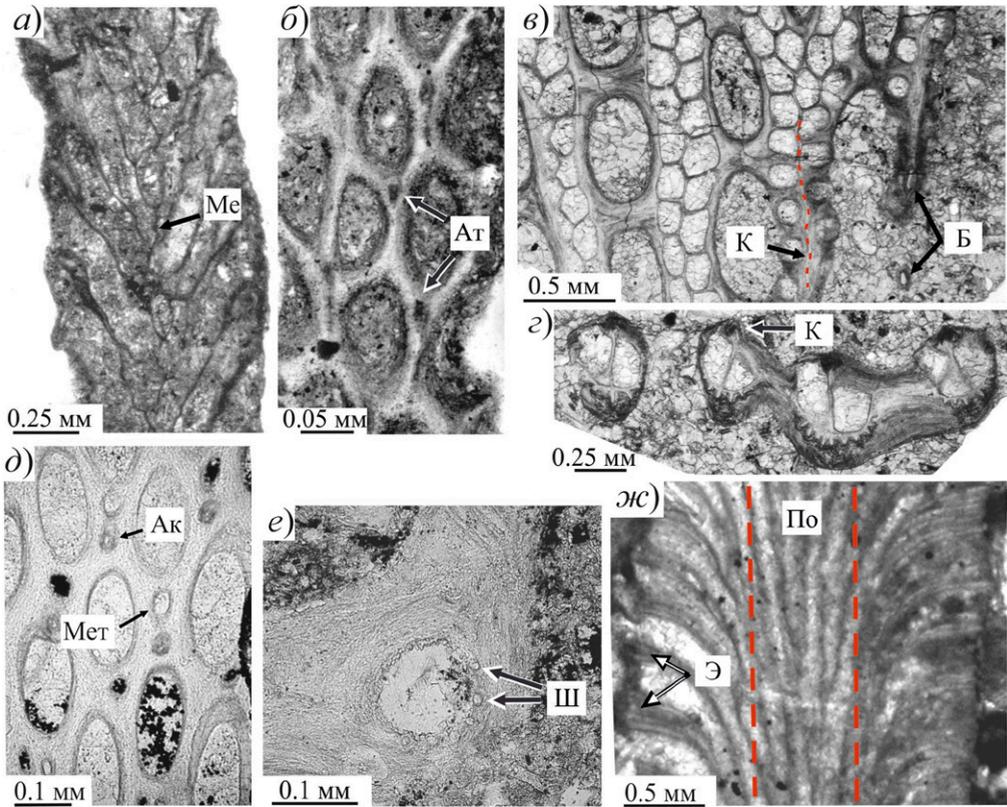


Рис. 4. Структуры в колониях девонских мшанок отрядов Cryptostomata, Trepostomata и Fenestrata (верхний девон, фаменский ярус): а, б – *Mysticella sarcosanta* Gorjunova, 2007, экз. ПИН, № 1613/695; шамамидзорская свита; Армения, г. Бирали-Кузей; в, з – *Spinofenestella abyschevoensis* (Trizna, 1958), экз. КузГПА, № 4а/11.1; топкинский горизонт; Кемеровская область РФ, Абышевский разрез; д – *Nikorovella cavernosa* (Nekhoroshev, 1932), экз. Кельнский университет, GIK 2500 (V4-13b); формация Velbert; Германия, Рейнские горы, скважина Velbert, глубина 103,8–131,5 м; е – *Rectifenestella rudis* (Ulrich, 1890), экз. Льежский университет, Ulg 6-2а; формация Yvoir; Бельгия, Динантский синклиниорий, карьер Nutons; ж – *Eodyscritella clatrata* Troizkaia, 1970, экз. КузГПА, № 4/12а.1; топкинский горизонт; Кемеровская область РФ, Топкинский разрез. Условные обозначения: Ак – акантостиль, Ат – актинотостиль, К – киль, Ме – мезотека, Мет – метазооций, По – пучок осевых зооциев, Э – эксилязооций, Ш – шип

У трепостоматных мшанок рода *Leptotrypella* Vinassa and Regny, 1921 на поверхности колонии формировались шипы [25, 26]. Аналогичные структуры известны и у фенестратных мшанок рода *Rectifenestella* Morozova, 1974 на перистоме апертур (рис. 4, е). У фенестрат автозооиды располагались в один или несколько рядов на прутьях и были разделены киями (рис. 1, в и рис. 4, в, з). Кили являлись продолжением килевой пластинки, образованной путем соприкосновения стенок соседних автозооидов. Их основное предназначение заключалось в регуляции гидродинамической ситуации вокруг автозооидов и усилении эффективности питания [27], дополнительное – в отпугивании хищников. На киях обычно локализовались бугорки, расположенные также и на дорсальной поверхности колонии без какой-либо закономерности. Усиленное разрастание килей приводило к формированию защитных сеток [19, 28]. Защитные сетки получили наибольшее развитие в начале девона в семействе Semicosciniidae Morozova, 1987. К концу девонского периода большинство узкоспециализированных родов семикосциниид исчезло. Данный факт связывают со снижением «давления» хищников [19, 29] и уменьшением активности гидродинамического режима из-за углубления бассейнов вследствие глобальной трансгрессии в раннем карбоне [30]. У некоторых таксонов (род *Minilya* Crockford, 1944) во внешнем скелете колонии развивались микростили, а стенки были пронизаны тубулями, отвечающими за сообщение между всеми структурными единицами колонии. Бугорки, шипики, микростили выполняли защитную функцию [1].

В конце фаменского века позднего девона зафиксировано крупнейшее массовое вымирание – событие Хангенберг [8, 31]. Среди вызвавших его вероятных причин обсуждаются изменение климата [32–35], глобальная аноксия [36, 37], трансгрессивно-регрессивная цикличность, вулканизм и геотектонические процессы раннего этапа герцинского орогенеза [38–40]. Исчезновение многих пелагических и гемипелагических организмов сказалось на пищевых цепях, вызвав тем самым значительные изменения в составе и структуре всех экосистем, включая бентосные сообщества [41]. На мшанках Хангенбергский кризис практически не сказался, поскольку исчезновение 14.8 % родов от всех существовавших в конце девонского периода было скомпенсировано интенсивным ростом таксономического разнообразия уже в раннем карбоне (позднее турне-визе), в котором они пережили очередной расцвет [42].

В рассматриваемый отрезок времени у мшанок сохранялись основные эволюционные тренды, первоначально проявившиеся в ордовике. Они были направлены на усиление питания (кили, метазооиды), повышение прочности колоний (осевой зооид, пучок осевых зооидов, широкая эндозона), отпугивание хищников (паразооиды, микро- и актиностили, защитные сетки). Среди защитных структур происходило увеличение их размеров или количества на единицу площади, степени их дифференциации (мелкие и крупные защитные структуры в пределах одной колонии), изменение сочетаний того или иного типа гетерозоида и стилия в этих пределах. Там стали появляться таксоны с двумя типами стилей. Появление новых образований (мета-, паразооидов, актино-, микростилей) было направлено на компенсацию негативного воздействия абиотических и биотических факторов среды.

3. Пермь

В позднем палеозое во всех морях планеты господствовали фенестраты. Их эволюция шла по пути увеличения количества рядов автозооидов на пруте (рис. 5, б, з) разнообразия форм колоний (перистые, лиро-, винтообразные и др.), обилия бугорков на обеих сторонах колонии (например, роды *Pseudopolypora* Morozova and Lisitsyn, 1996, *Mackinneyella* Morozova and Lisitsyn, 1996). Вероятно, возраставшее количество автозооидов на прутьях и увеличение размера их апертур было коррелятивно связано с уменьшением на рубеже девона-карбона количества и разнообразия фитопланктона (зеленых водорослей, диатомей, цианобактерий, акритархов), являвшегося пищей для мшанок [43, 44]. Некоторые авторы связывают изменения в биомассе фитопланктона с концентрацией углекислого газа или со сменой теплого климата среднего палеозоя на более прохладный в конце эры [45, 46]. Количество микростилей у многих родов, например, *Mackinneyella*, также возрастало (рис. 5, в).

В колониях каменноугольно-пермских мшанок отряда Fenestrata были широко представлены кавернозооиды, циклозооиды, которые рассматриваются как аналоги авикулярий хейлостоматных или элеозооидов циклостоматных мшанок [24, 47, 48]. Циклозооиды ископаемых мшанок – полушаровидные скелетные структуры с тонкими стенками (рис. 5, з). Увеличение их размеров и количества в колониях каменноугольно-пермских мшанок рода *Shulgapora* Termier and Termier, 1971 можно связать с изменениями в структуре пищевых цепей и возросшей потребностью в защите от разнообразных хищников, населявших позднепалеозойские моря Земли [49]. Кавернозооиды известны у единственного рода *Cavernella* Morozova, 1974 со среднего девона [50], но максимальное видообразование этого рода пришлось на пермский период [24]. Кавернозооиды представляли собой удлиненные одиночные структуры грушевидной формы, локализованные в углах перекалин на дорсальной стороне колонии (рис. 5, д). Аналогичными структурами по функциональности в колониях криптостоматной мшанки *Nudymiella* Gorjunova, 1985, видимо, были аллозооиды [51].

У криптостомат и трепостомат в пермском периоде проявилась тенденция возрастания размеров, количества и дифференциации стилей. Например, трепостоматные мшанки рода *Rhombotrypella* отличаются сочетанием крупных макроакантостилей и обилия мелких микроакантостилей в пределах одной колонии (рис. 5, е, ж). Крипостоматный род *Rhombopora* характеризуется крупными макроакантостилями и многочисленными микроакантостилями.

В конце перми вымерли все фенестраты [1], родовое разнообразие трепостомат и криптостомат существенно снизилось (рис. 2). Последняя криптостоматная мшанка рода *Tebitopora* Hu, 1984 исчезла в середине триаса; единичные трепостоматы дожили до конца триасового периода. Единственный сохранившийся палеозойский отряд Cyclostomata испытал расцвет в юрском периоде. В конце юры появились первые хейлостоматы (рис. 2) рода *Pyriporopsis* Pohowsky, 1973 [2].

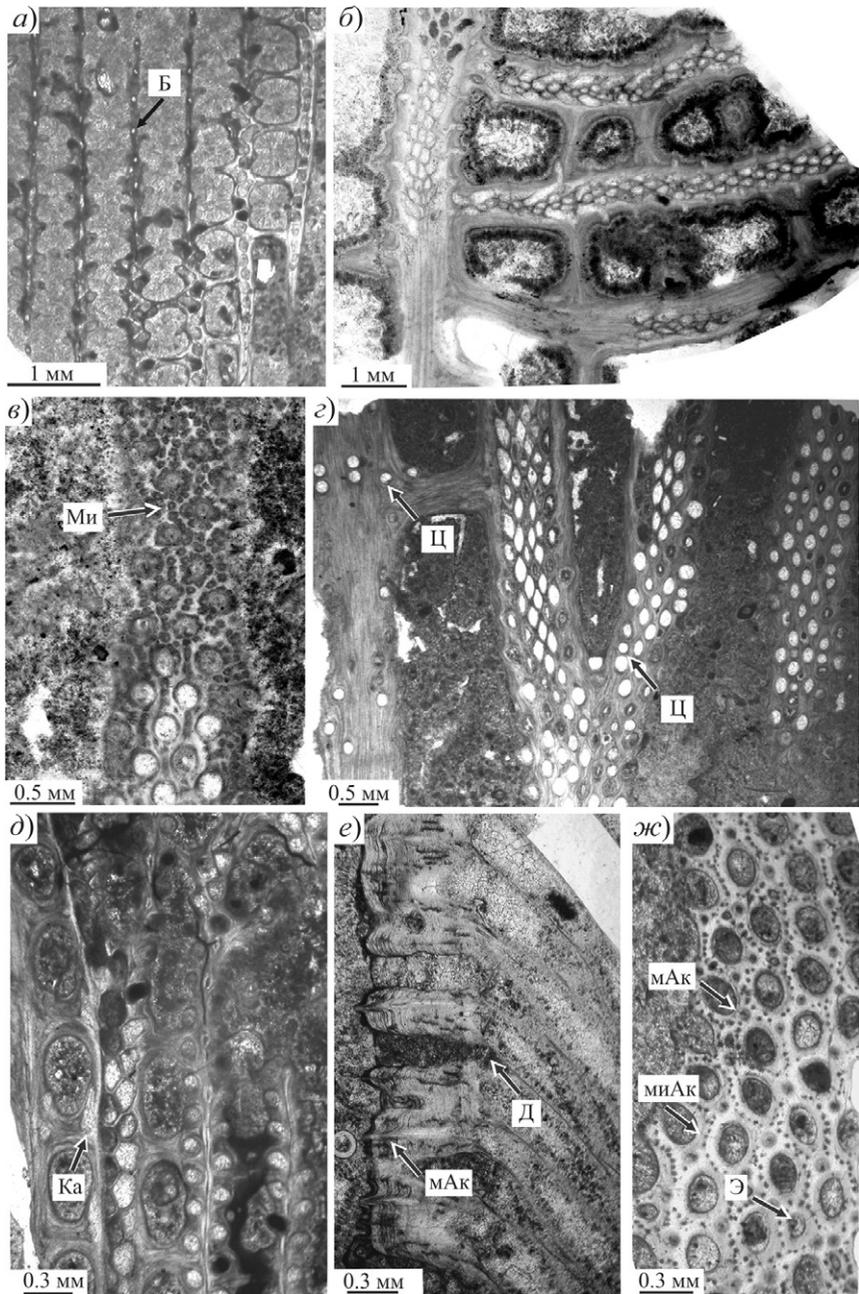


Рис. 5. Структуры в колониях пермских мшанок отрядов Fenestrata и Trepostomata (приуральский отдел перми, сакмарский ярус; РФ, Башкирия): а – *Spinofenestella quadratorpaeformis* (Schulga-Nesterenko, 1941), экз. СибГИУ, № 12/31; карьер Шахтау; б – *Trataucladia noinskyi* (Schulga-Nesterenko, 1941), экз. ПИН, № 2985/718; г. Юрактау; в – *Mackinneyella ornamentata* (Schulga-Nesterenko, 1941), экз. ПИН, № 2985/474; г. Торатау; г – *Shulgapora pseudokolvae* (Schulga-Nesterenko, 1952), экз. ПИН, № 613/541; Кузьминовский массив, скважина 102/21; д – *Cavernella cavifera* (Schulga-Nesterenko, 1939), экз. СибГИУ, № 12/30; г. Куштау; е, ж – *Rhombotrypella composita* Nikiforova, 1939, экз. СибГИУ, № 12/29; карьер Шахтау. Обозначения: Б – бугорок, Д – диафрагма, Ка – кавернозооций, Ми – микростиль, мАк – макроакантостиль, миАк – микроакантостиль, Ц – циклозооций, Э – эксилзооций

Позднекаменноугольный высокий уровень Мирового океана в начале перми сменился серией низких уровней моря на фоне периодов похолодания. Сакмарский век – время быстрых климатических изменений [52], сменившееся глобальной аридизацией климата, начиная с артинского века, до конца перми. На фоне чередования циклов оледенения и таяния ледников изменялся уровень Мирового океана, что периодически приводило к возникновению изолированных бассейнов и изменению состава мшанковой фауны [53]. В пермский период биота Земли достигла наивысшего развития после позднедевонского кризиса и снова испытала массовое вымирание на границе перми – триаса [54, 55]. Среди основных причин позднепермского массового вымирания обсуждаются климатические изменения, трапповый вулканизм, аноксия [53, 56, 57]. Эволюция мшанок на этом временном отрезке совпадает с общей тенденцией в биосфере.

Разнообразие защитных структур стенолемат на начало перми достигло своего максимума. Принципиально новые структуры не появлялись, изменялись лишь количественные параметры уже существовавших. Помимо стилей, выступающих над поверхностью колонии как частокол и тем самым «пассивно» отпугивающих хищников, в колониях отдельных каменноугольно-пермских мшанок присутствовали особые гетерозооиды (цикло-, каверно-, аллозооиды). Последние предположительно могли уже активно защищать колонии от засыпания осадком, от личинок, от нападающих организмов в результате вращательных движений, подобно авикуляриям у современных хейлостомат.

4. Мел

Хейлостоматы (рис. 1, 2) появились в поздней юре (около 160 млн лет назад), но максимальной радиации достигли в конце мела [9, 58] (рис. 2). Основными защитными элементами колоний у них были авикулярии – гетерозооиды с редуцированным полилипидом и развитой крышечкой, мышцами-ретракторами для поддержки, фиксации колонии на мягком грунте, очистки от частиц поступающего осадка и/или личинок (путем создания дополнительного тока воды), мелких беспозвоночных, нападающих животных и локомоции [47, 48, 59]. По современным представлениям в зависимости от формы, размеров и локализации авикулярии подразделяются на четыре типа: адвентивные (например, род *Beisselina* Canu, 1913), относительно мелкие межзооидальные (род *Rhagasostoma* Koschinsky, 1885), крупные викарирующие (рис. 6,) и вибракулы [47, 48, 60]. Адвентивные авикулярии считаются высокоспециализированными. Формируясь на стенках автозооидов, они подразделяются на стебельчатые или сидячие [47, 48]. Согласно исследованию [61], количество авикулярий напрямую зависит от хищников и питания: чем их больше, тем выше плотность авикулярий на единицу площади колонии. Вибракулы являются наиболее модифицированными авикуляриями с очень длинной мандибулой (сетой), которая у отдельных видов совершает вращательные движения [60, 62]. В расположении вибракул не определена какая-либо закономерность. Например, у разных видов свободноживущих мшанок рода *Lunulites* Lamarck, 1816 они локализованы либо упорядоченными радиальными рядами, либо хаотично (рис. 6, а) [59]. На распределение вибракул у лунулитесов по площади колонии в большей мере, очевидно, влияли географическая изоляция и локальные факторы окружающей среды.

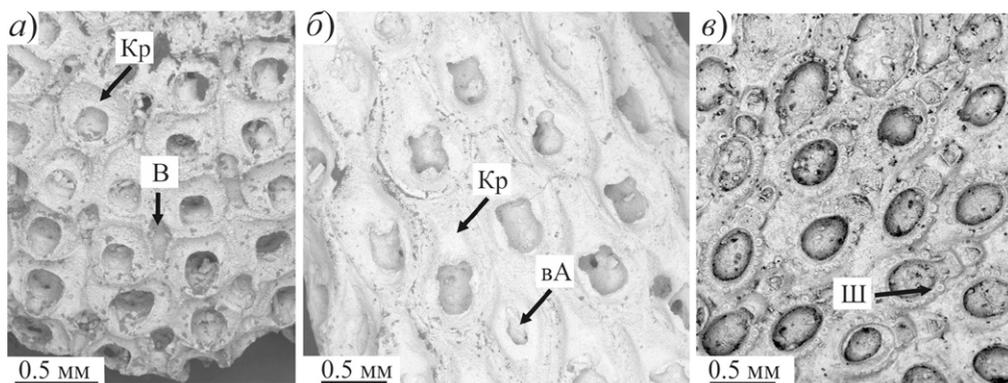


Рис. 6. Структуры в колониях меловых мшанок отряда Cheilostomata (верхний мел, нижний маастрихт, карсунская свита; Самарская область РФ, окрестности с. Подвалье): *a* – *Lunulites pseudocretacea* Håkansson et Voigt, 1996, экз. СибГИУ, № 12/32; *б* – *Rhagasostoma rowei* (Brydone, 1906), экз. СибГИУ, № 12/33; *в* – *Biaviculigera* sp., экз. СибГИУ, № 12/34. Обозначения: В – вибраккула, ВА – викарирующий авикулярный, Кр – криптоцист, Ш – щит

Кенозооиды (род *Acoscinopectora* Voigt, 1956) – мелкие зооиды между автозооидами, выполняют функции фиксации на субстрате, придания большей жесткости колонии и пассивной защиты [60, 62]. Дополнительной защитой мягкого полипида выступает наличие криптоциста. Эта (рис. 6, *a*, *б*) пластинка на фронтальной мембране цистида развивается из стенки автозооида. У некоторых хейлостомат она становилась очень массивной, превращаясь в фронтальный щит (роды *Porella* Gray, 1848, *Rhamphostomella* von Lorenz, 1886) [1, 63].

Массовое вымирание биоты на границе мела – палеогена незначительно повлияло на мшанки. В эоцене у хейлостомат отмечается новая экспансия, не достигающая по своим значениям позднемеловой [1, 9, 64]. В мезозое завершилось принципиальное обновление таксономического состава мшанок и соответственно набора защитных структур колоний. Все защитные элементы, свойственные стенолематным мшанкам с «твердыми» кальцитовыми или арагонитовыми колониями, исчезли. У гимнолемат структуры «пассивной» защиты (криптоцист, фронтальный щит) второстепенны по сравнению с гетерозооидами (авикуляриями), обеспечивающими комплексную «активную» оборону от большинства неблагоприятных факторов. Вероятно, развитие разных типов авикуляриев связано с первостепенной необходимостью защиты «мягких» колоний мшанок из отряда Cheilostomata.

5. Обсуждение

На протяжении палеозоя мшанки характеризовались высоким родовым разнообразием [1, 5], значительно снизившимся к концу эры (рис. 2). Появившиеся в ордовике отряды Trepostomata, Cryptostomata, Fenestrata обладали изначально удачными в эволюционном отношении полиморфами, позволившими им просуществовать несколько сотен миллионов лет до конца перми (фенестраты) или триаса (криптостоматы, трепостоматы). Среди «долговременных» гетерозооидов можно отметить мезо-, текти-, мета-, эксилязооиды, которые эволюционировали только в плане изменения размеров и/или количества на единицу площади

колонии (табл. 1). На протяжении палеозоя в колониях отдельных мшанок периодически появлялись относительно «кратковременные» полиморфы, сохраняющиеся несколько десятков миллионов лет: лепто-, цикло-, алло-, кавернозоиды. В конце мезозоя – начале кайнозоя мшанки отличались высокой степенью диверсификации (рис. 2), обновив отрядный состав появлением Cheilostomata с авикуляриями. У большинства палеозойских мшанок совместно с гетерозооидами в колониях развивались стили одного или двух типов: аканто-, микро-, актиното-, пауро-, макроаканто-, микроакантостили. Сочетание конкретного гетерозоида и стили/стилей обеспечивало эффективную защиту от разных факторов окружающей среды. Начиная с мезозойской эры за защиту колоний, усиленную у некоторых родов наличием шипов или фронтальных щитов, отвечали авикулярии разных модификаций (табл. 1).

Возникновение и преобразование защитных структур у ископаемых мшанок на тех или иных интервалах геологического прошлого можно рассматривать как фиксацию изменений, произошедших в биосфере Земли. Эти изменения являлись результатом воздействия взаимосвязанных и взаимообусловленных физических явлений и/или процессов: изменения уровня Мирового океана, потепления/похолодания, оледенения/таяния ледниковых шапок, вулканизма, тектонических подвижек континентальных блоков, концентрации углекислого газа в атмосфере и воде, аноксии и пр. Любой процесс глобального воздействия запускал череду других, кардинально изменяющих в итоге состав биоты планеты (после массовых вымираний) или существенно ее корректирующих появлением новых родов, семейств, отрядов во многих группах организмов, включая мшанки. Новые таксоны отличались иным гетерозоидом и стилем либо сочетанием гетерозоида и стили/стилей в одной колонии. Однако эволюционные кризисы у мшанок не всегда совпадали с глобальными биосферными тенденциями [1, 5, 19, 42].

Эволюционный успех каждого из рассмотренных выше отрядов связан со структурными особенностями колоний, запасом адаптивных возможностей, реализующихся в изменяющихся условиях окружающей среды, пластичностью группы [5, 19, 24]. Лимитирующими факторами для появления новых типов полиморф и/или стилией выступали как глобальные процессы, например, трансгрессия и регрессия, изменение уровня Мирового океана, изменение климата, так и локальные, в первую очередь количество пищевых ресурсов, температура воды, соленость, глубина, особенности субстрата [7, 65]. Трансгрессивные пики, повышение уровня моря совпадают с диверсификацией [66, 67] и экспансией мшанок (например, визейский век раннего карбона, сакмарский век ранней перми, сенманский век позднего мела). Также глобальные потепления положительно влияли на эволюцию группы [68]. Вспышки в увеличении биомассы фитопланктона в прогретых, освещенных морских водах напрямую способствовали появлению новых адаптаций и новых таксонов родового и семейственного рангов у мшанок [6]. Определенную роль играли наличие хищников и конкуренция с другими бентосными группами [19]. Очевидно, защита от нападающих животных и очистка колоний от осадка являлись важными процессами в жизни мшанок, поскольку возникновение авикулярий и подобных им структур (лепто-, пара-, алло-, кавернозоидов) происходило неоднократно, причем у разных отрядов: в раннем ордовике и раннем девоне у фенестрат, в середине карбона у криптостомат, в начале мела у хейлостомат.

Проведенный анализ защитных структур у стенолематных и гимнолематных мшанок показал, что на протяжении нескольких сотен миллионов лет они придерживались конкретных стратегий выживания, направленных на улучшение питания, укрепление колонии, снижение давления воды, препятствие поеданию другими организмами и засыпанию осадком (табл. 1).

Табл. 1

Разнообразие защитных структур ископаемых мшанок

Функциональная группа	Структура	Время появления/исчезновения структуры	Род (пример)	Отряд
1	2	3	4	5
Снижение давления воды на колонию	Кили, защитные сетки	$O_3.S_1/P_3$	Semicoscinium Hemitrypa	Fenestrata
	Гребни	D_1/P_3	Minussina	Trepostomata
Pseudonematopora			Cryptostomata	
Увеличение площади за счет возрастания расстояния между апертурами автозооидов; повышение устойчивости и целостности колонии, ее укрепление	Пучок осевых зооциев, расширенная эндозона	D_2/P_3	Pseudoascopora	Cryptostomata
			Eodyscritella Rhombotrypella	Trepostomata
	Осевой зооцией	O_3/P_3	Pseudorhabdomeson	Cryptostomata
	Мезотека	O_1/P_3	Prophyllodictya	Cryptostomata
			Triznotrypa	Trepostomata
	Мезозооцией	O_1/P_3	Hallopora Amplexopora	Trepostomata
	Эксилязооцией	O_1/T_3	Monotrypa Dyscritella	Trepostomata
	Тектизооцией	O_1/P_3	Nematotrypa Clausotrypa	Cryptostomata
Метазооцией	O_2/P_3	Helopora Nikiforovella	Cryptostomata	
Физическая защита полипида, прикрепление мускулатуры	Диафрагмы	O_1/T_3	Monotrypa Mesotrypa	Trepostomata
	Гемифрагмы	O_1/P_3	Nematotrypa	Cryptostomata
	Цистифрагмы	O_1/T_3	Prasopora	Trepostomata
	Гемисепта	O_1/P_3	Fabifenestella	Fenestrata
			Paranicklesopora	Cryptostomata
Криптоцист, фронтальный щит	$K_1/ныне$	Desmacystis Rhamphostomella	Cheilostomata	
Отпугивание хищников	Акантостили	O_1/T_3	Leioclema	Trepostomata
	Микроакантостили	O_2/P_3	Rhombotrypella	Trepostomata
			Polypora	Fenestrata
	Макроакантостили		Rhombopora	Cryptostomata
	Rhombotrypella		Trepostomata	
	Пауростили	O_1/P_3	Nematotrypa Prophyllodictya	Cryptostomata
	Микростили	S_1/P_3	Rectifenestella	Fenestrata
Актинотостили	D_1/P_3	Mysticella Primorella	Cryptostomata	

Продолжение табл. 1

1	2	3	4	5
Физическая защита от хищников, очистка от осадка, личинок, мелких беспозвоночных	Авикулярии разных типов	$K_1/\text{ныне}$	Lunulites Beisselina Rhagasostoma	Cheilostomata
		D_1/D_1	Fenestrapora	Fenestrata
	Кавернозооэци	D_2/P_2	Cavernella	Fenestrata
	Циклозооэци	C_2/P_2	Shulgapora	Fenestrata
	Аллозооэци	C_2/C_2	Nudymiella	Cryptostomata
	Паразооэци	D_1/D_2	Mirifenestella	Fenestrata
Лептозооэци	O_1/P_1	Phylloporina Kallodictyon	Fenestrata	

Все палеозойские таксоны относились к прикрепленному бентосу, и у них вырабатывались только «пассивные» средства защиты. В первую очередь за счет пластичности внешнего облика и внутреннего плана строения колоний (билатеральный, осевой и др.), поверхностных разрастаний отдельных частей колонии (килей, бугорков, защитных сеток) мшанки адаптировались к разнообразным гидродинамическим условиям (от активных в мелководной зоне до слабых на глубинных участках). Гидродинамическая ситуация была коррелятивно связана с освещенностью, глубиной, температурой, пищевыми ресурсами, давлением воды и другими характеристиками морского бассейна. Узкая специализация автозооидов на питание послужила толчком для развития разных типов гетерозооидов в колониях. В раннем палеозое гетерозооиды (мезо-, эксия-, текти-, метазооиды) отвечали за укрепление и стабилизацию колонии, увеличение расстояния между автозооидами для повышения эффективности питания колонии в целом (табл. 1). Раннеордовикские мшанки обладали преимущественно массивной или инструстирующей колониями и обитали на мягком субстрате [69]. С конца ордовика количество вертикально ориентированных форм колоний, произрастающих на твердом субстрате, стабильно увеличивалось [15, 24, 51]. В среднем и позднем палеозое отдельные виды гетерозооидов (каверно-, цикло-, аллозооиды) обеспечивали, вероятно, более прогрессивную «активную» защиту от хищников, очистку колонии от осадка и личинок беспозвоночных. Наличие на поверхности или в экзозоне колоний разного вида стилей (аканто-, актиното-, микро-, пауростилей) отпугивало хищников. Появление/исчезновение того или иного вида гетерозооида, стилия или их новых сочетаний, очевидно, было связано с изменяющимися условиями окружающей среды, наиболее резко проявлявшимися на кризисных рубежах развития биосферы (в конце ордовика, перми, на границе девона – карбона). На протяжении мезозоя структуры «пассивной» защиты уступили место более прогрессивным структурам «активной» защиты – авикуляриям. Последние выполняли несколько функций: очистительную, отпугивающую, сенсорную, двигательную [47, 48, 60]. Часть мшанок стала подвижным бентосом, что требовало более быстрой и сильной ответной реакции на любое внешнее воздействие.

Заключение

В результате проведенных исследований установлено следующее:

1. Эволюционные преобразования мшанок в значительной степени были ориентированы на возникновение и модификацию разнообразных защитных структур (гетерозооидов, стилей, авикуляриев и вариаций их сочетаний в одной колонии).

2. Палеозойские и мезозойские отряды характеризовались наличием в колониях аналогичных по предназначению полиморф, что, вероятно, было обусловлено сходными лимитирующими факторами среды обитания (в первую очередь уровнем Мирового океана, климатом, объемом пищевых ресурсов, хищниками).

3. В зависимости от функциональности защитные структуры в колониях мшанок можно разделить на пять групп: 1) снижение давления воды, 2) увеличение питающей площади за счет возрастания расстояния между апертурами автозооидов; повышение устойчивости и целостности колонии, ее укрепление, 3) физическая защита полипида, прикрепление мускулатуры, 4) отпугивание хищников, 5) физическая защита от хищников, очистка от осадка, личинок, мелких беспозвоночных.

Благодарности. Исследования проводились при поддержке гранта РФ (проект № 22-27-00030, <https://rscf.ru/project/22-27-00030/>).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Phylum Bryozoa / Schwaha T. (Ed.). Berlin: De Gruyter, 2020. 458 p. <https://doi.org/10.1515/9783110586312>.
2. Taylor P.D., Ernst A. Bryozoans in transition: The depauperate and patchy Jurassic biota // *Palaeogeogr., Palaeoclimatol., Palaeoecol.* 2008. V. 263, No 1–2. P. 9–23. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2008.01.028>.
3. Ernst A. Diversity dynamics of Ordovician Bryozoa // *Lethaia*. 2018. V. 51, No 2. P. 198–206. <https://doi.org/10.1111/let.12235>.
4. Ma J., Taylor P.D., Buttler C.J., Xia F. Bryozoans from the early Ordovician Fenhshiang Formation (Tremadocian) of South China and the early diversification of the phylum // *Sci. Nat.* 2022. V. 109, No 2. Art. 21. <https://doi.org/10.1007/s00114-022-01791-z>.
5. Горюнова Р.В., Марков А.В., Наймарк Е.Б. Эволюция и биогеография палеозойских мшанок: результаты количественного анализа. М.: ГЕОС, 2004. 182 с.
6. Островский А.Н. Эволюция лецитотрофных личинок у морских беспозвоночных на примере мшанок класса Gymnolaemata // *Биосфера*. 2011. Вып. 3, № 2. С. 233–252.
7. McKinney F.K., Jackson J.B.C. Bryozoan Evolution. Boston, MA: Unwin Human, 1989. 238 p.
8. Walliser O.H. Global events in the Devonian and Carboniferous // Walliser O.H. (Ed.) *Global Events and Events Stratigraphy in the Phanerozoic*. Berlin: Springer, 1996. P. 225–250. https://doi.org/10.1007/978-3-642-79634-0_11.
9. Taylor P.D., Waeschenbach A. Phylogeny and diversification of bryozoans // *Palaeontology*. 2015. V. 58, No 4. P. 585–599. <https://doi.org/10.1111/pala.12170>.
10. Hu Z.-X., Spjeldnaes N. Early Ordovician bryozoans from China // *Bull. Soc. Sci. Nat. l'Ouest Fr. Mém.* 1991, Hors-Ser. 1. P. 179–185.
11. Xia F.-S., Zhang S.-G., Wang Z.-Z. The oldest bryozoans: New evidence from the late Tremadocian (early Ordovician) of East Yangtze Gorges in China // *J. Paleontol.* 2007. V. 81, No 6. P. 1308–1326. <https://doi.org/10.1666/04-128.1>.

12. Ma J., Taylor P.D., Xia F., Zhan R. The oldest known bryozoan: *Prophyllodictya* (Cryptostomata) from the lower Tremadocian (Lower Ordovician) of Liujiachang, south-western Hubei, central China // *Palaeontology*. 2015. V. 58, No 5. P. 925–934. <https://doi.org/10.1111/pala.12189>.
13. Fedorov P.V., Koromysova A.V., Martha S.O. The oldest bryozoans of Baltoscandia from the lowermost Floian (Ordovician) of north-western Russia: Two new rare, small and simple species of Revalotrypidae // *PalZ*. 2017. V. 91, No 3. P. 353–373. <https://doi.org/10.1007/s12542-017-0351-y>.
14. Fedorov P.V., Koromysova A.V. New findings of the genus *Revalotrypa*, the oldest bryozoan genus of Baltoscandia, in north-western Russia // *Carnets Geol.* 2019. V. 19, No 11. P. 199–209. <https://doi.org/10.4267/2042/70296>.
15. Астрова Г.Г. История развития, система и филогения мшанок отряда Trepostomata. М.: Наука, 1978. 240 с.
16. Boardman R.S., Buttler C.J. Zooids and extrazooidal skeleton in the order Trepostomata (Bryozoa) // *J. Paleontol.* 2005. V. 79, No 6. P. 1088–1104. [https://doi.org/10.1666/0022-3360\(2005\)079\[1088:ZAESIT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1666/0022-3360(2005)079[1088:ZAESIT]2.0.CO;2).
17. Лаврентьева В.Д. Мшанки подотряда Phylloporinina. М.: Наука, 1985. 101 с.
18. Boardman R.S. The growth and function of skeletal diaphragms in the colony life of lower Paleozoic Trepostomata (Bryozoa) // *J. Paleontol.* 2001. V. 75, No 2. P. 225–240. [https://doi.org/10.1666/0022-3360\(2001\)0752.0.CO;2](https://doi.org/10.1666/0022-3360(2001)0752.0.CO;2).
19. Ernst A. Diversity dynamics and evolutionary patterns of Devonian Bryozoa // *Palaeobiodiversity Palaeoenviron.* 2013. V. 93, No 1. P. 45–63. <https://doi.org/10.1007/s12549-012-0086-4>.
20. Boardman R.S. Mode of Growth and Functional Morphology of Autozooids in Some Recent and Paleozoic Tubular Bryozoa. Ser.: Smithsonian Contributions to Paleobiology. No 8. Washington, DC: Smithsonian Inst. Press, 1971. 51 p. <https://doi.org/10.5479/si.00810266.8.1>.
21. McKinney F.K., Taylor P.D., Lidgard S. Predation on bryozoans and its reflection in the fossil records // Kelley P.H., Kowalewski M., Hansen T.A. (Eds.) *Predator-Prey Interactions in the Fossil Record*. Ser.: Topics in Geobiology. Vol. 20. Boston: Springer, 2003. P. 239–261. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0161-9_10.
22. Lidgard S. Predation on bryozoan colonies: Taxa, traits and trophic groups // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2008. V. 359. P. 117–131. <https://doi.org/10.3354/meps07322>.
23. Servais T., Harper D.A.T. The Great Ordovician Biodiversification Event (GOBE): Definition, concept and duration // *Lethaia*. 2018. V. 51, No 2. P. 151–164. <https://doi.org/10.1111/let.12259>.
24. Морозова И.П. Мшанки отряда Fenestellida (морфология, система, историческое развитие). М.: ГЕОС, 2001. 177 с.
25. Boardman R.S. Trepostomatous Bryozoa of the Hamilton Group of New York State. Ser.: U.S. Geological Survey Professional Paper. No 340. Washington, DC: U. S. Gov. Print. Off., 1960. 87 p. <https://doi.org/10.3133/pp340>.
26. Ernst A. Trepostome bryozoans from the Lower-Middle Devonian of NW Spain // *Riv. Ital. Paleontol. Stratigr.* 2010. V. 116, No 3. P. 283–308. <https://doi.org/10.13130/2039-4942/6391>.
27. Suárez Andrés J.L., Wyse Jackson P.N. Feeding currents: A limiting factor for disparity of Palaeozoic fenestrate bryozoans // *Palaeogeogr., Palaeoclimatol., Palaeoecol.* 2015. V. 433. P. 219–232. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2015.05.015>.
28. McKinney F.K. Paleobiological interpretation of some skeletal characters of Lower Devonian fenestrate Bryozoa, Prague Basin, Czechoslovakia // *Bryozoa: Present and Past:*

- Proc. 7th Int. Conf. on Bryozoa / Ross J.R.P. (Ed.). Bellingham, WA: West. Wash. Univ., 1987. P. 161–168.
29. Sallan L.C., Kammer T.W., Ausich W.I., Cook L.A. Persistent predator-prey dynamics revealed by mass extinction // PNAS. 2011. V. 108, No 20. P. 8335–8338. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100631108>.
 30. Haq B.U., Schutter S.R. A chronology of Paleozoic sea-level changes // Science. 2008. V. 322, No 5898. P. 64–68. <https://doi.org/10.1126/science.116164>.
 31. Kaiser S.I., Aretz M., Becker R.T. The global Hangenberg Crisis (Devonian–Carboniferous transition): Review of a first-order mass extinction // Becker R.T., Königshof P., Brett C.E. (Eds.) Devonian Climate, Sea Level and Evolutionary Events. Ser.: GSL Special Publications. V. 423. Geol. Soc. London, 2016. P. 387–439. <https://doi.org/10.1144/SP423.9>.
 32. Streef M., Caputo M.V., Loboziak S., Melo J.H.G. Late Frasnian-Famennian climates based on palynomorph analyses and the question of the Late Devonian glaciations // Earth-Sci. Rev. 2000. V. 52, No 1–3. P. 121–173. [https://doi.org/10.1016/S0012-8252\(00\)00026-X](https://doi.org/10.1016/S0012-8252(00)00026-X).
 33. Myrow P.M., Ramezani J., Hanson A.E., Bowring S.A., Racki G., Rakociński M. High-precision U–Pb age and duration of the latest Devonian (Famennian) Hangenberg event, and its implications // Terra Nova. 2014. V. 26, No 3. P. 222–229. <https://doi.org/10.1111/ter.12090>.
 34. Cole D., Myrow P.M., Fike D.A., Hakim A., Gehrels G.E. Uppermost Devonian (Famennian) to Lower Mississippian events of the western U.S.: Stratigraphy, sedimentology, chemostratigraphy, and detrital zircon geochronology // Palaeogeogr., Palaeoclimatol., Palaeoecol. 2015. V. 427. P. 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2015.03.014>.
 35. Lakin J.A., Marshall J.E.A., Troth I., Harding I.C. Greenhouse to icehouse: A biostratigraphic review of latest Devonian–Mississippian glaciations and their global effects // Becker R.T., Königshof P., Brett C.E. (Eds.) Devonian Climate, Sea Level and Evolutionary Events. Ser.: GSL Special Publications. V. 423. Geol. Soc. London, 2016. P. 439–464. <https://doi.org/10.1144/SP423.12>.
 36. Becker R.T., Kaiser S.I., Aretz M. Review of chrono-, litho- and biostratigraphy across the global Hangenberg Crisis and Devonian–Carboniferous Boundary // Becker R.T., Königshof P., Brett C.E. (Eds.) Devonian Climate, Sea Level and Evolutionary Events. Ser.: GSL Special Publications. V. 423. Geol. Soc. London, 2016. P. 355–386. <https://doi.org/10.1144/SP423.10>.
 37. Formolo M.J., Riedinger N, Gill B.C. Geochemical evidence for euxinia during the Late Devonian extinction events in the Michigan Basin (U.S.A.) // Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol. 2014. V. 414. P. 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2014.08.024>.
 38. Sandberg C.A., Morrow J.R., Ziegler W. Late Devonian sea-level changes, catastrophic events, and mass extinctions // Koeberl C., MacLeod K.G. (Eds.) Catastrophic Events and Mass Extinctions: Impacts and Beyond. Ser.: GSA Special Papers. V. 356. Boulder, CO: Geol. Soc. Am., 2002. P. 473–487. <https://doi.org/10.1130/0-8137-2356-6.473>.
 39. Kaiser S.I., Steuber T., Becker R.T. Environmental change during the Late Famennian and Early Tournaisian (Late Devonian–Early Carboniferous): Implications from stable isotopes and conodont biofacies in southern Europe // Geol. J. 2008. V. 43, No 2–3. P. 241–260. <https://doi.org/10.1002/gj.1111>.
 40. Carmichael S.K., Waters J.A., Batchelor C.J., Coleman D.M., Suttner T.J., Kido E., Moore L.M., Chadimová L. Climate instability and tipping points in the Late Devonian: Detection of the Hangenberg Event in an open oceanic island arc in the Central Asian Orogenic Belt // Gondwana Res. 2016. V. 32. P. 213–231. <https://doi.org/10.1016/j.gr.2015.02.009>.
 41. Sallan L.C., Coates M.I. End-Devonian extinction and a bottleneck in the early evolution of modern jawed vertebrates // PNAS. 2010. V. 107, No 22. P. 10131–10135. <https://doi.org/10.1073/pnas.091400010>.

42. Толоконникова З.А. Фаменско-турнейские мшанки Евразии. Краснодар: Кубанский гос. ун-т, 2022. 348 с.
43. Schwark L., Emt P. Sterane biomarkers as indicators of Palaeozoic algal evolution and extinction events // *Palaeogeogr., Palaeoclimatol., Palaeoecol.* 2006. V. 240, No 1–2. P. 225–236. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2006.03.050>.
44. Strother P.K. A speculative review of factors controlling the evolution of phytoplankton during Paleozoic time // *Rev. Micropaléontol.* 2008. V. 51, No 1. P. 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.revmic.2007.01.007>
45. Fielding C.R., Frank T.D., Isbell J.I. The late Paleozoic ice age – a review of current understanding and synthesis of global climate patterns // Fielding C.R., Frank T.D., Isbell J.I. (Eds.) *Resolving the Late Paleozoic Ice Age in Time and Space*. Ser.: GSA Special Papers. V. 441. Boulder, CO: Geol. Soc. Am., 2008. P. 343–354. [https://doi.org/10.1130/2008.2441\(24\)](https://doi.org/10.1130/2008.2441(24)).
46. Bishop J.W., Montañez I.P., Gulbranson E.L., Brenckle P.L. The onset of mid-Carboniferous glacioeustasy: Sedimentologic and diagenetic constraints, Arrow Canyon, Nevada // *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 2009. V. 276, No 1–4. P. 217–243. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2009.02.019>.
47. Carter M.C., Gordon D.P., Gardner J.P.A. Polymorphism and variation in modular animals: Morphometric and density analyses of bryozoan avicularia // *Mar. Ecol.: Prog. Ser.* 2010. V. 399. P. 117–130. <https://doi.org/10.3354/meps08348>.
48. Carter M.C., Gordon D.P., Gardner J.P.A. Polymorphism and vestigiality: Comparative anatomy and morphology of bryozoan avicularia // *Zoomorphology*. 2010. V. 129, No 3. P. 195–211. <https://doi.org/10.1007/s00435-010-0113-9>.
49. Толоконникова З.А., Иценко А.А. Эволюционный морфогенез позднепалеозойских мшанок рода *Shulgapora* Termier & Termier, 1971 // *Ученые записки Казанского университета. Серия естественные науки*. 2022. Т. 164, кн. 3. С. 501–513. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2022.3.501-513>.
50. Suárez Andrés J.L., Ernst A. Lower–Middle Devonian Fenestellidae (Bryozoa) of NW Spain: Implications for fenestrate palaeobiogeography // *Facies*. 2015. V. 61, No 1. Art. 415. <https://doi.org/10.1007/s10347-014-0415-3>.
51. Горюнова П.В. Морфология, система и филогения мшанок (отряд Rhabdomesida). М.: Наука, 1985. 52 с.
52. Eyles N., Mory A.J., Backhouse J. Carboniferous–Permian palynostratigraphy of west Australian marine rift basins: Resolving tectonic and eustatic controls during Gondwanan glaciations // *Palaeogeogr., Palaeoclimatol., Palaeoecol.* 2002. V. 184, No 3–4. P. 305–319. [https://doi.org/10.1016/S0031-0182\(02\)00260-2](https://doi.org/10.1016/S0031-0182(02)00260-2)
53. Гилмор Э.Г., Морозова И.П. Биogeография позднепермских мшанок // *Палеонтологический журнал*. 1999. № 1. P. 38–53.
54. Alroy J., Aberhan M., Bottjer D.J., Footer M., Fürsich F.T., Harries P.J., Hendy A.J.W., Holland S.M., Ivany L.C., Kiessling W., Kosnik M.A., Marshall C.R., McGowan A.J., Miller A.I., Olszewski T.D., Patzkowsky M.E., Peters S.E., Villier L., Wagner P.J., Bonuso N., Borkow P.S., Brenneis B., Clapham M.E., Fall L.M., Ferguson C.A., Hanson V.L., Krug A.Z., Layou K.M., Leckey E.H., Nürnberg S., Powers C.M., Sessa J.A., Simpson C., Tomašových A., Visaggi C.C. Phanerozoic trends in the global diversity of marine invertebrates // *Science*. 2008. V. 321, No 5885. P. 97–100. <https://doi.org/10.1126/science.1156963>.
55. Erwin D.H. *The Great Paleozoic Crisis: Life and Death in the Permian*. New York, NY: Columbia Univ. Press, 1993. 327 p.
56. Bowring S.A., Erwin D.H., Jin Y.G., Martin M.W., Davidek K., Wang W. U/Pb zircon geochronology and tempo of the End-Permian mass extinction // *Science*. 1998. V. 280, No 5366. P. 1039–1045. <https://doi.org/10.1126/science.280.5366.1039>.

57. *Hallam A., Wignall P.B.* Mass extinctions and sea-level changes // *Earth-Sci. Rev.* 1999. V. 48, No 4. P. 217–250. [https://doi.org/10.1016/S0012-8252\(99\)00055-0](https://doi.org/10.1016/S0012-8252(99)00055-0).
58. *Taylor P.D.* Bioimmured ctenostomes from the Jurassic and the origin of the cheilostome Bryozoa // *Palaeontology.* 1990. V. 33, Pt 1. P. 19–34.
59. *Cook P.L., Chimonides P.J.* A short history of the Lunulite bryozoa // *Bull. Mar. Sci.* 1983. V. 33, No 3. P. 566–581.
60. *Serova K.M., Belikova E.V., Kotenko O.N., Vishnyakov A.E., Bogdanov E.A., Zaitseva O.V., Shunatova N.N., Ostrovsky A.N.* Reduction, rearrangement, fusion, and hypertrophy: evolution of the muscular system in polymorphic zooids of cheilostome Bryozoa // *Org. Divers. Evol.* 2022. V. 22, No 4. P. 925–964. <https://doi.org/10.1007/s13127-022-00562-y>.
61. *O’Dea A., Håkansson E., Taylor P.D., Okamura B.* Environmental change prior to the K–T boundary inferred from temporal variation in the morphology of cheilostome bryozoans // *Palaeogeogr., Palaeoclimatol., Palaeoecol.* 2011. V. 308, No 3–4. P. 502–512. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2011.06.001>.
62. *Schack C.R., Gordon D.P., Ryan K.G.* Modularity is the mother of invention: A review of polymorphism in bryozoans // *Biol. Rev.* 2019. V. 94, No 3. P. 773–809. <https://doi.org/10.1111/brv.12478>.
63. *Gordon D.P., Voigt E.* The kenozooidal origin of the ascophorine hypostegal coelom and associated frontal shield // *Bryozoans in Space and Time: Proc. 10th Int. Conf. / Gordon D.P., Smith A.M., Grant-Mackie J.A. (Eds.).* Wellington: Natl. Inst. Water Atmos. Res., 1996. P. 89–107.
64. *McKinney F.K., Taylor P.D.* Bryozoan generic extinctions and originations during the last one hundred million years // *Palaeontol. Electron.* 2001. V. 4, No 1. Art. 3. URL: http://palaeo-electronica.org/2001_1/bryozoan/issue1_01.htm.
65. *Nelson C.S., Hyden F.M., Keane S.L., Leask W.L., Gordon D.P.* Application of bryozoan growth-form studies in facies analysis of non-tropical carbonate deposits in New Zealand // *Sediment. Geol.* 1988. V. 60, No 1–4. P. 301–322. [https://doi.org/10.1016/0037-0738\(88\)90126-1](https://doi.org/10.1016/0037-0738(88)90126-1).
66. *Ross J.R.P., Ross C.A.* Bryozoan evolution and dispersal and Paleozoic sea-level fluctuations // *Gordon D.P., Smith A.M., Grant-Mackie J.A. (Eds.) Bryozoans in Space and Time: Proc. 10th Int. Conf. / Gordon D.P., Smith A.M., Grant-Mackie J.A. (Eds.).* Wellington: Natl. Inst. Water Atmos. Res., 1996. P. 243–258.
67. *Taylor P.D., Ernst A.* Bryozoans // *Webby B., Paris F., Droser M., Percival I. (Eds.) The Great Ordovician Diversification Event. Ser.: The Critical Moments and Perspectives in Earth History and Paleobiology.* New York, NY: Columbia Univ. Press, 2004. P. 147–156. <https://doi.org/10.7312/webb12678-017>.
68. *McKinney F.K., Lidgard S., Taylor P.D.* Macroevolutionary trends: Perception depends on the measure used // *Jackson J.B.C., Lidgard S., McKinney F.K. (Eds.) Evolutionary Patterns: Growth, Form, and Tempo in Evolution.* Chicago, IL: Univ. of Chicago Press, 2001. P. 348–385.
69. *Hageman S.J., Ernst A.* The last phylum: Occupation of Bryozoa morpho-ecospace (colony growth habits) during the early phase of the Great Ordovician Biodiversification Event // *Palaeogeogr., Palaeoclimatol., Palaeoecol.* 2019. V. 534. Art. 109270. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2019.109270>.

Поступила в редакцию 28.08.2023

Принята к публикации 17.10.2023

Толоконникова Зоя Алексеевна, доктор геолого-минералогических наук, ведущий научный сотрудник Научно-исследовательской части; старший научный сотрудник НИЦ «Цифровая Земля» Института геологии и нефтегазовых технологий

Кубанский государственный университет
ул. Ставропольская, д. 149, г. Краснодар, 350040, Россия
Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: zzalatoi@yandex.ru

Федоров Петр Владимирович, кандидат геолого-минералогических наук, доцент кафедры осадочной геологии

Санкт-Петербургский государственный университет
Университетская наб., д. 7/9, г. Санкт-Петербург, 199034, Россия
E-mail: p.fedorov@spbu.ru

Михненко Дарья Михайловна, лаборант Научно-исследовательской части

Кубанский государственный университет
ул. Ставропольская, д. 149, г. Краснодар, 350040, Россия
E-mail: dartina21@bk.ru

ISSN 2542-064X (Print)
ISSN 2500-218X (Online)

UCHENYE ZAPISKI KAZANSKOGO UNIVERSITETA. SERIYA ESTESTVENNYE NAUKI
(Proceedings of Kazan University. Natural Sciences Series)

2024, vol. 166, no. 2, pp. 342–367

ORIGINAL ARTICLE

doi: 10.26907/2542-064X.2024.2.342-367

A Classification of Protective Structures in Fossil Bryozoans

Z.A. Tolokonnikova^{a,b}, P.V. Fedorov^{c**}, D.M. Mikhnenko^{c***}*

^aKuban State University, Krasnodar, 350040 Russia

^bKazan Federal University, Kazan, 420008 Russia

^cSt. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia

*E-mail: *zzalatoi@yandex.ru, **p.fedorov@spbu.ru, ***dartina21@bk.ru*

Received August 28, 2023; Accepted October 17, 2023

Abstract

The protective structures of bryozoans representing four orders—Trepotomata, Cryptostomata, Fenestrata, and Cheilostomata—were analyzed and classified for the first time based on functional criteria. The proposed classification includes five groups of protective structures responsible for: 1) reducing water pressure; 2) increasing the feeding area by expanding the distance between the autozoecia apertures, as well as strengthening the colony's stability and integrity; 3) physically protecting the polypide and providing attachment points for muscles; 4) scaring off predators; and 5) enabling physical protection against predators while also cleaning the colony from sediments, larvae, and small invertebrates. The study of the development of heterozooids, stylets, and avicularia in fossil bryozoans revealed the emergence of persistent, effective polymorphs in the Early Ordovician, Late Devonian, and Early Cretaceous. The evolutionary changes in bryozoans were primarily driven by fluctuations in the levels of the World Ocean, climate, phytoplankton biomass, and predator composition, among other complex interplays between abiotic and biotic factors. To shield themselves from predation threats, bryozoans evolved acanthostyles protruding above colony surfaces and various types of heterozooids physically protecting them from being eaten (caverno-, para-, cyclo-, lepto-, and allozooids in the old groups, along with avicularia in cheilostomates). Avicularia and similar structures occurred repeatedly in different orders: in fenestrates during the Early Ordovician and Early Devonian, in cryptostomates during the Middle Carboniferous, and in cheilostomates during the Early Cretaceous.

Keywords: bryozoans, heterozooecia, avicularia, Ordovician, Devonian, Permian, Cretaceous, evolution, styles of protection

Acknowledgements. This study was supported by the Russian Science Foundation (project no. 22-27-0030, <https://rscf.ru/project/22-27-00030/>).

Conflicts of Interest. The authors declare no conflicts of interest.

Figure Captions

Fig. 1. Typical structures of colonies in fossil bryozoans from different orders.

Fig. 2. Generic diversity of fossil bryozoans and the largest mass extinction events (asterisks) during the Ordovician–Paleogene. Adapted from [1, 7, 8, 9].

Fig. 3. Structures in the colonies of Ordovician bryozoans from the orders Trepostomata and Cryptostomata (Upper Ordovician, Sandbian, Khrevitsa Formation; Leningrad region, Russia, Khrevitsa River): *a, b* – *Diplotrypa abnormis* (Modzalevskaya, 1953), specimen TsNIGR Museum, no. 4/13403; *c, d* – *Nematotrypa robusta* (Spjeldnaes, 1984), specimen TsNIGR Museum, no. 1/13403; *e* – *Prophyllodictya khrevitsa* Tolokonnikova et Fedorov, 2023, specimen TsNIGR Museum, no. 16/13403; *f, g* – *Amplexopora* sp., specimen TsNIGR Museum, no. 11/13403. Key: A – autozooecium aperture, Ac – acanthostyle, H – hemiphragm, D – diaphragm, M – mesozooecium, Me – mesotheca, P – paurostyle, T – tektitooecia, C – cystiphragm.

Fig. 4. Structures in the colonies of Devonian bryozoans from the orders Cryptostomata, Trepostomata, and Fenestrata (Upper Devonian, Famennian): *a, b* – *Mysticella sarcosanta* Gorjunova, 2007, specimen PIN, no. 1613/695; Shamamidzor Formation; Armenia, Biralı-Kuzei Mountain; *c, d* – *Spinofenestella abyschevoensis* (Trizna, 1958), specimen KuzGPA, no. 4a/11.1; Topkinsky horizon; Kemerovo region of Russia, Abyshevsky section; *e* – *Nikiforovella cavernosa* (Nekhoroshev, 1932), specimen Cologne Institute, GIK 2500 (V4-13b); Velbert Formation; Germany, Rhenish Massif, Velbert borehole, depths 103.8–131.5 m; *f* – *Rectifenestella rudis* (Ulrich, 1890), specimen University of Liège, Ulg 6-2a; Yvoir Formation; Belgium, Dinant Synclinorium, Nutons quarry; *g* – *Eodyscritella clatrata* Troizkaya, 1970, specimen KuzGPA, no. 4/12a.1; Topkinsky horizon; Kemerovo region, Russia, Topkinsky section. Key: Ac – acanthostyle, Ak – aktinostyle, K – keel, Me – mesotheca, Met – metazooecium, Ba – bundle of axial zooecia, E – exilazooecium, S – spine.

Fig. 5. Structures in the colonies of Permian bryozoans from the orders Fenestrata and Trepostomata (Permian, Cisuralian, Sakmarian; Bashkiria, Russia): *a* – *Spinofenestella quadratoporaeformis* (Schulga-Nesterenko, 1941), specimen SibGIU, no. 12/31; Shakhtau quarry; *b* – *Tratacladia noinskyi* (Schulga-Nesterenko, 1941), specimen PIN, no. 2985/718; Yuraktau Mountain; *c* – *Mackinneyella ornamentata* (Schulga-Nesterenko, 1941), specimen PIN, no. 2985/474; Turataw Mountain; *d* – *Shulgapora pseudokolvae* (Schulga-Nesterenko, 1952), specimen PIN, no. 613/541; Kuzminov Massif, borehole 102/21; *e* – *Cavernella cavifera* (Schulga-Nesterenko, 1939), specimen SibGIU, no. № 12/30; Kushtau mountain; *f, g* – *Rhombotrypella composita* Nikiforova, 1939, specimen SibGIU, no. 12/29; Shakhtau quarry. Key: N – node, D – diaphragm, Ca – cavernozooecium, Mi – microstyle, mAc – macroacanthostyle, miAc – microacanthostyle, C – cyclozooecium, E – exilazooecium.

Fig. 6. Structures in the colonies of Cretaceous bryozoans from the order Cheilostomata (Upper Cretaceous, lower Maastrichtian, Karsun Formation; Samara region, Russia, near Podval'e village): *a* – *Lunulites pseudocretacea* Håkansson et Voigt, 1996, specimen SibGIU, no. 12/32; *b* – *Rhagasostoma rowei* (Brydone, 1906), specimen SibGIU, no. 12/33; *c* – *Biaviculigera* sp., specimen SibGIU, no. 12/34. Key: V – vibraculum, vA – vicarious avicularium, Cr – cryptocyst, S – spine.

References

1. *Phylum Bryozoa*. Schwaha T. (Ed.). Berlin, De Gruyter, 2020. 458 p. <https://doi.org/10.1515/9783110586312>.
2. Taylor P.D., Ernst A. Bryozoans in transition: The depauperate and patchy Jurassic biota. *Palaeogeogr., Palaeoclimatol., Palaeoecol.*, 2008, vol. 263, nos. 1–2, pp. 9–23. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2008.01.028>.
3. Ernst A. Diversity dynamics of Ordovician Bryozoa. *Lethaia*, 2018, vol. 51, no. 2, pp. 198–206. <https://doi.org/10.1111/let.12235>.

4. Ma J., Taylor P.D., Buttler C.J., Xia F. Bryozoans from the early Ordovician Fenshiang Formation (Tremadocian) of South China and the early diversification of the phylum. *Sci. Nat.*, 2022, vol. 109, no. 2, art. 21. <https://doi.org/10.1007/s00114-022-01791-z>.
5. Goryunova R.V., Markov A.V., Naimark E.B. *Evolutsiya i biogeografiya paleozoiskikh mshanok: rezultaty kolichestvennogo analiza* [Evolution and Biogeography of Paleozoic Bryozoans: Results of a Quantitative Analysis]. Moscow, GEOS, 2004. 182 p. (In Russian)
6. Ostrovsky A.N. Evolution of lecithotrophic larvae in marine invertebrates exemplified with Gymnolaemata bryozoans. *Biosfera*, 2011, vol. 3, no. 2, pp. 233–252. (In Russian)
7. McKinney F.K., Jackson J.B.C. *Bryozoan Evolution*. Boston, MA, Unwin Human, 1989. 238 p.
8. Walliser O.H. Global events in the Devonian and Carboniferous. In: Walliser O.H. (Ed.) *Global Events and Events Stratigraphy in the Phanerozoic*. Berlin, Springer, 1996. pp. 225–250. https://doi.org/10.1007/978-3-642-79634-0_11.
9. Taylor P.D., Waeschenbach A. Phylogeny and diversification of bryozoans. *Palaeontology*, 2015, vol. 58, no. 4, pp. 585–599. <https://doi.org/10.1111/pala.12170>.
10. Hu Z.-X., Spjeldnaes N. Early Ordovician bryozoans from China. *Bull. Soc. Sci. Nat. l'Ouest Fr. Mém.*, 1991, hors-ser. 1, pp. 179–185.
11. Xia F.-S., Zhang S.-G., Wang Z.-Z. The oldest bryozoans: New evidence from the late Tremadocian (early Ordovician) of East Yangtze Gorges in China. *J. Paleontol.*, 2007, vol. 81, no. 6, pp. 1308–1326. <https://doi.org/10.1666/04-128.1>.
12. Ma J., Taylor P.D., Xia F., Zhan R. The oldest known bryozoan: *Prophyllodictya* (Cryptostomata) from the lower Tremadocian (Lower Ordovician) of Liujiachang, south-western Hubei, central China. *Palaeontology*, 2015, vol. 58, no. 5, pp. 925–934. <https://doi.org/10.1111/pala.12189>.
13. Fedorov P.V., Koromysova A.V., Martha S.O. The oldest bryozoans of Baltoscandia from the lowermost Floian (Ordovician) of north-western Russia: Two new rare, small and simple species of Revalotrypidae. *PalZ*, 2017, vol. 91, no. 3, pp. 353–373. <https://doi.org/10.1007/s12542-017-0351-y>.
14. Fedorov P.V., Koromysova A.V. New findings of the genus *Revalotrypa*, the oldest bryozoan genus of Baltoscandia, in north-western Russia. *Carnets Geol.*, 2019, vol. 19, no. 11, pp. 199–209. <https://doi.org/10.4267/2042/70296>.
15. Astrova G.G. *Istoriya razvitiya, sistematika i filogeniya mshanok otryada Trepostomata* [Evolution, Systematics, and Phylogeny of Trepostomata Bryozoans]. Moscow, Nauka, 1978. 240 p. (In Russian)
16. Boardman R.S., Buttler C.J. Zooids and extrazooidal skeleton in the order Trepostomata (Bryozoa). *J. Paleontol.*, 2005, vol. 79, no. 6, pp. 1088–1104. [https://doi.org/10.1666/0022-3360\(2005\)079\[1088:ZAESIT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1666/0022-3360(2005)079[1088:ZAESIT]2.0.CO;2).
17. Lavrentjeva V.D. *Mshanki iz podotaryada Phylloporinina* [Bryozoans of the Suborder Phylloporinina]. Moscow, Nauka, 1985. 101 p. (In Russian)
18. Boardman R.S. The growth and function of skeletal diaphragms in the colony life of lower Paleozoic Trepostomata (Bryozoa). *J. Paleontol.*, 2001, vol. 75, no. 2, pp. 225–240. [https://doi.org/10.1666/0022-3360\(2001\)0752.0.CO;2](https://doi.org/10.1666/0022-3360(2001)0752.0.CO;2).
19. Ernst A. Diversity dynamics and evolutionary patterns of Devonian Bryozoa. *Palaeobiodiversity Palaeoenviron.*, 2013, vol. 93, no. 1, pp. 45–63. <https://doi.org/10.1007/s12549-012-0086-4>.
20. Boardman R.S. *Mode of Growth and Functional Morphology of Autozooids in Some Recent and Paleozoic Tubular Bryozoa*. Ser.: Smithsonian Contributions to Paleobiology. No. 8. Washington, DC, Smithsonian Inst. Press, 1971. 51 p. <https://doi.org/10.5479/si.00810266.8.1>.
21. McKinney F.K., Taylor P.D., Lidgard S. Predation on bryozoans and its reflection in the fossil records. In: Kelley P.H., Kowalewski M., Hansen T.A. (Eds.) *Predator- Prey Interactions in the Fossil Record*. Ser.: Topics in Geobiology. Vol. 20. Boston, MA, Springer, 2003. pp. 239–261. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0161-9_10.
22. Lidgard S. Predation on bryozoan colonies: Taxa, traits and trophic groups. *Mar. Ecol.: Prog. Ser.*, 2008, vol. 359, pp. 117–131. <https://doi.org/10.3354/meps07322>.
23. Servais T., Harper D.A.T. The Great Ordovician Biodiversification Event (GOBE): Definition, concept and duration. *Lethaia*, 2018, vol. 51, no. 2, pp. 151–164. <https://doi.org/10.1111/let.12259>.

24. Morozova I.P. *Mshanki otryada Fenestellida (morphologiya, systema, istoricheskoe razvitie)* [Fenestellida Bryozoans (Morphology, Systematics, and Evolution)]. Moscow, GEOS, 2001. 177 p. (In Russian)
25. Boardman R.S. *Trepostomatous Bryozoa of the Hamilton Group of New York State*. Ser.: U.S. Geological Survey Professional Paper. No. 340. Washington, DC, U. S. Gov. Print. Off., 1960. 87 p. <https://doi.org/10.3133/pp340>.
26. Ernst A. Trepostome bryozoans from the Lower-Middle Devonian of NW Spain. *Riv. Ital. Paleontol. Stratigr.*, 2010, vol. 116, no. 3, pp. 283–308. <https://doi.org/10.13130/2039-4942/6391>.
27. Suárez Andrés J.L., Wyse Jackson P.N. Feeding currents: A limiting factor for disparity of Palaeozoic fenestrate bryozoans. *Palaeogeogr., Palaeoclimatol., Palaeoecol.*, 2015, vol. 433, pp. 219–232. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2015.05.015>.
28. McKinney F.K. Paleobiological interpretation of some skeletal characters of Lower Devonian fenestrate Bryozoa, Prague Basin, Czechoslovakia. *Bryozoa: Present and Past: Proc. 7th Int. Conf. on Bryozoa*. Ross J.R.P. (Ed.). Bellingham, WA, West. Wash. Univ., 1987. pp. 161–168.
29. Sallan L.C., Kammer T.W., Ausich W.I., Cook L.A. Persistent predator-prey dynamics revealed by mass extinction. *PNAS*, 2011, vol. 108, no. 20, pp. 8335–8338. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100631108>.
30. Haq B.U., Schutter S.R. A chronology of Paleozoic sea-level changes. *Science*, 2008, vol. 322, no. 5898, pp. 64–68. <https://doi.org/10.1126/science.116164>.
31. Kaiser S.I., Aretz M., Becker R.T. The global Hangenberg Crisis (Devonian–Carboniferous transition): Review of a first-order mass extinction. In: Becker R.T., Königshof P., Brett C.E. (Eds.) *Devonian Climate, Sea Level and Evolutionary Events*. Ser.: GSL Special Publications. Vol. 423. Geol. Soc. London, 2016, pp. 387–437. <https://doi.org/10.1144/SP423.9>.
32. Streef M., Caputo M.V., Loboziak S., Melo J.H.G. Late Frasnian–Famennian climates based on palynomorph analyses and the question of the Late Devonian glaciations. *Earth-Sci. Rev.*, 2000, vol. 52, nos. 1–3, pp. 121–173. [https://doi.org/10.1016/S0012-8252\(00\)00026-X](https://doi.org/10.1016/S0012-8252(00)00026-X).
33. Myrow P.M., Ramezani J., Hanson A.E., Bowring S.A., Racki G., Rakociński M. High-precision U–Pb age and duration of the latest Devonian (Famennian) Hangenberg event, and its implications. *Terra Nova*, 2014, vol. 26, no. 3, pp. 222–229. <https://doi.org/10.1111/ter.12090>.
34. Cole D., Myrow P.M., Fike D.A., Hakim A., Gehrels G.E. Uppermost Devonian (Famennian) to Lower Mississippian events of the western U.S.: Stratigraphy, sedimentology, chemostratigraphy, and detrital zircon geochronology. *Palaeogeogr., Palaeoclimatol., Palaeoecol.*, 2015, vol. 427, pp. 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2015.03.014>.
35. Lakin J.A., Marshall J.E.A., Troth I., Harding I.C. Greenhouse to icehouse: A biostratigraphic review of latest Devonian–Mississippian glaciations and their global effects. In: Becker R.T., Königshof P., Brett C.E. (Eds.) *Devonian Climate, Sea Level and Evolutionary Events*. Ser.: GSL Special Publications. Vol. 423. Geol. Soc. London, 2016, pp. 439–464. <https://doi.org/10.1144/SP423.12>.
36. Becker R.T., Kaiser S.I., Aretz M. Review of chrono-, litho- and biostratigraphy across the global Hangenberg Crisis and Devonian–Carboniferous Boundary. In: Becker R.T., Königshof P., Brett C.E. (Eds.) *Devonian Climate, Sea Level and Evolutionary Events*. Ser.: GSL Special Publications. Vol. 423. Geol. Soc. London, 2016, pp. 355–386. <https://doi.org/10.1144/SP423.10>.
37. Formolo M.J., Riedinger N., Gill B.C. Geochemical evidence for euxinia during the Late Devonian extinction events in the Michigan Basin (U.S.A.). *Palaeogeogr., Palaeoclimatol., Palaeoecol.*, 2014, vol. 414, pp. 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2014.08.024>.
38. Sandberg C.A., Morrow J.R., Ziegler W. Late Devonian sea-level changes, catastrophic events, and mass extinctions. In: Koeberl C., MacLeod K.G. (Eds.) *Catastrophic Events and Mass Extinctions: Impacts and Beyond*. Ser.: GSA Special Papers. Vol. 356. Boulder, CO, Geol. Soc. Am., 2002, pp. 473–487. <https://doi.org/10.1130/0-8137-2356-6.473>.
39. Kaiser S.I., Steuber T., Becker R.T. Environmental change during the Late Famennian and Early Tournaisian (Late Devonian–Early Carboniferous): Implications from stable isotopes and conodont biofacies in southern Europe. *Geol. J.*, 2008, vol. 43, nos. 2–3, pp. 241–260. <https://doi.org/10.1002/gj.1111>.
40. Carmichael S.K., Waters J.A., Batchelor C.J., Coleman D.M., Suttner T.J., Kido E., Moore L.M., Chadimová L. Climate instability and tipping points in the Late Devonian: Detection of the

- Hangenberg Event in an open oceanic island arc in the Central Asian Orogenic Belt. *Gondwana Res.*, 2016, vol. 32, pp. 213–231. <https://doi.org/10.1016/j.gr.2015.02.009>.
41. Sallan L.C., Coates M.I. End-Devonian extinction and a bottleneck in the early evolution of modern jawed vertebrates. *PNAS*, 2010, vol. 107, no. 22, pp. 10131–10135. <https://doi.org/10.1073/pnas.091400010>.
 42. Tolokonnikova Z.A. *Famensko-Turneiskie mshanki Evrazii* [Famennian–Tournaisian Bryozoans of Eurasia]. Krasnodar, Kuban. Gos. Univ., 2022. 348 p. (In Russian)
 43. Schwark L., Empt P. Sterane biomarkers as indicators of Palaeozoic algal evolution and extinction events. *Palaeogeogr., Palaeoclimatol., Palaeoecol.*, 2006, vol. 240, nos. 1–2, pp. 225–236. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2006.03.050>.
 44. Strother P.K. A speculative review of factors controlling the evolution of phytoplankton during Paleozoic time. *Rev. Micropaléontol.*, 2008, vol. 51, no. 1, pp. 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.revmic.2007.01.007>
 45. Fielding C.R., Frank T.D., Isbell J.I. The late Paleozoic ice age – a review of current understanding and synthesis of global climate patterns. In: Fielding C.R., Frank T.D., Isbell J.I. (Eds.) *Resolving the Late Paleozoic Ice Age in Time and Space*. Ser.: GSA Special Papers. Vol. 441. Boulder, CO, Geol. Soc. Am., 2008, pp. 343–354. [https://doi.org/10.1130/2008.2441\(24\)](https://doi.org/10.1130/2008.2441(24)).
 46. Bishop J.W., Montañez I.P., Gulbranson E.L., Brenckle P.L. The onset of mid-Carboniferous glacioeustasy: Sedimentologic and diagenetic constraints, Arrow Canyon, Nevada. *Palaeogeogr., Palaeoclimatol., Palaeoecol.*, 2009, vol. 276, nos. 1–4, pp. 217–243. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2009.02.019>.
 47. Carter M.C., Gordon D.P., Gardner J.P.A. Polymorphism and variation in modular animals: Morphometric and density analyses of bryozoan avicularia. *Mar. Ecol.: Prog. Ser.*, 2010, vol. 399, pp. 117–130. <https://doi.org/10.3354/meps08348>.
 48. Carter M.C., Gordon D.P., Gardner J.P.A. Polymorphism and vestigiality: Comparative anatomy and morphology of bryozoan avicularia. *Zoomorphology*, 2010, vol. 129, no. 3, pp. 195–211. <https://doi.org/10.1007/s00435-010-0113-9>.
 49. Tolokonnikova Z.A., Ischenko A.A. Evolutionary morphogenesis of the Late Paleozoic bryozoans from the genus *Shulgapora* Termier & Termier, 1971. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennyye Nauki*, 2022, vol. 164, no. 3, pp. 501–513. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2022.3.501-513>. (In Russian)
 50. Suárez Andrés J.L., Ernst A. Lower–Middle Devonian Fenestellidae (Bryozoa) of NW Spain: Implications for fenestrate palaeobiogeography. *Facies*, 2015, vol. 61, no. 1, art. 415. <https://doi.org/10.1007/s10347-014-0415-3>.
 51. Goryunova R.V. *Morfologiya, sistema i filogeniya mshanok (otryad Rhabdomesida)* [Morphology, Systematics, and Phylogeny of Bryozoans (Order Rhabdomesida)]. Moscow, Nauka, 1985. 152 p. (In Russian)
 52. Eyles N., Mory A.J., Backhouse J. Carboniferous–Permian palynostratigraphy of west Australian marine rift basins: Resolving tectonic and eustatic controls during Gondwanan glaciations. *Palaeogeogr., Palaeoclimatol., Palaeoecol.*, 2002, vol. 184, nos. 3–4, pp. 305–319. [https://doi.org/10.1016/S0031-0182\(02\)00260-2](https://doi.org/10.1016/S0031-0182(02)00260-2).
 53. Gilmour E.H., Morozova I.P. Biogeography of the Late Permian bryozoans. *Paleontol. J.*, 1999, vol. 33, no. 1, pp. 36–51.
 54. Alroy J., Aberhan M., Bottjer D.J., Footer M., Fürsich F.T., Harries P.J., Hendy A.J.W., Holland S.M., Ivany L.C., Kiessling W., Kosnik M.A., Marshall C.R., McGowan A.J., Miller A.I., Olszewski T.D., Patzkowsky M.E., Peters S.E., Villier L., Wagner P.J., Bonuso N., Borkow P.S., Brenneis B., Clapham M.E., Fall L.M., Ferguson C.A., Hanson V.L., Krug A.Z., Layou K.M., Leckey E.H., Nürnberg S., Powers C.M., Sessa J.A., Simpson C., Tomašových A., Visaggi C.C. Phanerozoic trends in the global diversity of marine invertebrates. *Science*, 2008, vol. 321, no. 5885, pp. 97–100. <https://doi.org/10.1126/science.1156963>.
 55. Erwin D.H. *The Great Paleozoic Crisis: Life and Death in the Permian*. New York, NY, Columbia Univ. Press, 1993. 327 p.

56. Bowring S.A., Erwin D.H., Jin Y.G., Martin M.W., Davidek K., Wang W. U/Pb zircon geo-chronology and tempo of the end-Permian mass extinction. *Science*, 1998, vol. 280, no. 5366, pp. 1039–1045. <https://doi.org/10.1126/science.280.5366.1039>.
57. Hallam A., Wignall P.B. Mass extinctions and sea-level changes. *Earth-Sci. Rev.*, 1999, vol. 48, no. 4, pp. 217–250. [https://doi.org/10.1016/S0012-8252\(99\)00055-0](https://doi.org/10.1016/S0012-8252(99)00055-0).
58. Taylor P.D. Bioimmured ctenostomes from the Jurassic and the origin of the cheilostome Bryozoa. *Palaeontology*, 1990, vol. 33, pt. 1, pp. 19–34.
59. Cook P.L., Chimonides P.J. A short history of the lunulite bryozoa. *Bull. Mar. Sci.*, 1983, vol. 33, no. 3, pp. 566–581.
60. Serova K.M., Belikova E.V., Kotenko O.N., Vishnyakov A.E., Bogdanov E.A., Zaitseva O.V., Shunatova N.N., Ostrovsky A.N. Reduction, rearrangement, fusion, and hypertrophy: Evolution of the muscular system in polymorphic zooids of cheilostome Bryozoa. *Org. Diversity Evol.*, 2022, vol. 22, no. 4, pp. 925–964. <https://doi.org/10.1007/s13127-022-00562-y>.
61. O’Dea A., Håkansson E., Taylor P.D., Okamura B. Environmental change prior to the K–T boundary inferred from temporal variation in the morphology of cheilostome bryozoans. *Palaeogeogr., Palaeoclimatol., Palaeoecol.*, 2011, vol. 308, nos. 3–4, pp. 502–512. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2011.06.001>.
62. Schack C.R., Gordon D.P., Ryan K.G. Modularity is the mother of invention: A review of polymorphism in bryozoans. *Biol. Rev.*, 2019, vol. 94, no. 3, pp. 773–809. <https://doi.org/10.1111/brv.12478>.
63. Gordon D.P., Voigt E. The kenozooidal origin of the ascophorine hypostegal coelom and associated frontal shield. *Bryozoans in Space and Time: Proc. 10th Int. Conf.* Gordon D.P., Smith A.M., Grant-Mackie J.A. (Eds.). Wellington, Natl. Inst. Water Atmos. Res., 1996. pp. 89–107.
64. McKinney F.K., Taylor P.D. Bryozoan generic extinctions and originations during the last one hundred million years. *Palaeontol. Electron.*, 2001, vol. 4, no. 1, art. 3. URL: http://palaeo-electronica.org/2001_1/bryozoan/issue1_01.htm.
65. Nelson C.S., Hyden F.M., Keane S.L., Leask W.L., Gordon D.P. Application of bryozoan growth-form studies in facies analysis of non-tropical carbonate deposits in New Zealand. *Sediment. Geol.*, 1988, vol. 60, nos. 1–4, pp. 301–322. [https://doi.org/10.1016/0037-0738\(88\)90126-1](https://doi.org/10.1016/0037-0738(88)90126-1).
66. Ross J.R.P., Ross C.A. Bryozoan evolution and dispersal and Paleozoic sea-level fluctuations. *Bryozoans in Space and Time: Proc. 10th Int. Conf.* Gordon D.P., Smith A.M., Grant-Mackie J.A. (Eds.). Wellington, Natl. Inst. Water Atmos. Res., 1996, pp. 243–258.
67. Taylor P.D., Ernst A. Bryozoans. In: Webby B., Paris F., Droser M., Percival I. (Eds.) *The Great Ordovician Diversification Event*. Ser.: The Critical Moments and Perspectives in Earth History and Paleobiology. New York, NY, Columbia Univ. Press, 2004. pp. 147–156. <https://doi.org/10.7312/webb12678-017>.
68. McKinney F.K., Lidgard S., Taylor P.D. Macroevolutionary trends: Perception depends on the measure used. In: Jackson J.B.C., Lidgard S., McKinney F.K. (Eds.) *Evolutionary Patterns: Growth, Form, and Tempo in Evolution*. Chicago, IL, Univ. of Chicago Press, 2001. pp. 348–385.
69. Hageman S.J., Ernst A. The last phylum: Occupation of Bryozoa morpho-ecospace (colony growth habits) during the early phase of the Great Ordovician Biodiversification Event. *Palaeogeogr., Palaeoclimatol., Palaeoecol.*, 2019, vol. 534, art. 109270. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2019.109270>.

Для цитирования: Толоконникова З.А., Федоров П.В., Михненко Д.М. Классификация защитных структур ископаемых мшанок // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2024. Т. 166, кн. 2. С. 342–367. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2024.2.342-367>.

For citation: Tolokonnikova Z.A., Fedorov P.V., Mikhnenko D.M. A classification of protective structures in fossil bryozoans. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennyye Nauki*, 2024, vol. 166, no. 2, pp. 342–367. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2024.2.342-367>. (In Russian)