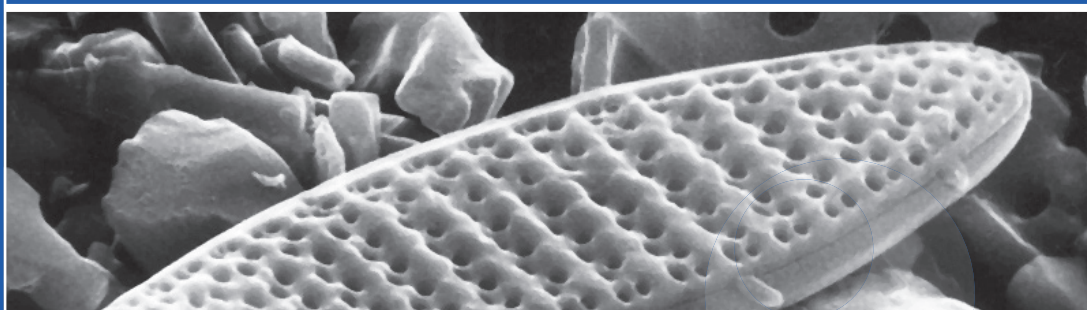




САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ

НАУЧНЫЙ ПАРК СПбГУ

БИОМЕДИЦИНА ЭКОЛОГИЯ ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЕ



Санкт-Петербургский
государственный
университет

Научный парк

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

НАУЧНЫЙ ПАРК СПбГУ
БИОМЕДИЦИНА, ЭКОЛОГИЯ,
ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЕ



ИЗДАТЕЛЬСТВО САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

УДК 57.08: 575: 576: 504
ББК 28с: 28.05: 28.06: 20.1
Н34

Рецензенты:
д-р биол. наук, проф. *О. А. Корнилова*
(Рос. гос. пед. ун-т им. А. И. Герцена);
д-р геол.-минерал. наук, проф. *С. М. Судариков*
(С.-Петербур. горный ун-т)

Ответственные редакторы:
канд. биол. наук *К. В. Волков*;
канд. физ.-мат. наук, доц. *П. М. Толстой*;
канд. геол.-минерал. наук *О. С. Грунский*;
канд. физ.-мат. наук *А. В. Курочкин*

Н34 Научный парк СПбГУ: биомедицина, экология, природопользование. — СПб.: Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2020. — 164 с., ил.
ISBN 978-5-288-06026-7

В сборнике представлены методические разработки сотрудников ресурсных центров «Развитие молекулярных и клеточных технологий», «Хромас», «Культивирование микроорганизмов», «Обсерватория экологической безопасности», «Геомодель» Научного парка Санкт-Петербургского государственного университета. Основные направления научных исследований, реализуемых в перечисленных ресурсных центрах, — биомедицина и здоровье человека, а также экология и рациональное природопользование, что и определяет диапазон тем предлагаемых публикаций. В сборник включены методические статьи по вопросам биотестирования, оценки загрязнения окружающей среды (атмосферы, водных объектов, почвы), изучения биоразнообразия и биологических объектов на разных уровнях организации организма (от изучения биомолекул до тканевого уровня). Большое внимание уделено детальному описанию методов и подходов.

Книга предназначена для специалистов, а также может быть использована в образовательных программах для подготовки студентов и аспирантов по направлениям экология, биология и фундаментальная медицина.

УДК 57.08: 575: 576: 504
ББК 28с: 28.05: 28.06: 20.1

ISBN 978-5-288-06026-7

© Санкт-Петербургский
государственный университет, 2020
© Авторы, 2019

Содержание

<i>Воронин А. П.</i> Модифицированный метод окраски белков после электрофореза в полиакриламидных гелях с помощью щелочного раствора аммиачных комплексов серебра	5
<i>Иванова А. Н.</i> Подготовка биологического материала для просвечивающей электронной микроскопии с помощью микроволнового процессора Leica EM AMW	9
<i>Богомаз Д. И., Павлова О. А.</i> Метод идентификации видовой принадлежности растения по фрагменту ткани	15
<i>Федосеева К. Н., Шапкина В. А.</i> Сравнительный анализ методов инфильтрации ткани кожи человека для гистологического исследования.....	19
<i>Чудинова Т. В., Костин Н. А.</i> Получение цветных изображений препаратов в проходящем свете на конфокальном микроскопе	24
<i>Шаварда А. Л.</i> Протокол экстракции для GC-MS метаболомного анализа растительного материала	30
<i>Кремнев Г. А., Крючкова Л. Ю.</i> Методы трехмерной реконструкции в сравнительно-морфологических исследованиях трематод (Trematoda: Neodermata)	36
<i>Гавриловская В. В., Чистякова Л. В.</i> Использование инфузорий <i>Paramecium caudatum</i> Ehrenberg, 1832 для тестирования общей токсичности суспензий наночастиц	48
<i>Чистякова Л. В., Лебедева Н. А.</i> Изоляция из природных местообитаний и выделение в культуру инфузорий <i>Stylonychia mytilus</i> Ehrenberg 1838	53

<i>Григорьева Н. Ю., Чистякова Л. В., Жангиров Т. Р., Перков А., Лисс А. А., Снарская Д. Д.</i> Методы флуоресцентной микроспектроскопии для мониторинга токсического цветения воды	59
<i>Сайфитдинова А. Ф., Галкина С. А., Гагинская Е. Р.</i> Методика приготовления препаратов хромосом — ламповых щеток из ооцитов птиц и рептилий.....	67
<i>Лобов А. А., Иванов М. А., Коростелева А. С., Мураева О. А., Смирнов Д. Д.</i> Усовершенствованный метод переработки гликольсодержащих теплоносителей	73
<i>Сладкова С. В.</i> Методические рекомендации по культивированию австралийских красноклешневых раков <i>Cherax quadricarinatus</i> (Von Martens, 1868) с целью использования их в биотестировании вод	83
<i>Лянгузов А. Ю., Петрова Т. А.</i> Повышение эффективности метода анализа спектров некоторых видов потенциальных поллютантов с использованием возможностей свободного языка программирования R.....	89
<i>Сладкова С. В.</i> Методика определения токсичности воды по аэробному энергообмену дафний	99
<i>Власенко Н. С., Шиловских В. В., Мурзин П. Д., Мурашкина А. А.</i> Методика контроля катализатора на основе TiO_2 для разложения фенола в сточных водах	105
<i>Зайцев Н. А.</i> Разработка альтернативной методики интерпретации радиоярких температур для восстановления профилей температуры в тропосфере.....	112
<i>Токарев И. В., Батуев В. И., Коносовский П. К., Крайнюкова И. А., Марков М. Л.</i> Способ расчета сосредоточенного инфильтрационного питания подземных вод по данным о распределении дейтерия и кислорода-18.....	124

А. П. Воронин*

МОДИФИЦИРОВАННЫЙ МЕТОД ОКРАСКИ БЕЛКОВ ПОСЛЕ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА В ПОЛИАКРИЛАМИДНЫХ ГЕЛЯХ С ПОМОЩЬЮ ЩЕЛОЧНОГО РАСТВОРА АММИАЧНЫХ КОМПЛЕКСОВ СЕРЕБРА

1. Введение

Предлагаемый метод является модификацией щелочного метода окраски белков аммиакатами серебра в полиакриламидном геле и базируется на работах Oakley и Guevara [Oakley et al., 1980], [Guevara et al., 1982].

Суть модификации сводится к замене токсичного проявляющего вещества (формальдегид) на нетоксичное (аскорбиновая кислота). Проблема такой замены заключается в том, что аскорбиновая кислота является значительно более кинетически активным проявляющим веществом, чем формальдегид. И под действием аскорбиновой кислоты при проявлении восстанавливаются не только катионы серебра, связанные с белком, но и катионы серебра, связанные с полиакриламидным гелем, в результате образуется очень высокий окрашенный фон. Эта проблема решается путем специальных обработок геля после его окраски аммиачными комплексами серебра перед проявлением.

2. Материалы и методы

Необходимые реактивы:

- Нитрат серебра ХЧ и выше.
- Насыщенный раствор аммиака в воде ХЧ и выше.
- Натрия гидроксид ЧДА и выше.
- Метанол от ЧДА и выше или этанол-ректификат и выше.
- Тиосульфат натрия квалификации (фото) и выше.
- Аскорбиновая кислота фармацевтической чистоты.

* Ресурсный центр «Развитие молекулярных и клеточных технологий», Научный парк СПбГУ.

Необходимое оборудование:

- Ванночка под размер геля.
- Качалка или шейкер под ванночку.
- Весы.
- Мерные цилиндры.
- Автоматические микродозаторы.
- Магнитная мешалка с магнитным якорьком.

Приготовление необходимых растворов:

1) 40 % об/об метанол или этанол

Мерным цилиндром на 100 мл отмерьте 40 мл спирта и 60 мл воды смешайте их либо в бутылке, либо в стеклянном стакане. Раствор лучше всего хранить в стеклянной плотно укупоренной таре.

2) 0,1 % в/о нитрат серебра

Взвесьте 50 мг нитрата серебра и растворите в 50 мл воды, отмеренных мерным цилиндром или взвешенных на весах. Раствор хранится в чистой стеклянной таре темно-коричневого стекла, срок хранения ограничен 3–4 неделями. О невозможности использования раствора говорит его потемнение и появление металлического серебра на стенках тары.

3) 1М раствор NaOH (гидроксид натрия)

Взвесьте 4 г гидроксида натрия. В мерный цилиндр на 100 мл налейте 70–80 мл дистиллированной воды. Небольшими порциями перенесите гидроксид натрия в цилиндр, очень желательно добавлять каждую следующую порцию после полного растворения первой. Для ускорения растворения помешивайте раствор в цилиндре стеклянной палочкой. После полного растворения небольшими порциями воды доведите объем раствора до 100 мл, после каждого добавления воды раствор надо перемешивать. Перемешанный раствор перенесите в полиэтиленовую или полипропиленовую тару с надежной герметичной крышкой для хранения. Не рекомендуется хранить раствор более нескольких месяцев.

4) 1 % раствор тиосульфата натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$)

Взвесьте 1 г тиосульфата натрия пентагидрата и растворите в 50 мл дистиллированной воды. Доведите объем раствора до 100 мл в мерной посуде. Раствор может храниться в холодильнике при температуре 4–10 °С в течении нескольких месяцев

Окраска:

1) фиксация белков в геле

Извлеките гель из блока и поместите в ванночку для инкубации и залейте фиксирующим раствором 40 % спирта. Поставьте ванночку на качалку. Гель

качается в течение 40 минут. Через 40 минут поменяйте раствор фиксатора на свежий и опять поставьте качаться гель в фиксаторе еще на 40 минут.

2) промывка

Промойте гель при покачивании в дистиллированной воде два раза по 10 минут с заменой воды на свежую для второй инкубации.

3) приготовление окрашивающего раствора аммиачных комплексов серебра и окраска

Возьмите стакан на 100 мл поместите в него 50 мл 0,1 % раствора азотнокислого серебра аккуратно погрузите в него магнитный якорек и поставьте на магнитную мешалку. Включите перемешивание. Все дальнейшие операции необходимо проводить при постоянном перемешивании. Добавьте к 50 мл 0,1 % раствора серебра 50–75 мкл насыщенного раствора аммиака. После некоторого перемешивания добавьте 0,5 мл 1 М раствора гидроксида натрия, при этом в растворе выпадет бурый осадок. Медленно по каплям добавляйте в раствор насыщенный раствор аммиака, при этом бурый осадок начнет растворяться. Нельзя допустить, чтобы осадок растворился полностью, раствор должен остаться слегка мутным или опалесцировать. Залейте гель в ваночке окрашивающим раствором аммиаков серебра. И поставьте инкубироваться при перемешивании на качалку. Время инкубации 20–40 минут.

4) промывка

Приготовьте 0,01 % раствор тиосульфата натрия. Для этого возьмите 0,5 мл 1 % раствора тиосульфата натрия и доведите объем раствора дистиллированной водой до 50 мл в мерной посуде.

Ополосните гель в ваночке 2 раза по 20 секунд дистиллированной водой.

Затем проинкубируйте гель в 0,01 % растворе тиосульфата натрия в течение 30–60 секунд.

Дважды ополосните гель дистиллированной водой, а затем погрузите гель в свежую порцию дистиллированной воды и инкубируйте в течении 20 минут.

Через 20 минут смените воду на свежую порцию и инкубируйте еще 20 минут.

5) проявление

Приготовьте проявитель:

Взвесьте 100 мг аскорбиновой кислоты и растворите в 50 мл дистиллированной воды, доведите объем раствора дистиллированной водой до 100 мл в мерной посуде.

Залейте гель в ваночке проявителем. Проявлять надо при покачивании до первых признаков появления фона. В этот момент следует немедленно слить проявитель и добавить к гелю 7 % уксусную кислоту и тут же заменить ее на дистиллированную воду. Дополнительно проявленный гель можно проинку-

бировать в 10%-ном растворе тиосульфата натрия 2–5 минут и затем 2–3 раза по 5 минут промыть в дистиллированной воде.

Полученный гель можно хранить в дистиллированной воде (для последующей обработки белков в геле не рекомендуется), также его можно высушить, сфотографировать доступными средствами (в частности, с помощью систем гель-документации), сканировать на планшетном сканере.

Литература

- Oakley B. R., Kirsch D. R., Morris N. R. 1980. A Simplified Ultrasensitive Silver Stain for Detecting Proteins in Polyacrylamide Gels. *Analytical Biochemistry* 105: 361–363.
- Guevara J., Johnston D. A., Ramagali L. S., Martin B. A., Capetillo S., Rodriguez L. V. 1982. Quantitative aspects of silver deposition in proteins resolved in complex polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 3: 197–205.

А. Н. Иванова*

ПОДГОТОВКА БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ ПРОСВЕЧИВАЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ С ПОМОЩЬЮ МИКРОВОЛНОВОГО ПРОЦЕССОРА LEICA EM AMW

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) биологических объектов является одним из самых трудоемких методов из-за сложности подготовки материала к исследованию. Для получения срезов толщиной 60–100 нм, которые используются для ПЭМ, материал (кусочки ткани, суспензия клеток) должен быть зафиксирован, обезвожен, заключен в достаточно твердую среду, такую как эпоксидная или акриловая смола. Этот процесс обычно занимает несколько дней, включая полимеризацию смолы. На каждом этапе пробоподготовки используются опасные для здоровья вещества. Современные гистологические процессоры позволяют автоматизировать пробоподготовку от фиксации материала до полимеризации смолы, что высвобождает время исследователя, обеспечивает получение воспроизводимых результатов, дает возможность сократить манипуляции с опасными веществами, а также экономить реактивы.

Ускорить обработку материала можно с помощью воздействия волнами сверхвысокой частоты. Общее время пробоподготовки в микроволновом процессоре, включая фиксацию и полимеризацию, составляет менее 5 часов [Zechmann, Zellnig, 2009] вместо 2–5 суток. За счет сокращения времени пребывания материала в растворах в меньшей степени вымываются липиды и растворимые белки, а это повышает сохранность ультраструктуры и улучшает иммунореактивность [Bozzola, Russel, 1999].

В большинстве лабораторных микроволновых установок энергия микроволн распределяется неравномерно, формируются так называемые горячие и холодные пятна, которые должны уравниваться большими объемами воды и требуют постоянного контроля со стороны исследователя. В процессоре Leica EM AMW эта проблема преодолена: 100 % энергии волн поглощается реагентами и образцом без образования горячих или холодных пятен, весь процесс обработки материала автоматизирован. Производителем состав-

* Ресурсный центр «Развитие молекулярных и клеточных технологий», Научный парк СПбГУ; Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН.

Таблица 1. Список реагентов и режим инкубации для проводки биологического материала в эпоксидную смолу эпон с помощью микроволнового процессора Leica EM AMW

Name	Type	MaxTemp. (°C)	Max Power (watt)	Drain pause
dH ₂ O	Rinse	90	30	0
buffer solution	Rinse	60	30	0
0.5 % UAc in dH ₂ O	Stain	50	30	0
0.5 % UAc in 70 % Ethanol	Stain	50	30	0
30 % Ethanol	Solvent	50	30	0
50 % Ethanol	Solvent	50	30	0
70 % Ethanol	Solvent	50	30	0
95 % Ethanol	Solvent	50	30	0
30 % Aceton	Solvent	40	30	0
50 % Aceton	Solvent	40	30	0
70 % Aceton	Solvent	40	30	0
Aceton abs.	Solvent	40	30	0
Aceton : Epon 1:9	Resin	50	30	5
Aceton : Epon 3:1	Resin	50	30	5
Aceton : Epon 1:1	Resin	50	30	10
Aceton : Epon 1:3	Resin	50	30	20
Epon	Resin	95	30	50

лены протоколы пробоподготовки различного биологического материала, они представлены на сайте [<http://www.leica-microsystems.com/products/sample-preparation-for-electron-microscopy/tissue-processors/details/product/leica-em-amw/downloads/>].

Микроволновой процессор Leica EM AMW успешно используется в лабораторной практике. Фиксация в нем по качеству не уступает рутинной химической фиксации [Zechmann, Zellnig, 2009; Zechmann et al., 2011; Zellnig et al., 2013], а иммунореактивность материала сохраняется в лучшей степени, чем при обычной проводке при комнатной температуре [Zellnig et al., 2013].

В отделении электронной микроскопии ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» Научного парка СПбГУ исследователи работают с различным биологическим материалом: суспензии клеток, органы

Таблица 2. Протокол № 1. Проводка биологического материала в эпоксидную смолу. Контрастирование *en block* спиртовым раствором ацетата урана

Vial	Reagent	Step #	Time (hh:mm:ss)	Temp. (°C)	Power (watt)	Mode
1	buffer solution	1	00:01:00	37	15	Slope
2	30 % Ethanol	1	00:01:00	37	15	Slope
3	50 % Ethanol	1	00:01:00	37	15	Slope
4	70 % Ethanol	1	00:01:00	37	15	Slope
5	0.5 % UAc in 70 % Ethanol	1	00:02:00	37	15	Pulse
		2	00:02:00	20	0	
		3	00:02:00	37	15	Cont
6	70 % Ethanol	1	00:01:00	37	15	Slope
7	96 % Ethanol	1	00:01:00	37	15	Slope
8	Aceton abs.	1	00:02:00	37	15	Slope
9	Aceton abs.	1	00:02:00	37	15	Slope
10	Aceton abs.	1	00:02:00	37	15	Slope
11	Aceton : Epon 1:9	1	00:03:00	40	10	Cont
12	Aceton : Epon 3:1	1	00:03:00	40	10	Cont
13	Aceton : Epon 1:1	1	00:03:00	45	10	Cont
14	Aceton : Epon 1:3	1	00:03:00	50	10	Cont
15	Epon	1	00:03:00	50	12	Cont
16	Epon	1	00:03:00	50	12	Cont
	Total time		00:36:00			

и ткани лабораторных животных, биопсийный и мортальный материал, мелкие беспозвоночные, листья и корни растений и др. Для этих объектов требуются фиксаторы различного состава и различные условия фиксации, при этом количество образцов часто невелико и не обеспечивает загрузку прибора. Однако зафиксированные независимо друг от друга различные биологические образцы могут быть одновременно обработаны по общему протоколу обезживания и пропитки смолой. Также у исследователей редко возникает необходимость в быстрой (около 3 часов) полимеризации небольшого количества (20 образцов) материала, поэтому обычно материал раскладывается в стандартные ванночки со свежей смолой и полимеризуется в термостате. Таким

Таблица 3. Протокол № 2. Проводка биологического материала в эпоксидную смолу. Контрастирование *en block* водным раствором ацетата урана

Vial	Reagent	Step #	Time (hh:mm:ss)	Temp. (°C)	Power (watt)	Mode
1	dH ₂ O	1	00:01:00	37	15	Slope
2	dH ₂ O	1	00:01:00	37	15	Pulse
3	dH ₂ O	1	00:01:00	37	15	Slope
4	0.5 % UAc in dH ₂ O	1	00:02:00	37	15	Pulse
		2	00:02:00	20	0	
		3	00:02:00	37	15	Cont
5	dH ₂ O	1	00:01:00	37	15	Slope
6	30 % Aceton	1	00:01:00	37	15	Slope
7	50 % Aceton	1	00:01:00	37	15	Slope
8	70 % Aceton	1	00:01:00	37	15	Slope
9	Aceton abs.	1	00:02:00	37	15	Slope
10	Aceton abs.	1	00:02:00	37	15	Slope
11	Aceton abs.	1	00:02:00	37	15	Slope
12	Aceton : Epon 1:9	1	00:03:00	40	10	Cont
13	Aceton : Epon 3:1	1	00:03:00	40	10	Cont
14	Aceton : Epon 1:1	1	00:03:00	45	10	Cont
15	Aceton : Epon 1:3	1	00:03:00	50	10	Cont
16	Epon	1	00:03:00	50	12	Cont
17	Epon	1	00:03:00	50	12	Cont
	Total time		00:37:00			

образом, в лаборатории, где исследуется разнородный материал, процессор чаще всего используется для дегидратации и проводки материала в смолу.

Для качественной пропитки материала эпоксидной смолой Epon EMbed 812 (EMS, США) на основе предустановленных протоколов прибора для различных объектов (ткани млекопитающих, эмбрионы дрозофилы, листья арабидопсиса и табака) были разработаны два универсальных протокола проводки предварительно зафиксированного материала (табл. 2, 3).

Перед началом работы составляется список реактивов и режимов обработки. Указывается тип реактива (Rinse — промывка, Stain — контрастер, Solvent — растворитель, Resin — смола), а режимы (максимальная температура, максимальная мощность микроволн и время высушивания перед погружением в следующий реагент) выставляются в списке автоматически согласно типу реактива. В протоколах указаны оптимальные величины, полученные из предустановленных протоколов, литературных источников или опытным путем.

Образцы помещаются в отдельные сетчатые контейнеры, одновременно можно обрабатывать до 20 контейнеров с образцами. Размер образца не более 5 мм в длину и не менее 200 мкм в ширину. Во время обработки контейнеры с образцами находятся в микроволновой камере, куда последовательно подаются емкости с реагентами (объем каждого реагента 10 мл). Карусель для переноса и подачи реагентов оснащена герметично закрывающимися крышками, установка подключается к вентиляционному каналу вытяжного шкафа, что минимизирует контакт исследователя с парами растворителей и смол.

Оба разработанных протокола рассчитаны на материал, зафиксированный альдегидами и тетраоксидом осмия. В протоколы введено контрастирование *enblock* ацетатом урана. Его присутствие обеспечивает меньшее вымывание элементов цитозоля, улучшает сохранность [Bozzola, Russell, 1999] и разрешение трехслойной структуры мембран [Maunsbach, Afzelius, 1999], а также дает возможность впоследствии без дополнительного контрастирования просматривать срезы в просвечивающем электронном микроскопе, оснащенный цифровой камерой, при ускоряющем напряжении 80–120 кВ. Поскольку уран образует с фосфатами нерастворимые соединения, которые ухудшают итоговое изображение, важно избавиться от них до этапа контрастирования *en block*. Протокол № 1 включает в себя плавное обезвоживание в серии спиртов (этанола) возрастающих концентраций, ацетат урана вводится в 70% этаноле. Большая часть фосфатов вымывается спиртами 30% и 50% концентрации, а оставшиеся не могут связаться с ураном, так как фосфаты не растворяются в этаноле с концентрацией выше 65%. В протоколе № 2 используется водный раствор ацетата урана, поэтому он начинается с многократной интенсивной промывки материала водой с использованием как постоянного, так и нарастающего микроволнового излучения. Введение дополнительного этапа обезвоживания (30% этанол в Протоколе № 1 и 30% ацетон в Протоколе № 2) и более плавное, чем рекомендованное производителем, повышение концентрации смолы (начальный шаг инкубации в 10% растворе) позволяет равномерно пропитывать образцы с различной плотностью. Традиционно обезвоживание серий ацетонов применяется для растительного материала, а животный материал обезвоживается спиртами, но применение обоих протоколов к различному материалу не выявило заметных отличий в пропитке или

контрасте. Таким образом, оба разработанных протокола проводки материала в эпоксидную смолу могут успешно применяться для обезвоживания и пропитки разнородного биологического материала в микроволновом процессоре.

Литература

- Bozzola J. J., Russell L. D. 1999. *Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists*, 2nd ed. Toronto, Jones and Bartlett Publishers.
- Maunsbach A. B., Afzelius B. A. 1999. Biomedical Electron Microscopy. New York, Academic Press: 31–58.
- Zechmann B., Graggaber G., Zellnig G. 2011. Microwave Assisted Rapid Diagnosis of Plant Virus Diseases by Transmission Electron Microscopy. *Journal of Visualized Experiments* 56: e2950. doi:10.3791/2950
- Zechmann B., Zellnig G. 2009. Microwave-assisted rapid plant sample preparation for transmission electron microscopy. *Journal of Microscopy* 233: 258–268. doi:10.1111/j.1365-2818.2009.03116.x
- Zellnig G., Möstl S., Zechmann B. 2013. Rapid immunohistochemical diagnosis of tobacco mosaic virus disease by microwave-assisted plant sample preparation. *Microscopy* 62 (5): 547–553. doi:10.1093/jmicro/dft022

*Д. И. Богомаз, О. А. Павлова**

МЕТОД ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ РАСТЕНИЯ ПО ФРАГМЕНТУ ТКАНИ

1. Введение

В основе методики лежит анализ таксономически значимых районов последовательностей ДНК, которые будут подвергнуты амплификации и секвенированию. В методике применен один из наиболее популярных молекулярных маркеров — последовательности внутренних транскрибируемых спейсеров рибосомальных генов (ITS internal transcribed spacer). Мотив ITS локализуется между структурными генами рибосомальной РНК 18S-5,8S-26S. Рибосомальные гены представляют собой единый кластер ядерных генов, организованный в виде тандемно расположенных повторов. Каждый кластер рибосомальных генов состоит из транскрибируемой области (гены 18S, 5.8S и 26S рРНК) и внутренних транскрибируемых спейсеров, расположенных по обе стороны от 5.8S рРНК, эти спейсеры называются ITS1 и ITS2. Методика основана на том, что ITS, как любые некодирующие последовательности, накапливают мутации с высокой скоростью. Следовательно, они могут сильно отличаться даже у близкородственных организмов, поэтому их используют для филогенетических и биогеографических исследований. Вместе с тем гены рибосомальных РНК, напротив, достаточно консервативны. Поэтому на основе их последовательности могут быть созданы универсальные праймеры, амплифицирующие ДНК широкого круга растений.

В методике использованы праймеры, комплементарные участкам генов 18S и 26S РНК, прилежащих к ITS1 и ITS2. С их помощью необходимо амплифицировать фрагмент, содержащий ITS1-ген 5.8S РНК-ITS2. Сравнивая полученную последовательность с последовательностью из баз данных можно с высокой точностью определить видовую принадлежность исходного растения [Матвеева и др., 2011].

* Ресурсный центр «Развитие молекулярных и клеточных технологий», Научный парк СПбГУ.

2. Ход работы

2.1. Выделение геномной ДНК

Необходимое оборудование: водяная баня (нагретая до +56 °С), центрифуги, дозаторы, фарфоровые ступки и пестики.

Расходные материалы: микроцентрифужные пробирки на 1,5 мл, наконечники для дозаторов на 1 мл, 200 мкл.

Растворы: 1) экстрагирующий буфер 2) этанол 70 % 3) хлороформ 4) изопропанол.

Приготовление экстрагирующего буфера.

В колбе смешать: 2 г ЦТАБ, 28 мл 5М NaCl, 4 мл 0,5М ЭДТА pH 8,5 мл 2М Трис — HCl pH 8. Довести дистиллированной водой до 100 мл.

Процедура выделения ДНК.

1. 0,5 г ткани растереть в ступке с помощью пестика с 1 мл экстрагирующего буфера.
2. Перенести материал в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5–2 мл на 56–60 °С на 30–40 минут, периодически перемешивая содержимое пробирки.
3. После инкубации добавить равный объем хлороформа и оставить на 30–40 минут при комнатной температуре. Содержимое пробирки постоянно перемешивать.
4. Центрифугировать в течение 5 минут при 4000 об/мин.
5. Перенести верхнюю фазу в чистую пробирку и добавить 2/3 объема изопропилового спирта, перемешать. Пробирки с содержимым оставить при комнатной температуре на 20–30 минут (можно дольше) для осаждения ДНК.
6. Центрифугировать 10 минут при максимальных оборотах (12000 об/мин). Надосадочную жидкость слить и промыть осадок 70%-ным этиловым спиртом. Центрифугировать при тех же условиях.
7. Надосадочную жидкость слить, осадок нуклеиновой кислоты высушить и растворить в воде [Sambrook, Russell, 2001].

2.2. ПЦР и анализ ее результатов

Постановка ПЦР.

Необходимое оборудование: ДНК-амплификатор, дозаторы. Расходные материалы: микроцентрифужные пробирки на 0,5 мл, наконечники для дозаторов на 10 и 200 мкл.

Реактивы: препарат ДНК (полученный на 2.1), Taq-полимераза и буфер к ней, вода деионизованная, раствор нуклеотидов (2–5 мМ), рас-

творы олигонуклеотидов 10 мМ (ITS4-TCCTCCGCTTATTGATATGC, ITS5-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAG).

В микроцентрифужной пробирке смешать компоненты реакции в порядке, приведенном ниже: вода деионизованная — 41 мкл, буфер для полимеразы 10× с Mg 2+ (1–3 мМ) — 5 мкл, нуклеотиды 2 мМ — 1 мкл, олигонуклеотиды от 2–20 пмоль в реакцию, Taq-полимераза 1–3 ед. активности на реакцию 0,5 мкл, ДНК-матрица (1–1000 нг) 0,5 мкл.

После смешивания компонентов реакции пробирки необходимо поставить в амплификатор и провести реакцию по программе:

+95 °С — 3 минуты, 35 циклов (+95 °С — 15 секунд, +58 °С — 30 секунд, +72 °С — 30 секунд) +72 °С — 3 минуты.

Анализ результатов ПЦР проводят методом гель-электрофореза.

Приготовление агарозного геля для разделения фрагментов ДНК

Необходимое оборудование: камеры для электрофореза, источники тока, дозаторы, трансиллюминатор. Расходные материалы: наконечники для дозаторов на 10 и 200 мкл. Реактивы: ТРИС, борная кислота, 0,5 М ЭДТУ (EDTA)-(рН 8), агароза, раствор бромистого этидия в воде (1 %), буфер для нанесения (0,025 % бром феноловый синий, 0,025 % ксилен цианол в 30 %-ном глицерине), продукты ПЦР с предыдущей стадии работы, маркер молекулярного веса.

Приготовление 5× буфера TBE. Растворить в 0,5 л дистиллированной воды: 54 г Tris-ОН, 27,5 г борной кислоты, 20 мл 0,5 М EDTA (рН 8). Довести объем до 1 л. Для электрофореза необходимо приготовить 0,5× буфер TBE. На его основе приготовить 1 %-ный агарозный гель. Для 200 мл геля следует взять 20 мл 5-кратного буфера, 2 г агарозы, довести объем до 200 мл дистиллированной водой. Добавить 10 мкл 1 %-ного раствора бромистого этидия (EtBr, Ethidium bromide).

Плавить гель до однородного состояния на водяной бане или в микроволновой печи, далее залить гель в электрофорезную камеру. При помощи гребенки сформировать карманы для нанесения образца необходимого объема. После полимеризации геля заполнить камеру буфером (без агарозы), вытащить гребенку. Образцы смешать с буфером для нанесения (5:1) и нанести в лунки. В одну из лунок нанести маркер молекулярного веса. Провести электрофорез, установив напряжение, исходя из значений 2–4 вольта на сантиметр длины камеры (на небольшую камеру порядка 100 В). Об успешности разделения фрагментов можно судить по движению в геле красителей, являющихся компонентами буфера для нанесения. Когда бромфеноловый синий (более подвижный краситель) пройдет около 2/3 длины геля, можно приступить к визуализации ДНК под воздействием ультрафиолетового света при помощи трансиллюминатора. В результате в геле должны наблюдаться фрагменты ДНК размером около 600 п. н. При отсутствии нецелевых фрагментов и димеров праймеров

продукты ПЦР-реакции можно непосредственно секвенировать в ресурсном Центре или компаниях.

2.3. Анализ сиквенсов

Анализ сиквенсов можно осуществить при помощи алгоритма BLAST, доступного на сайте NCBI [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>].

Проанализировав выравнивание можно с высокой долей достоверности определить исходную видовую принадлежность исследованного растения.

Литература

Матвеева Т. В., Богомаз Д. И., Лутова Л. А. 2011. *Малый практикум по генной инженерии*. С.-Петербург, Реноме.

Sambrook J., Russell D. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

*К. Н. Федосеева**, *В. А. Шапкина***

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ ИНФИЛЬТРАЦИИ ТКАНИ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Введение

В современной медицине гистологические методы исследования биопсийного материала до сих пор играют значительную роль при диагностике ряда заболеваний, в том числе онкологических. Прежде всего речь идет о морфологическом анализе парафиновых срезов ткани, окрашенных гематоксилин-эозином [Bancroft, Stevens, 1975], [Горбунова, 2008], [Visscher et al., 2017].

Для получения качественных препаратов необходимо соблюдать строгую последовательность действий, включающих забор и фиксацию ткани, инфильтрацию (проводку), заливку в парафин, изготовление и монтаж срезов, а также их окраску [Ромейс, 1954]. Автоматизация гистологических процессов, в частности самого длительного из них — процесса проводки, с использованием современных тканевых процессоров, существенно сокращает время изготовления препаратов, позволяя добиться стандартизации результатов [Boon, Drijver, 1986; Kok, 1988; Suvarna, 2013].

Целью данной работы было сравнение вакуум-инфильтрационной методики проводки ткани и проводки с использованием микроволнового излучения, применительно к биопсийной ткани кожи человека. Полученные парафиновые срезы окрашивались гематоксилин-эозином и сравнивались между собой.

Дополнительно к парафиновым срезам были изготовлены криосрезы, которые также были добавлены к сравнению.

2. Материалы и методы

Образцы ткани кожи человека были получены во время проведения операции по установке силиконовых имплантатов в центре пластической хирургии

* Ресурсный центр «Развитие молекулярных и клеточных технологий», Научный парк СПбГУ.

** Лаборатория мозаики аутоиммунитета СПбГУ.

Таблица 1. Протокол гистологической проводки ткани, разработан St. Michael's Hospital для Leica TP1020

Станция	Реагент	Температура (°C)	Вакуум	Время
1	Формалин	комнатная	да	1 час
2	Формалин	комнатная	нет	1 час
3	C ₂ H ₅ ОН 70 %	комнатная	нет	1 час
4	C ₂ H ₅ ОН 80 %	комнатная	нет	1 час
5	C ₂ H ₅ ОН 96 %	комнатная	нет	1 час
6	C ₂ H ₅ ОН 96 %	комнатная	нет	1 час
7	C ₂ H ₅ ОН 100 %	комнатная	нет	1,5 часа
8	C ₂ H ₅ ОН 100 %	комнатная	нет	1,5 часа
9	Ксилол	комнатная	нет	1,5 часа
10	Ксилол	комнатная	нет	2 часа
11	Парафин	60	да	45 минут
12	Парафин	60	да	45 минут

Источник: [<http://stmichaelshospitalresearch.ca/wpcontent/uploads/2017/05/Tissue-Processing-Protocol-%E2%80%93-for-Leica-TP1020-Automatic-Tissue-Processor.pdf>]. Был модифицирован (парафиновая стадия разделена на 2 этапа по 45 минут). Общее время проводки — 14 часов.

и флебологии клиники «Балтмед» у четырех здоровых женщин. Работа одобрена этическим комитетом СПбГУ.

Образцы фиксировались при комнатной температуре в 10%-ном нейтральном (забуференном) формалине. От каждого образца было вырезано по 6 секций, шириной 5 мм, длиной до 10 мм, по 2 секции для каждого метода. Толщина образцов не превышала 3 мм.

По 2 секции от каждого образца были погружены на фиксаторе в 20 % раствор сахарозы до полного погружения (36 часов), после чего с помощью криостатирующего микротомы Leica CM-3050S были изготовлены срезы толщиной 20 мкм.

Остальные секции были упакованы в гистологические кассеты для дальнейшей парафиновой проводки: по 2 секции от каждого образца для проводки в автоматическом тканевом процессоре Leica TP1020VF и по 2 секции от каждого образца для проводки в микроволновом гистопроцессоре Milestone KOS. Протоколы проводки приведены в таблицах 1 и 2.

После проводки материал заливался в парафиновые блоки с использованием станции для заливки Leica EG 1150. Парафиновые блоки резались на

Таблица 2. Протокол микроволновой проводки ткани, Milestone KOS, для образцов ткани толщиной до 3 мм. Общее время 3 часа 35 минут

Станция	Реагент	Температура (°C)	Время
1	Формалин	50	30 минут
2	Этанол	70	25 минут
3	Изопропанол	70	55 минут
4	Парафин	80	1 час 15 минут

моторизованном ротационном микротоме Leica RM2265, толщина срезов — 10 мкм.

Срезы монтировались на стекла, окрашивались гематоксилин-эозином (станция автоматизированной гистологической окраски Leica ST5020) и заключались под покровное стекло (станция автоматического заключения Leica CV5030).

Отцифровка изображений проводилась с использованием микроскопа Leica DMI 6000 и цветной цифровой CCD-камеры Leica DFC450 с разрешением 5 Мп. Работы проводили на оборудовании ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» Научного парка СПбГУ.

3. Результаты и обсуждения

Из описанных выше методов изготовления препаратов наиболее простым является криотомия образца, так как предварительная подготовка материала, а именно пропитывание сахарозой, не требует участия исследователя. Из достоинств — ткань сохраняет свои первоначальные размеры, поскольку не подвергается уплотнению во время дегидратации [Tran, 2017], а также, ввиду отсутствия этапа депарафинизации, цикл окрашивания занимает меньше времени [Boon, Drijver, 1986; Suvarna, 2013]. В тоже время толщина срезов, полученных с помощью криостатирующего микротомы обычно больше 10 мкм, что усложняет анализ окрашенных препаратов в проходящем свете (рис. 1, *a*).

На рис. 1, *b* и 1, *c* показаны парафиновые срезы, полученные в результате автоматической проводки материала: микроволновой и вакуум-инфильтрационной соответственно.

Микроволновая проводка начала применяться в гистологии с 1985 года (бытовые микроволновые печи) [Boon, Drijver, 1986; Kok, 1988; Suvarna, 2013]. Мы использовали микроволновой гистопроцессор Milestone KOS с предустановленной программой проводки для образцов толщиной до 3 мм. Все время обработки ткани заняло чуть больше 3,5 часов. Для сравнения, проводка ткани

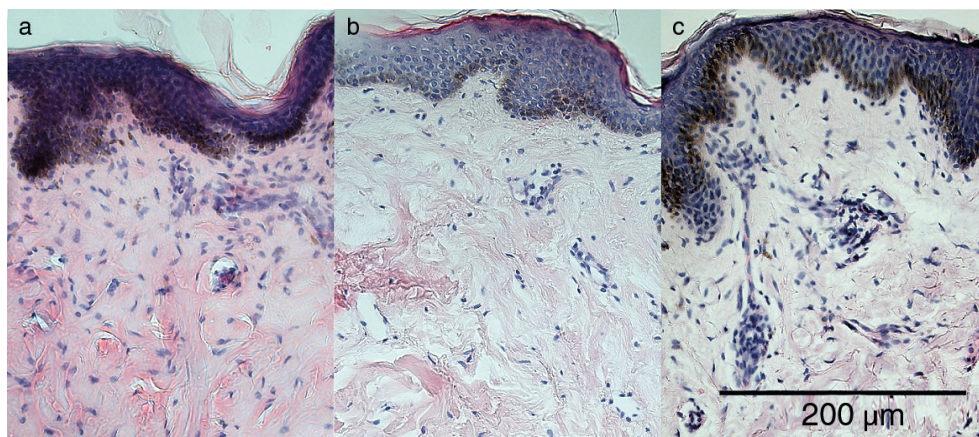


Рис. 1. Микрофотография среза кожи человека, увеличение 20х, окраска — гематоксилин-эозин: а — криосрез, 20 мкм; б — парафиновый срез, проводка с помощью KOS; с — парафиновый срез, проводка с помощью Leica ST5020

в гистопроцессоре Leica TP1020 с использованием вакуума длилась 14 часов. Ручная проводка ткани может занять несколько суток [Горбунова, 2008].

Парафиновые блоки после проводки в Leica TP1020 легче резались на микротоме — срезы меньше крошились, легче снимались с ножа и не распадались в водяной бане. Смонтированные срезы сильнее прокрашивались эозином по сравнению со срезами, полученными с помощью KOS (применялась автоматическая окраска с целью создания одинаковых условий). Также стоит отметить лучшую сохранность структуры дермы на препаратах после проводки в Leica TP1020 (рис. 2).

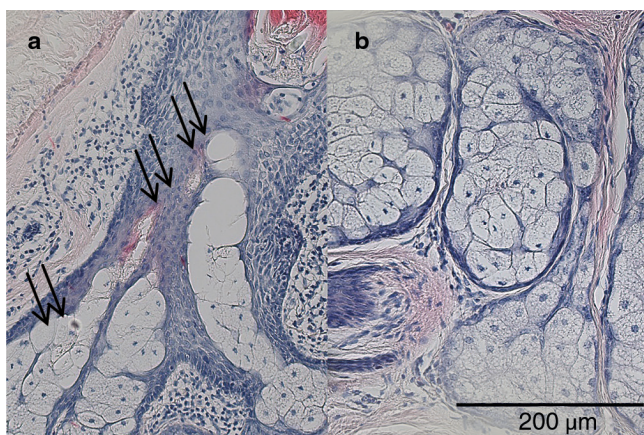


Рис. 2. Микрофотография среза кожи человека, окраска — гематоксилин-эозин: а — парафиновый срез, проводка с помощью KOS; б — парафиновый срез, проводка с помощью Leica ST5020. Стрелки указывают на образовавшиеся в результате проводки пустоты

В целом же значительных отличий в качестве срезов материала, обработанного в микроволновом гистопротессоре Milestone KOS и автоматическом тканевом протессоре Leica TP1020VF выявлено не было. Однако для диагностических задач, учитывая значительную (более 10 часов) экономию во времени, использование микроволнового процессинга может быть более целесообразно.

Авторы выражают признательность коллективу Лаборатории мозаики аутоиммунитета СПбГУ за предоставленные образцы, а также доценту кафедры цитологии и гистологии СПбГУ П.А.Зыкину за методическую поддержку.

Литература

- Горбунова Т.К. 2008. Применение гематоксилина в микроскопической технике. *Электронный математический и медико-биологический журнал* 7 (1).
- Ромейс Б. 1954. *Микроскопическая техника*. Москва, Издательство иностранной литературы.
- Bancroft J. D., Stevens A. 1975. *Histopathological stains and their diagnostic uses*. Edinburgh, Churchill Livingstone.
- Boon M. E., Drijver J. S. 1986. *Routine Cytological Staining Techniques: Theoretical Background and Practice*. London, Macmillan Education.
- Kok L. P., Visser P. E., Boon M. E. 1988. Histoprocessing with the microwave oven: an update. *Histochemical Journal* 20: 323–328.
- Suvarna K., Layton Ch., Bancroft J. 2012. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*, 7th ed., Elsevier, Churchill Livingstone.
- Tran H., Jan N. J., Hul D., Voorhees A., Schuman J. S., Smith M. A., Wollstein G, Sigal I. A. 2017. Formalin fixation and cryosectioning cause only minimal changes in shape or size of ocular tissues. *Scientific Reports* 7. doi:10.1038/s41598-017-12006-1
- Visscher D. W., Frank R. D., Carter J. M., Vierkant R. A., Winham S. J., Heinzen E. P., Broderick B. T., Denison L. A., Allers T. M., Johnson J. L., Frost M. H., Hartmann L. C., Degenim A. C., Radisky D. C. 2017. Breast Cancer Risk and Progressive Histology in Serial Benign Biopsies. *Journal of the National Cancer Institut* 109 (10): 1–7. doi:10.1093/jnci/djx035

ПОЛУЧЕНИЕ ЦВЕТНЫХ ИЗОБРАЖЕНИЙ ПРЕПАРАТОВ В ПРОХОДЯЩЕМ СВЕТЕ НА КОНФОКАЛЬНОМ МИКРОСКОПЕ

1. Введение

В фундаментальных и доклинических гистологических исследованиях, в особенности при изучении разнообразных опухолей, представляется важным одновременное изучение фенотипа клеточных популяций и точной локализации тканевых структур [van Vlierberghe et al., 2005]. К настоящему времени разработано большое количество стандартных гистохимических и иммуногистохимических методик изучения тканей и клеток, однако все они имеют важное ограничение по количеству одновременно анализируемых маркеров. Технология многоцветной флуоресцентной иммуногистохимии сделала возможным одновременный анализ многочисленных внутриклеточных и мембранных маркеров, позволяющий проводить фенотипирование по многим параметрам. Однако без целостной визуализации тканевых структур провести точную локализацию интересующих клеточных популяций крайне затруднительно. Для получения ясного понимания и локализации определенных фенотипов была предложена технология комбинирования методов стандартной иммуногистохимии и флуоресцентного мечения на фиксированных парафиновых срезах образцов тканей [van Vlierberghe et al., 2005; Woolthuis et al., 2013].

Классический способ визуализации комбинированных препаратов с получением цветного изображения гистохимической окраски и флуоресцентных меток заключается в последовательной визуализации препарата на конфокальном микроскопе и световом микроскопе, оснащенный цветной камерой. Однако для получения цветного изображения не обязательно использовать цветную камеру. Предложенная нами методика упрощает визуализацию комбинированных препаратов путем использования только конфокального микроскопа для анализа флуоресцентных и нефлуоресцентных меток с получением цветных изображений. Технология визуализации флуоресцентных меток с помощью конфокального микроскопа общеизвестна и не является целью

* Ресурсный центр «Развитие молекулярных и клеточных технологий», Научный парк СПбГУ.

настоящей статьи. Ниже подробно описывается технология визуализации нефлуоресцентных меток с получением цветного RGB-изображения на конфокальном микроскопе.

2. Технология

Для получения цветного изображения препаратов в проходящем свете на конфокальном микроскопе используются лазеры с разной длиной волны и детектор проходящего света.

Детекторы конфокального микроскопа, как и матрицы камер, способны регистрировать только яркость света, но не его спектральные характеристики. Соответственно, получаемые на них изображения изначально являются черно-белыми. Для съемки цветных изображений камеры оснащаются специальными светофильтрами, которые избирательно пропускают свет с разными длинами волн на пиксели камеры. Наиболее часто в современных цветных камерах применяется Фильтр Байера или его видоизмененные производные (рис. 1) [Bayer, 1976; Adams et al., 1998; Li et al., 2008; Raz and Mendlovic, 2014]. На пиксели камеры, находящиеся под цветными ячейками фильтра, попадает свет различной яркости, но только определенной, соответствующей данной ячейке длины волны. При формировании изображения значениям яркости, зарегистрированным данными пикселями, присваивается соответствующий цвет. Таким образом, на выходе матрица формирует цветное изображение.

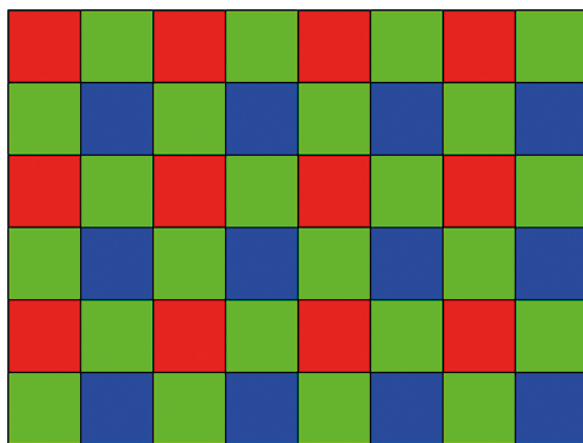


Рис. 1. Фильтр Байера — наиболее распространенный RGB-фильтр: 1 синий, 1 красный, 2 зеленых фильтра

Подобным способом можно получить цветное изображение и на классической черно-белой камере путем получения изображений образца, освещенного

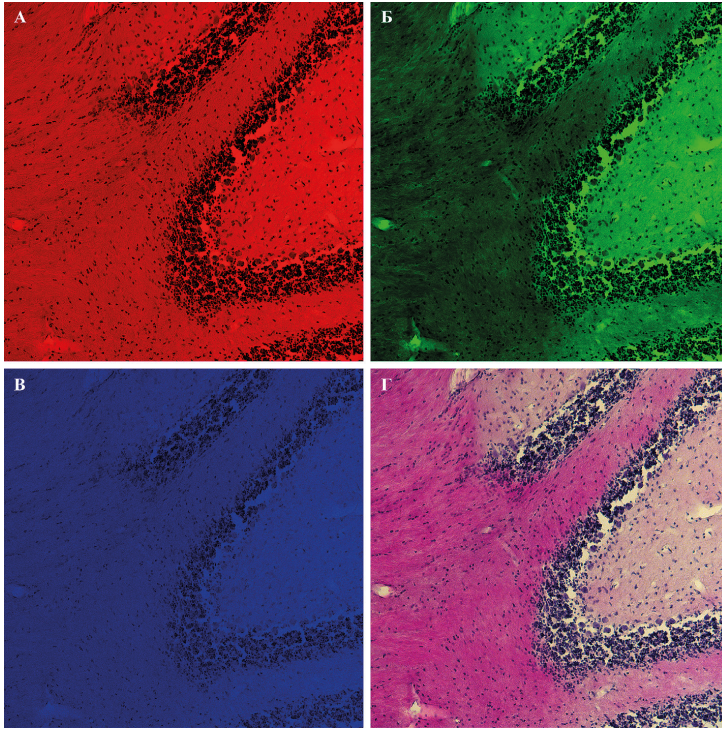


Рис. 2. Фронтальный срез мозжечка мыши, окрашенный стандартным гематоксилин-эозиновым методом. На рисунке представлены изображения, полученные в трех отдельных каналах с присвоенными им псевдоцветами (А — В), и совмещенное трехканальное «цветное» изображение (Г). Изображение получено с помощью системы Leica TCS SP5, увеличение 20х

щенного через красный, зеленый и синий светофильтры. После задания каналам соответствующих использованным светофильтрам цветов — красный, зеленый и синий, полученные изображения сливаются в одно цветное, привычное человеческому глазу изображение.

Современные конфокальные микроскопы оснащены детекторами на основе фотоэлектронных умножителей (РМТ), которые также способны измерять только яркость, но не спектральный состав света. Получение цветного изображения в проходящем свете на конфокальном микроскопе производится аналогично получению цветного изображения на классической черно-белой камере (рис. 2). Для этого в конфокальном микроскопе используются детектор проходящего света в конденсоре микроскопа, аргонный лазер с длиной волны 458 нм, гелий-неоновые лазеры с длинами волн 543 нм и 633 нм, заменяющие в случае черно-белой камеры синий, зеленый и красный светофильтры.

3. Материалы и методы

Получение цветного изображения проводилось на препарате фиксированного замороженного фронтального среза мозжечка мыши толщиной 20 мкм, окрашенного стандартным гематоксилин-эозиновым методом, с помощью сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SP5, оснащенного стандартным PMT-детектором для проходящего света и стандартными газовыми лазерами, имеющими в своем спектре длины волн 458 нм, 543 нм и 633 нм.

Поэтапное получение цветного изображения заключается в следующем:

- 1) поставить препарат, выбрать подходящий объектив;
- 2) сфокусироваться на препарате в режиме проходящего света;
- 3) перейти на пустой участок стекла для настройки лазеров;
- 4) включить Sequential Scan, задать 3 канала с лазерами 458, 543 и 633 нм, для каждого из них включить детектор проходящего света и задать ему соответствующий лазеру псевдоцвет;
- 5) в режиме сканирования Live на пустом поле добиться одинаковой яркости фона во всех трех каналах. Для этого необходимо перевести изображение в псевдоцвета с визуализацией пересвета и недосвета, затем отрегулировать яркость лазеров и усиление детектора. Важно, чтобы напряжение на детекторе находилось близко к середине диапазона возможных значений, чтобы коэффициент передачи яркости был линейным (рис. 3);
- 6) после настройки яркости перейти на объект, сфокусироваться на интересующем участке в режиме Live на любом из лазеров и запустить сканирование во всех трех каналах;
- 7) совместить полученные кадры в цветное изображение (рис. 2).

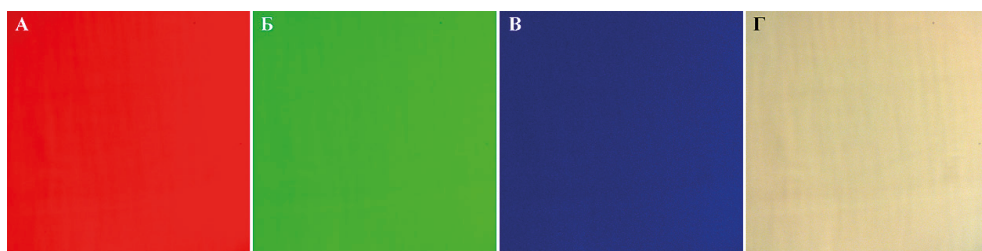


Рис. 3. Изображения пустого поля в трех каналах с присвоенными им псевдоцветами (А—В); совмещённое трехканальное изображение пустого поля (Г)

4. Результаты

С помощью описанной методики было получено цветное RGB-изображение фронтального среза мозжечка мыши, окрашенного гематоксилин-эозиновым

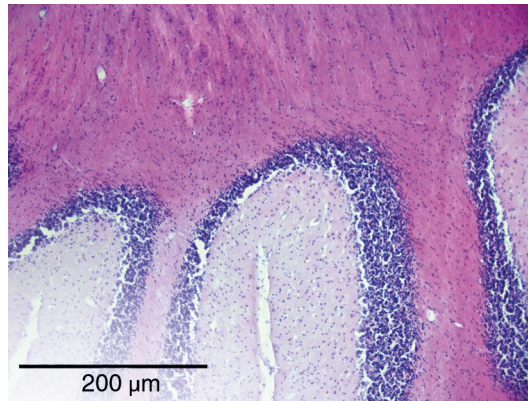


Рис. 4. Изображение окрашенного гематоксилином/эозином фронтального среза мозжечка мыши, полученное на системе инвертированного микроскопа Leica DMI6000, увеличение 16х

методом (рис. 2). Для проверки цветопередачи полученного изображения тот же самый срез был отснят на цветной камере системы инвертированного микроскопа Leica DMI6000 (рис. 4). Несмотря на небольшую разницу в цветопередаче, обусловленную различными настройками баланса белого, цветные изображения препарата, полученные на конфокальном микроскопе Leica TCS SP5 и с помощью цветной камеры системы Leica DMI6000, сопоставимы.

4. Обсуждение и заключение

Гистологический метод исследования — один из древнейших методов изучения биологических объектов. Изначально гистологический метод представлял собой описательный метод исследования, и после появления молекулярных методов исследования и разработки генно-инженерных технологий он утратил свое первоначальное значение и занял второстепенное место. Однако в последнее время ученые вновь обратили свое внимание на методы гисто- и иммуногистохимии, принимающие все большее значение не только в фундаментальной науке, но и в доклинических областях исследований, таких как онкоиммунология, нейробиология, регенеративная медицина, др. [Xin et al., 2001; van Vlierberghe et al., 2005; Woolthuis et al., 2013]. Возможность визуализации различных методов исследования на одном и том же препарате с помощью одного прибора позволяет сформировать комплексное представление об исследуемом объекте, исключая при этом появление ошибок и упрощая анализ результатов. Представление о локализации функций и ответов дает новые возможности в разработке методов диагностики и лекарственных препаратов для лечения различных заболеваний.

Помимо упрощения и высокой точности анализа полученных изображений, преимуществом данной технологии, по сравнению с использованием цветной камеры, является получение полной цветовой информации из каждой точки изображения и, как следствие, отсутствие необходимости дебайеризации и восстановления недостающих частей информации о цвете пикселей, позволяющее избежать артефактов, возникающих при этих процессах.

Работа проведена в ресурсном центре «Развитие молекулярных и клеточных технологий» Научного парка СПбГУ.

Литература

- Adams J., Parulski K., Spaulding K. 1998. Color processing in digital cameras. *IEEE Micro* 18(6): 20–30. doi: 10.1109/40.743681
- Bayer B.E. 1976. *Color imaging array*. Patent No. US 3971065.
- Li X., Gunturk B., Zhang L. 2008. Image demosaicing: a systematic survey, Pearlman
- Raz A., Mendlovic D. 2014. Sequential filtering for color image acquisition. *Opt. Express* 22(22): 26878–26883. doi:10.1364/OE.22.026878
- van Vlierberghe R.L., Sandel M.H., Prins F.A., van Iersel L.B., van de Velde C.J., Tollenaar R.A., Kuppen P.J. 2005. Four-color staining combining fluorescence and brightfield microscopy for simultaneous immune cell phenotyping and localization in tumor tissue sections. *Microsc. Res. Tech.* 67(1): 15–21. doi:10.1002/jemt.20181
- Woods W.A., Lu J.W., L. (Eds.), Visual Communications and Image Processing. *Proc. of SPIE-IS&T Electronic Imaging, SPIE* 6822: 68221J. doi: 10.1117/12.766768
- Woolthuis C.M., Mulder A.B., Verkaik-Schakel R.N., Rosati S., Diepstra A., van den Berg E., Schuringa J.J., Vellenga E., Kluin P.M., Huls G. 2013. A single center analysis of nucleophosmin in acute myeloid leukemia: value of combining immunohistochemistry with molecular mutation analysis. *Haematologica* 98(10): 1532–1538. doi:10.3324/haematol.2012.079806
- Xin Y., Li X.L., Wang Y.P., Zhang S.M., Zheng H.C., Wu D.Y., Zhang Y.C. 2001. Relationship between phenotypes of cell-function differentiation and pathobiological behavior of gastric carcinomas. *World J. Gastroenterol* 7(1): 53–59. doi:10.3748/wjg.v7.i1.53

ПРОТОКОЛ ЭКСТРАКЦИИ ДЛЯ GC-MS — МЕТАБОЛОМНОГО АНАЛИЗА РАСТИТЕЛЬНОГО МАТЕРИАЛА

1. Введение

Метаболомный анализ теперь уже вышел за первоначальные рамки постгеномных методов исследования и довольно широко используется в биологии для характеристики различных процессов и явлений с позиции низкомолекулярного метаболитного контекста. В строгом смысле под метаболомикой следует понимать динамику корреляционной структуры метаболитной сети, но в современной литературе этим термином обозначаются совершенно различные концептуальные подходы, объединенные только методической основой — серийным анализом метаболитного пула, реализованным с помощью гибридных инструментальных платформ, сочетающих высокоэффективное разделение (хроматографию или капиллярный электрофорез) и физико-химический анализ разделенных соединений, как правило с помощью изоэлектрической масс-спектрометрической техники. Особенностью масс-спектрометрического паттерна является то, что даже если его недостаточно для однозначной идентификации соединения, он, вместе с параметрами хроматографического удерживания, после присвоения произвольного кода, может быть использован для аннотации. Полученный набор аннотированных хроматограмм называется профайлингом и, как правило, оформляется в так называемую метаболитную матрицу, которая, с одной стороны, и является результатом метаболитного анализа, а с другой — представляет собой исходные данные для серьезной информационной обработки, поскольку в своем реальном виде восприниматься исследователем не может. Второй этап метаболомного эксперимента представляет собой извлечение полезной информации (data mining) из таких больших массивов данных. Этот этап, как правило, реализуется одним из четырех существенно различных способов, в зависимости от поставленной задачи.

1. Target-метаболомика. Метаболитная матрица редуцируется до набора идентифицированных соединений. Наиболее распространенный

* Ресурсный центр «Развитие молекулярных и клеточных технологий», Научный парк СПбГУ.

подход, так как использует классические парадигмы биологического знания: геном — фермент — реакция. Легко сочетается с другими «омическими» методами (геномикой, транскриптомикой, протеомикой и т. п.). Широко используется для сопровождения различных биологических экспериментов и наблюдений [Birkemeyer et al., 2003].

2. Фингерпринтинг. Буквально соответствует термину «отпечаток пальца». Результатом анализа является набор неаннотированных хроматограмм, которые используются как визуальный образ исследуемого образца. Имеет сугубо прикладное значение и иногда используется для идентификации объекта, контроля его происхождения и подлинности, например контроль качества лекарственного растительного сырья. С развитием масс-селективного детектирования постепенно заменяется частично аннотированным профайлингом [Xue et al., 2012].
3. Nontarget-метаболомика или метаболитный профайлинг. Используется полная метаболитная матрица, размер которой ограничен возможностями современной аналитической техники. На наш взгляд, наиболее интересный и перспективный подход. Формирует виртуальный образ биологического объекта, альтернативный визуальному и построенный в координатах изменения числа молекул отдельных метаболитов, составляющих низкомолекулярный контекст существования живого. Отражает не столько существо объекта, сколько его состояние [Sévin et al., 2015].
4. Реконструкция метаболитной сети. Визуализация связанных биохимических процессов, относящихся к исследуемому объекту. Основным инструментом для построения таких моделей служит потоковая метаболомика или FBA (Flux Based Analysis). Профайлинговая метаболомика предоставляет данные о компонентном составе метаболитной сети исследуемого объекта. Из этого списка с помощью глобальной базы данных по биохимическим процессам (например, KEGG) формируется набор реакций, связывающих между собой обнаруженные метаболиты, и из этих данных формируется стехиометрическая матрица, на основе которой уже строятся потоковые модели [Sriyudthsak et al., 2016].

Фиксация биологического материала и подготовка проб для серийного анализа играют первостепенную роль при разработке метаболомного эксперимента. Предпринято несколько попыток выработать универсальный стандартный протокол, подходящий для любых метаболомных исследований, исходя из того, что это должен быть «моментальный снимок» биохимического состояния с мгновенной остановкой всех биохимических процессов с последующим максимальным переводом всех существующих на этот момент в объекте метаболитов в органический растворитель и сохранением этого пула в неиз-

менном виде вплоть до непосредственно инструментального анализа. Значительная часть предлагаемых методов фиксации предусматривает «холодный шок» при фиксации и требует проведения этих работ с использованием жидкого азота и охлажденного метанола. Серьезное внимание уделяется также подбору системы растворителей, например, для липидного анализа [Weckwerth, Kahl, 2013]. Такая техника работы, по-видимому, действительно необходима при исследовании, например, тонкостей организации метаболитных сетей или детального изучения раннего фенотипического отклика на дифференциальную экспрессию, но наши исследования показывают, что при моделировании самых общих тенденций в функционировании биологических объектов вполне возможно ограничиться упрощенной фиксацией, которая при правильной постановке эксперимента тоже может дать очень интересные результаты.

Настоящий протокол предлагается в качестве очень простого, малозатратного метода подготовки проб для профайлингового анализа. Он очень хорошо себя зарекомендовал при исследовании метаболитного контекста процессов роста и развития растений и грибов. Фиксация возможна не только в лабораторных, но и в полевых условиях, что позволяет эффективно использовать метаболомные методы для исследования природного биоразнообразия в естественных условиях.

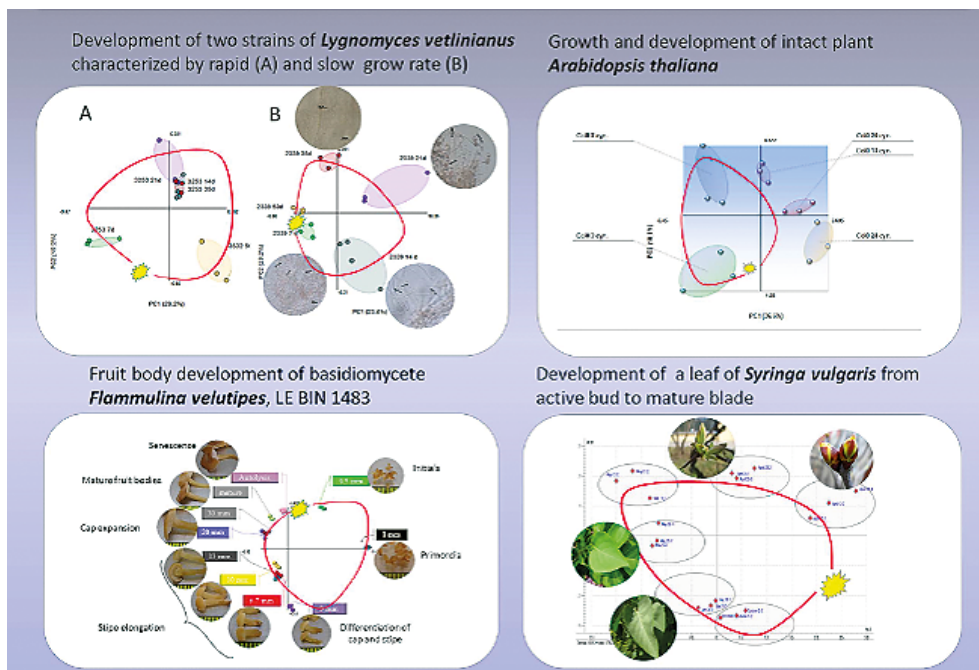


Рис. 1. Статистические модели процессов роста и развития, построенные на основе nontarget-метаболомного анализа [Shavarda et al., 2016]

2. Материалы и протокол

Необходимые материалы (на одну пробу):

Метанол		1500 мкл.
Ацетонитрил		300 мкл.
Пиридин		30 мкл.
Все растворители категории HPLC-grade		
Трикозан Sigma-Aldrich 263850-1G.		30 мкг.
Бис-триметилсилилацетамид	Supelco 33149-U	20 мкл.
Метоксиламин гидрохлорид	Supelco 33045-U	600 мкг.
Виала с завинчивающейся крышкой и септой		
Agilent 5183-2067; 5182-0723; 5182-0729		2 шт.
Микровставка в виалу Agilent 5181-1270		1 шт.

Дополнительное оборудование:

холодильник -80°C ;
 термостат или термоблок;
 вакуумный концентратор;
 центрифуга;
 дозаторы или микрошприцы.

Приготовление раствора для внутреннего стандарта:

Навеска 100 мг трикозана растворяется в 100 мл пиридина при слабом нагревании и с интенсивным перемешиванием. Хранится при комнатной температуре. **Работа проводится в вытяжном шкафу!**

1. ~100 мг свежего растительного материала помещается в стандартную виалу с завинчивающейся пробкой и тефлоновой септой (Agilent, US).
2. Добавляется 1500 мкл 100 % метанола.
3. Выдерживается сутки при комнатной температуре.
4. Экстракт переносится в чистую виалу.
5. Растительный материал после экстракции высушивается в термостате ($70-100^{\circ}\text{C}$) и взвешивается.
6. Метанол удаляется с помощью вакуумного концентратора CentriVar, LabConco (US) при 20°C .
7. Виалы с сухим остатком экстрактивов заполняются аргоном (опционально) и хранятся при -80°C .

Предколоночная дериватизация:

После хранения виал при -80°C ни в коем случае не открывать виалы до их размораживания до комнатной температуры.

1. Добавить в виалу 300 мкл безводного(!) ацетонитрила. Использовать Vortex для ускорения растворения.
2. Центрифугировать виалы (15 минут, 4000 rpm).
3. Отобрать 30 мкл аликвоты в виалу со вкладышем.
4. Добавить 30 мкл пиридина, содержащего 1000 ppm стандарта (трикозан).

Вариант 1. (Общий профайлинг)

5. Добавить 20 мкл силилирующего агента (бис-триметилсилилтрифторацетамид).
6. Поместить виалы в планшет автосамплера.

Вариант 2 (Профайлинг, ориентированный на особый интерес к углеводным компонентам)

5. Добавить 30 мкл метоксиламингидрохлорида (20 мг/мл в пиридине).
6. Оставить на 1 час при 37 °С.
7. Добавить 20 мкл силилирующего агента (бис-триметилсилилтрифторацетамид).
8. Поместить виалы в планшет автосамплера и сформировать последовательность анализов.
9. Запустить последовательность на исполнение.

Примечание.

Оставшийся материал (после выполнения п.3) может быть использован для HPLC или LC-MS анализа.

GC-MS профайлинг:

Хроматограф: Leco Pegasus 4D или Agilent 6850-5975.

Колонка: Капилляр, 30 м × 0.25 мм.

Неподвижная фаза — Полисилоксан HP-5ms (Agilent),
или DB-5ms (Agilent),
или BPX-5 (SGE),

толщина пленки неподвижной фазы 0.25мкм.

Газ-носитель: Гелий, работа в режиме постоянного потока
через колонку со скоростью 1 мл/мин.

Программа термостата колонки: градиент 70–340 °С
со скоростью 6 °С/мин с последующим
изотермическим интервалом в 15 минут

Испаритель: Режим работы — SpleetLess.

Трансферлайн: 250 °С.

Масс-селективный детектор: сканирование (2–10 ск/сек)
в диапазоне 50–800 аем.

Температура источника 250 °C.

Запись хроматограмм в режиме полного ионного тока.

Для определения индексов удерживания компонентов в серию анализов добавляется хроматограмма стандартного набора линейки нормальных алканов.

Литература

- Birkemeyer C., Kolasa A., Kopka J. 2003. Comprehensive chemical derivatization for gas chromatography-mass spectrometry-based multi-targeted profiling of the major phytohormones. *J. Chromatogr. A* 993: 89–102.
- Sévin D. C., Kuehne A., Zamboni N., Sauer U. 2015. Biological insights through nontargeted metabolomics. *Curr. Opin. Biotechnol.* 34: 1–8. doi:10.1016/j.copbio.2014.10.001
- Shavarda A. L., Kotlova E. R., Pozhvanov G. A., Sazanova K., Senik S. V. 2016. Existential metabolomics: visualization of growth and development processes through metabolite profiling. *Proc. 12th Annu. Conf. Metabolome Soc.*, Dublin: 124.
- Sriyudthsak K., Shiraishi F., Hirai M. Y. 2016. Mathematical Modeling and Dynamic Simulation of Metabolic Reaction Systems Using Metabolome Time Series Data. *Front. Mol. Biosci.* 3, article 15. doi:10.3389/fmolb.2016.00015
- Weckwerth, W., Kahl G. (Eds.). 2013. *The Handbook of Plant Metabolomics*. Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Xue S. Y., Li, Z. Y., Zhi H. J., Sun H. F., Zhang L. Z., Guo X. Q., Qin X. M. 2012. Metabolic fingerprinting investigation of *Tussilago farfara* L. by GC–MS and multivariate data analysis. *Biochem. Syst. Ecol.* 41: 6–12. doi:10.1016/j.bse.2011.11.003

МЕТОДЫ ТРЕХМЕРНОЙ РЕКОНСТРУКЦИИ В СРАВНИТЕЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ ТРЕМАТОД (TREMATODA: NEODERMATA)

1. Введение

Существует ряд методик, позволяющих изучать организацию беспозвоночных животных и реконструировать трехмерный облик их внутренних органов. К «классическим» методам можно отнести изготовление окрашенных тотальных препаратов (рис. 1) и серийных срезов (рис. 2). Каждая из этих методик обладает своими недостатками. При светооптическом микрокопировании тотального препарата рассмотреть все особенности внутреннего строения организма зачастую бывает затруднительно (рис. 1). Это связано с тем, что структуры, занимающие в теле разное положение, могут «перекрывать» друг друга. В результате выполнение детальной трехмерной реконструкции с тотальных препаратов становится практически неосуществимым. В то время как на гистологических срезах, при наличии непрерывной серии, появляется возможность проследить и разграничить каждую из интересующих внутренних структур организма (рис. 2). Однако для выполнения трехмерной реконструкции приходится либо тщательно зарисовывать каждый срез, либо прибегать к использованию специального программного обеспечения (см. ниже).

При этом для изучения пространственной организации внутренних органов как трематод, так и других организмов возможно применение новых, современных методик. К таким относится, в частности, рентгеновская микромография [Holdsworth, Thornton 2002; Metscher, 2009a; Metscher, 2009b; Schambach et al., 2010]. Ниже мы подробно рассмотрим способы реконструкции объектов по серийным срезам, наряду с особенностями пробоподготовки

* Ресурсный центр «Развитие молекулярных и клеточных технологий», Научный парк СПбГУ.

** Ресурсный центр «Рентгенодифракционные методы исследования», Научный парк СПбГУ.

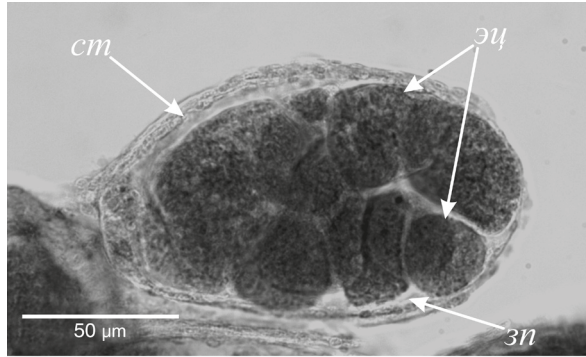


Рис. 1. Дочерняя спороциста *Cercaria nigrospora*, тотальный препарат: зп — зародышевая полость; ст — стенка тела; эц — эмбрионы церкарий

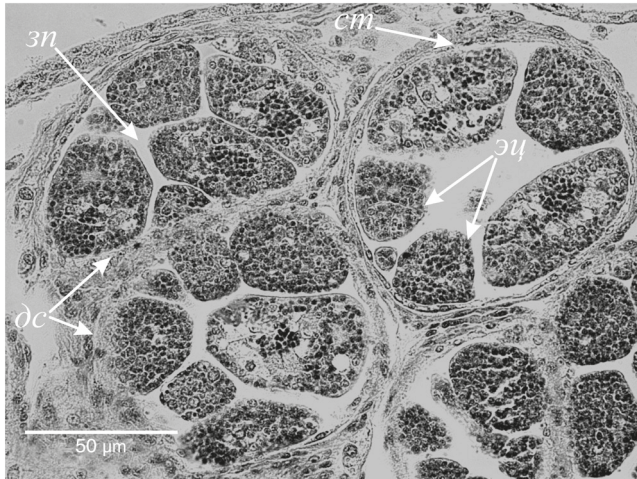


Рис. 2. Фрагмент гистологического среза через гепатопанкреас моллюска *Viviparus viviparus*, зараженного дочерними спороцистами *Cercaria nigrospora*: дс — дочерние спороцисты; зп — зародышевая полость; ст — стенка тела; эц — эмбрионы церкарий

биологических образцов для их изучения с помощью метода компьютерной микротомографии (microCT).

2. Реконструкция по серийным гистологическим срезам

Различают два основных варианта реконструкций по срезам — плоскостные (графические) и пластические (объемные). Оба способа многократно моди-

фицировали [Туркевич, 1967], однако их суть всегда сводится к изготовлению серии рисунков, обязательно с использованием рисовального аппарата (для точной передачи пропорций). Далее (в случае пластической реконструкции) контуры срезов вырезают и складывают в стопку, после чего с изготовленной трехмерной модели выполняют «чистовой» рисунок, на котором изображают все особенности пространственной организации интересующих структур [Иванов и др., 1981]. Графические способы реконструкции в целом связаны с последовательным нанесением серии срезов на один лист кальки. В конечном результате получают набор контурных линий, отражающий форму изучаемого объекта [Иванов и др., 1981; Туркевич, 1967]. Применение данных методов весьма трудоемко: необходимо изготавливать большое количество рисунков; использовать «направляющие элементы» (т.е. залитые в блок вместе с организмом объекты, обладающие заведомо известной формой) для правильной ориентировки рисунков срезов относительно друг друга; и др. (подробнее см. [Туркевич, 1967]).

В настоящее время трехмерную реконструкцию внутренних структур организмов можно выполнять с использованием различного программного обеспечения. В частности, в наличии Ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» НП СПбГУ имеется седьмая версия программы Bit-planeImaris® [<http://researchpark.spbu.ru/news-biomed-rus?start=15>]. В ней возможна обработка серии микрофотографий гистологических срезов в режиме автоматической и ручной реконструкции (см. ниже).

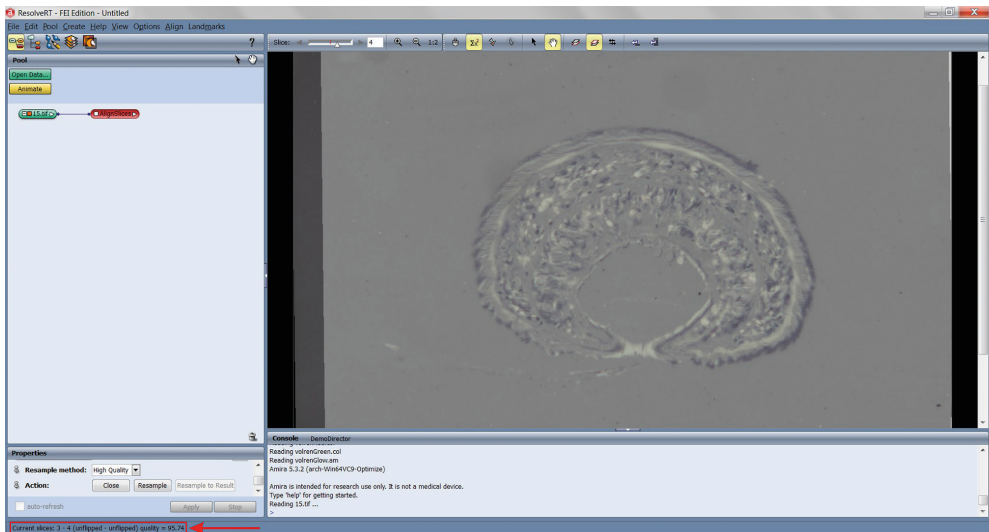


Рис. 3. Работа в программе Amira®. Стрелка в левом нижнем углу указывает на качество выполненного выравнивания (см. пояснения в тексте)

Предварительно все используемые изображения должны быть «выровнены» относительно друг друга для получения более точной реконструкции. «Выравнивание» можно осуществлять в целом ряде программ, однако мы предлагаем использовать весьма простое в освоении программное обеспечение Amira®. После загрузки в программу набора фотографий применяют опцию AlignSlices, и двигают каждую из них до тех пор, пока границы объекта на предыдущем и последующем изображениях не совпадут (рис. 3). При этом программа автоматически оценивает качество выполненного «выравнивания» в числовых значениях, ориентируясь на соответствие в расположении точек, обладающих одинаковым цветом (рис. 3). Затем, после применения функции Resample, Amira® создает набор «выровненных» фотографий, которые необходимо сохранить в формате JPEG или TIFF для последующего использования. В качестве следующего шага мы рекомендуем объединить фотографии в единый стек с помощью программы Fiji [Schindelin et al., 2015]. Применение данного программного обеспечения позволяет выставить правильную размерность (при использовании актуальной шкалы) и «толщину среза» (voxel depth). Все это необходимо для дальнейшей работы со стеком в программе BitplaneImaris®.

Однако следует оговориться, что данное программное обеспечение рассчитано в первую очередь на автоматическую реконструкцию набора изображений, полученных при конфокальном микрокопировании. При этом функция автоматической реконструкции практически неприменима при работе с серией фотографий гистологических срезов. Это связано с тем, что в отличие от изображений, получаемых с помощью конфокального или флуоресцентного микроскопа (характеризующихся темным фоном и ярким сигналом), на цветных или черно-белых фотографиях гистологических срезов разница между контрастностью фона и объекта невелика. Данный недостаток может быть частично нивелирован при дополнительной обработке фотографий в программе Adobe Photoshop® (или другом графическом редакторе). Но даже после соответствующих изменений разница между контрастностью фона и объекта оказывается недостаточной для получения достоверной реконструкции, выполняемой программой BitplaneImaris® автоматически.

Именно поэтому все операции приходится выполнять вручную. Для начала в программу BitplaneImaris® загружают заранее подготовленный стек фотографий (см. выше) и включают опцию Surface. Затем, пропустив шаг Automatic Creation, на каждой из фотографий обводят интересующий участок среза (рис. 4). После чего применяют команду Create Surface (рис. 4). В результате программа объединяет все обведенные участки, но вместо «трехмерной» реконструкции генерирует плоское изображение (рис. 5). Это связано с тем, что при загрузке в BitplaneImaris® стека микрофотографий по умолчанию неправильно выставляется «толщина среза» (voxel size; рис. 6).

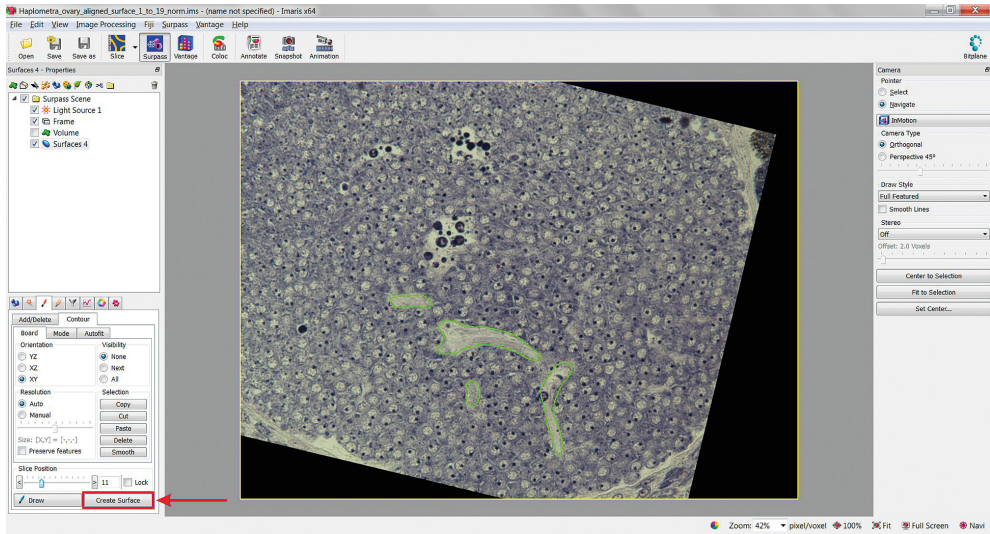


Рис. 4. Работа в программе BitplaneImaris®. Стрелка в левом нижнем углу указывает на команду Create Surface. Зеленым цветом на фотографии среза обведены области интереса (см. пояснения в тексте)

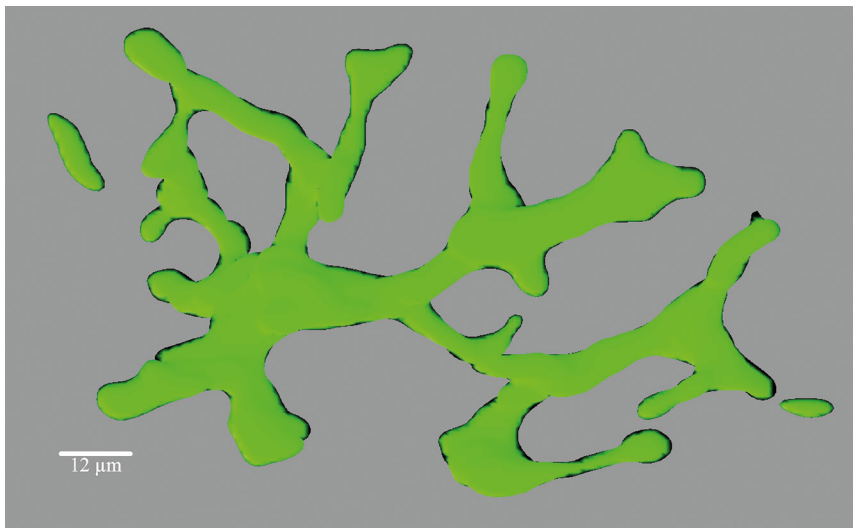


Рис. 5. «Трёхмерная» реконструкция. Плоское изображение, генерируемое программой BitplaneImaris® без выставления толщины среза (см. пояснения в тексте)

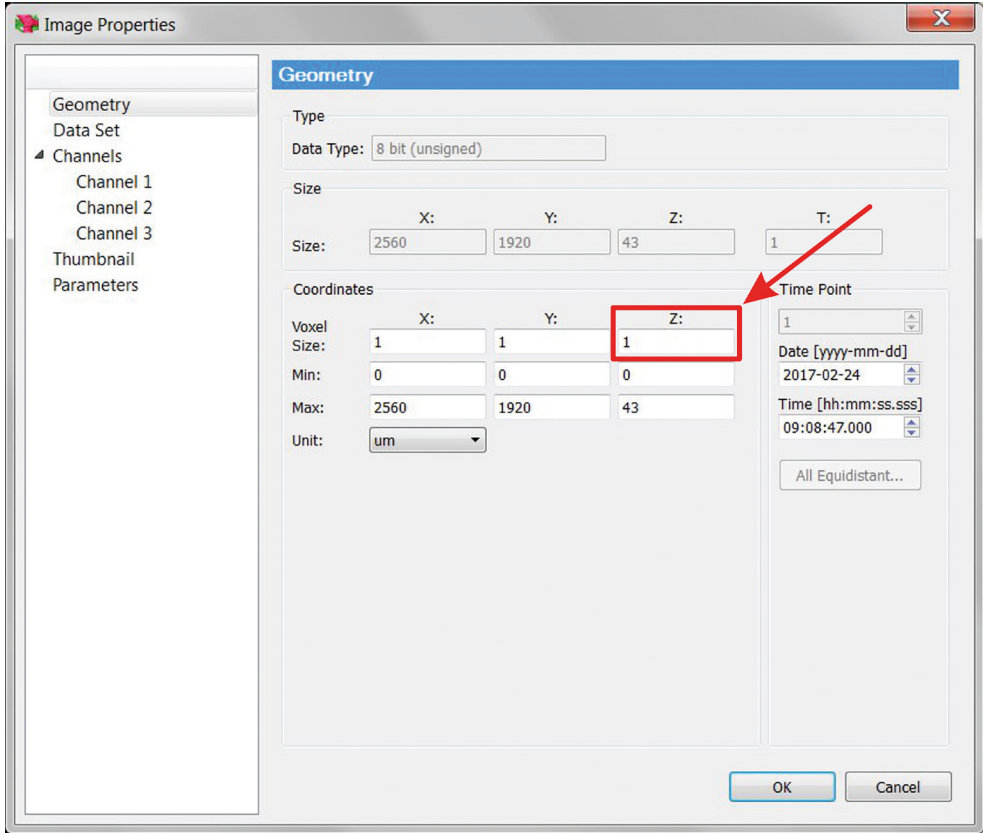


Рис. 6. Работа в программе Bitplanemaris®. Стрелка указывает на параметр «толщина среза», по умолчанию стоит единица (см. пояснения в тексте)

При соблюдении определенных условий (реконструируемая структура не обладает сложной пространственной организацией; перед исследователем не стоит задача изобразить ее в плоскости, отличной от плоскости резки; и пр.) можно исправить положение, обрисовав контуры объекта в каком-либо графическом редакторе (например, CorelDraw™). В конечном итоге получают плоскую иллюстрацию, обладающую элементами объема (рис. 7).

Для изготовления настоящей, объемной реконструкции необходимо после загрузки в программу стека фотографий и перед реконструкцией открыть раздел Image Properties и выставить значение voxel size (по оси Z) в соответствии с реальной толщиной одного среза (рис. 6). Затем осуществляют «ручную» реконструкцию по приведенной выше схеме. В результате программа генерирует объемное изображение реконструированного объекта (рис. 8).

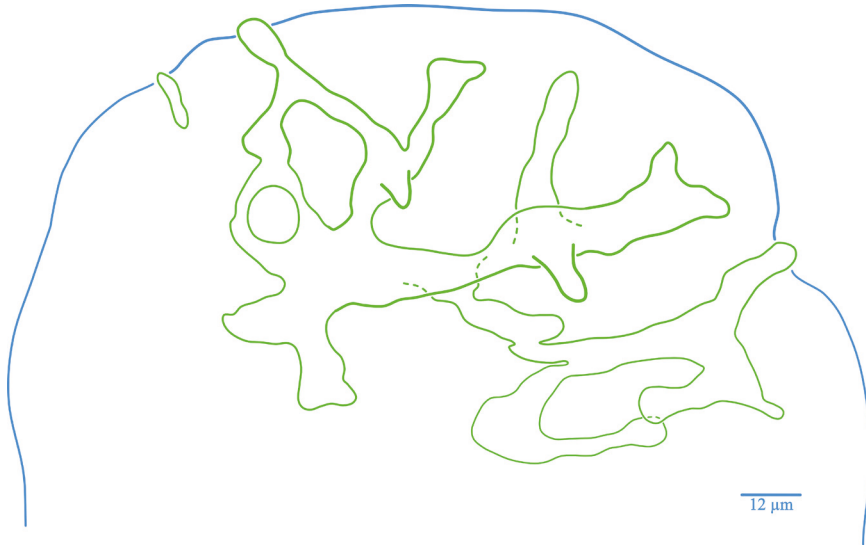


Рис. 7. Реконструкция фрагмента сети из элементов паренхимы, проникающих в яичник мариит *Haplometra cylindracea*. Синим цветом обозначена граница женской гонады. За основу взят рис. 5, на который добавлены элементы объема (см. пояснения в тексте)

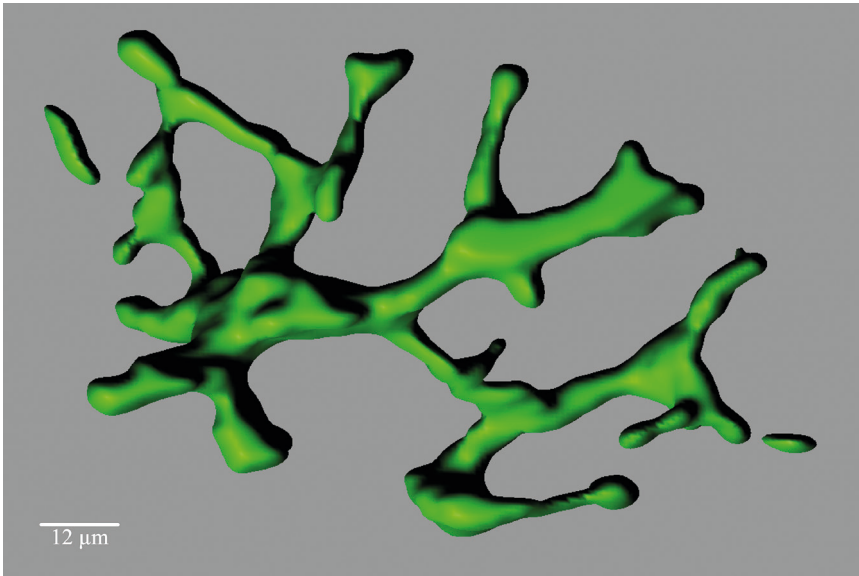


Рис. 8. Трехмерная реконструкция фрагмента сети из элементов паренхимы, проникающих в яичник мариит *Haplometra cylindracea* (то же, что на рис. 5 и 7). Объем появляется в результате правильного указания толщины среза (см. пояснения в тексте)

В завершение раздела следует отметить, что возможности программы не безграничны. Она отлично подходит для реконструкции, например, однородных разветвленных структур (см. рис. 7, 8). Более сложные объекты, состоящие из нескольких «вложенных» друг в друга элементов (организмы, обладающие полостью, заполненной каким-либо содержимым; и пр.) реконструировать в данной программе далеко не так удобно (хотя и возможно). Также весьма затруднительно осуществить реконструкцию организма целиком, со всеми особенностями его внутренней организации.

3. Трехмерная реконструкция биологических объектов с использованием рентгеновской компьютерной микротомографии

Применение данного метода позволяет изучить пространственное расположение структур в теле организма, не нарушая его целостности [Metscher, 2009a]. Более того, разрешение изображения, полученное методом микротомографии, сопоставимо с разрешением светового микроскопа (до 1 мкм), что значительно расширяет возможности использования данной методики в сравнительно-морфологических исследованиях. Следует также отметить, что разрешение зачастую определяется размером исследуемого образца. Однако существуют определенные трудности, с которыми приходится сталкиваться при изучении трематод (и других биологических объектов) методом микротомографии. Из-за низкой плотности мягкие ткани живых организмов практически не задерживают рентгеновские лучи, что не позволяет применять данную методику напрямую [Metscher, 2009a; 2009b]. Обойти этот недостаток можно двумя способами. С одной стороны, контрастировать объект. Для этой цели пригоден целый ряд соединений: раствор фосфорно-вольфрамовой кислоты, тетраоксид осмия или водный раствор йода с добавлением йодида калия [Metscher, 2009a]. С другой — осуществлять съемку биологических образцов при низких значениях ускоряющего напряжения и силы тока томографа (см. ниже; см. таблицу). Более того, можно совмещать оба этих способа: не только контрастировать объект, но и сканировать при определенных параметрах (см. ниже).

Мы протестировали методику микротомографии на моллюске *Succinea putris* Linnaeus, 1758, зараженном спороцистой *Leucochloridium paradoxum* Sarus, 1835. Раковина янтарки была удалена с помощью пинцета, а в мантии сделано небольшое отверстие препаровальной иглой (для лучшей проницаемости фиксатора и контрастирующего раствора). Затем моллюск был целиком зафиксирован в растворе Ценкера с добавлением ледяной уксусной кислоты (10 к 1). Все последующие манипуляции соответствуют протоколу, приведенному в следующем абзаце.

Таблица. Параметры микротомографического сканирования моллюска *Succinea putris*, зараженного спористой *Leucochloridium paradoxum*

[System] Scanner=Skyscan1172 Instrument S/N=12001205 Hardware version=G Software=Version 1. 5 (build 14) Home directory=C:\skyscan Source Type=Hamamatsu 100/250 Camera=SHT 11Mp camera Camera Pixel Size (um)= 9.00 CameraXYRatio=1.0000 Incl.in lifting (um/mm)=0.0000 [Acquisition] Data directory=C:\Results1\Kryuchkova\Skuchas\31_1_Leucochloridium_in_Succinea_2 Filename Prefix=31_1_Leucochloridium_in_Succinea_2 Number of Files= 998 Source Voltage (kV)= 74 — ускоряющее напряжение Source Current (uA)= 100 — сила тока Number of Rows= 2664 Number of Columns= 4000 Image crop origin X= 0 Image crop origin Y=0 Camera binning=1×1 Image Rotation= 0.2 — шаг сканирования (угол поворота образца) Gantry direction=CC Image Pixel Size (um)= 4.28 — разрешение Object to Source (mm)=101.650 Camera to Source (mm)=213.971 Vertical Object Position (mm)=36.748 Optical Axis (line)=1332 Filter=no filter — съемка велась без фильтров Image Format=TIFF Depth (bits)=16 Screen LUT=0 Exposure (ms)= 460 Rotation Step (deg)=0.200 — шаг сканирования Frame Averaging=ON (3) — количество усреднений на одну съемку Random Movement=ON (10)

Примечание. Полу жирным курсивом выделены ключевые параметры (см. пояснения в тексте).

После фиксации (для которой можно использовать и другие реагенты: раствор Буэна, глутаровый альдегид, и др.; см. [Metscher, 2009a; 2009b]) объект переводят в 70 % этиловый спирт. Затем образец контрастируют в 0.3 % водном растворе фосфорно-вольфрамовой кислоты. Контрастирующий раствор готовят следующим образом: 30 мл 1 % водного раствора фосфорно-вольфрамовой кислоты смешивают с 70 мл 96 % или абсолютного этилового спирта [Metscher, 2009a]. Готовый контрастирующий раствор хранится вечно [Metscher, 2009a]. Объект в нем выдерживают в течение как минимум 10–12 часов. После в продолжение часа отмывают в 70 % спирту. Затем образец для хранения переносят в небольшую пробирку.

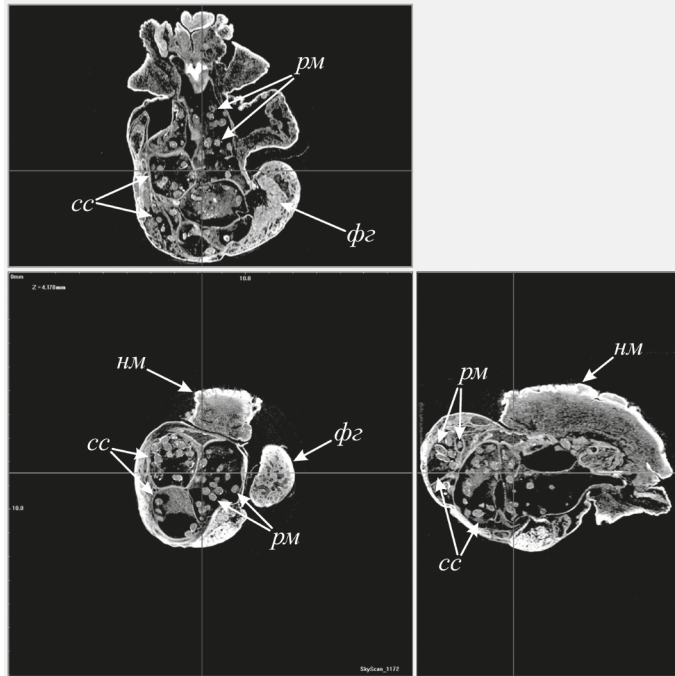


Рис. 9. Микротомографические сечения янтарки, зараженной спорозистой *L. paradoxum*. Программа DataViewer®.

Слева внизу — сечение перпендикулярное оси вращения образца (ось Z); справа внизу — сечение в сагиттальной плоскости (ось X); слева вверху — сечение в фронтальной плоскости (ось Y); нм — нога моллюска; рм — развивающиеся метацеркарии; сс — фрагменты столонов спорозисты; фг — фрагмент гепатопанкреаса моллюска

Чтобы избежать высыхания при нагревании в рентгеновском пучке (и, как следствие, изменения формы и размеров образца), сканирование было проведено в 96 % этиловом спирте, на микротомографе Bruker Skyscan 1172 (ресурсный центр «Рентгенодифракционные методы исследования» НП СПбГУ; <http://researchpark.spbu.ru/xrd-rus>). Параметры съемки приведены в таблице. Следует отметить, что для улучшения качества итогового изображения можно использовать минимальный угол поворота образца и до 4–5 усреднений (см. таблицу). Кроме того, все ключевые параметры, указанные в таблице, подбирают под каждый объект эмпирически до получения наиболее удовлетворительного результата.

После завершения сканирования полученный массив теневых изображений реконструируют в программе NRecon (Bruker Skyscan, Belgium), а затем сохраняют как набор микротомографических изображений (сечений) объекта в растровом формате (JPEG, BMP). Полученные изображения просматри-

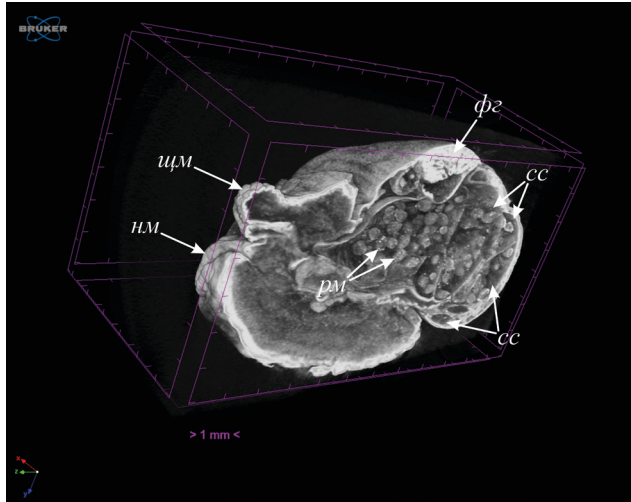


Рис. 10. Микротомографическое 3D-изображение янтарки, зараженной спорозистой *L. paradoxum*: нм — нога моллюска; рм — развивающиеся метацеркарии; сс — фрагменты столонов спорозисты; фг — фрагмент гепатопанкреаса моллюска; щм — щупальце моллюска. Программа CTvox®

вают, обрабатывают и анализируют с помощью программ DataViewer® (рис. 8), CTvox® (Bruker Skyscan, Belgium) и ряда других. DataViewer® открывает полученный при реконструкции массив сечений, перпендикулярных оси вращения образца при съемке (*Z*), а также два других сечения, находящихся в перпендикулярных плоскостях к оси *Z* (рис. 8). Данная программа позволяет просматривать весь массив по эти трем направлениям, обрабатывать и сравнивать изображения, а также производить некоторые расчеты. CTvox® создает объемное изображение объекта и позволяет рассматривать его с разных сторон, получать сечения в разных плоскостях. Что позволяет с определенной степенью детализации изучить особенности внутреннего строения просканированного образца (рис. 9).

Использование компьютерной микротомографии дает интересные результаты для сравнительно-морфологических исследований. Необходимым условием для получения качественных изображений является контрастирование объекта (см. выше) и тщательный подбор параметров сканирования (см. выше; см. таблицу). Данный метод обладает достаточной разрешающей способностью для трехмерной визуализации как внутренних структур, обладающих сложной пространственной организацией, так и организмов целиком. Большой детализации можно достичь, на наш взгляд, не только за счет усовершенствования методов контрастирования и последующей пробоподготовки, но также и в случае индивидуального подбора параметров съемки. Кроме того,

наиболее полные результаты будут получены при совмещении в одном исследовании всех доступных методов для трехмерной реконструкции изучаемых объектов.

Работа выполнена в рамках проекта «Использование методов рентгеновской микротомографии (с использованием микротомографа Skyscan 1172 и нанотомографа Skyscan 2011) для изучения морфологии паразитических и свободноживущих беспозвоночных животных» (шифр ИАС СПбГУ: 1.52.1489.2017).

Литература

- Holdsworth D. W., Thornton M. M. 2002. Micro-CT in small animal and specimen imaging. *Trends Biotechnol.* 20(8): 34–39. doi: 10.1016/S0167-7799(02)02004-8
- Metscher B. D. 2009a. MicroCT for developmental biology: A versatile tool for high-contrast 3D imaging at histological resolutions. *Dev. Dyn.* 238(3): 632–640. doi: 10.1002/dvdy.21857
- Metscher B. D. 2009b. MicroCT for comparative morphology: simple staining methods allow high-contrast 3D imaging of diverse non-mineralized animal tissues. *BMC Physiol.* 9(1): 11. doi: 10.1186/1472-6793-9-11
- Schambach S. J., Bag S., Schilling L., Groden C., Brockmann M. A. 2010. Application of micro-CT in small animal imaging. *Methods.* 50(1): 2–13. doi: 10.1016/j.ymeth.2009.08.007
- Schindelin J., Rueden C. T., Hiner M. C., Eliceiri K. W. 2015. The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Mol. Reprod. Dev.* 82(7–8): 518–529. doi: 10.1002/mrd.22489
- Иванов А. В., Полянский Ю. И., Стрелков А. А. 1981. *Большой практикум по зоологии беспозвоночных.* 3-е изд., перераб. и доп. Том 1. Москва, Изд-во Высшая школа.
- Туркевич Н. Г. 1967. *Реконструкция микроскопических объектов по гистологическим срезам.* Москва, Изд-во Медицина.

В. В. Гавриловская, Л. В. Чистякова*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИНFUЗОРИЙ *PARAMECIUM CAUDATUM* EHRENBURG, 1832 ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ ОБЩЕЙ ТОКСИЧНОСТИ СУСПЕНЗИЙ НАНОЧАСТИЦ

В коллекции RC ССМ [<http://researchpark.spbu.ru/collection-ссем-рус>], которая поддерживается на базе ресурсного центра «Культивирование микроорганизмов» НП СПбГУ, представлено довольно большое видовое разнообразие инфузорий и других гетеротрофных протистов. Значительную часть коллекции составляют виды рода *Paramecium* Müller 1773, в общей сложности в коллекции представлено более 250 клонов, выделенных из природных популяций, собранных в разных географических точках. Таким образом, в нашем распоряжении имеется достаточно богатый выбор объектов для различных экспериментальных работ. Традиционно в качестве модельных объектов в исследованиях самых различных направлений широко используются парамеции, что обусловлено их довольно крупными размерами и сравнительной легкостью культивирования. В том числе эти инфузории являются удобным объектом для биотестирования. В настоящее время активно развивается производство материалов, обладающих антимикробным действием, с применением наночастиц различных металлов (меди, серебра, никеля и т. д.). Очевидно, что подобные биологически активные материалы при попадании в окружающую среду способны оказывать негативное воздействие на различные компоненты экосистем. В связи с этим при разработке новых материалов, обладающих бактерицидными и бактериостатическими свойствами, представляется важной оценка их общей токсичности. Как правило, в подобных исследованиях используют методы биотестирования с применением нескольких различных тест-объектов [Терехова и др., 2014]. Мы предлагаем использовать инфузорию *Paramecium caudatum* Ehrenberg, 1832 для определения общей токсичности водных суспензий наночастиц различных металлов.

Парамеции — довольно распространенные в пресных водоемах инфузории, обитающие преимущественно на поверхности гниющего органического субстрата. Род *Paramecium* Muller, 1773 в настоящее время включает

* Ресурсный центр «Культивирование микроорганизмов», Научный парк СПбГУ.

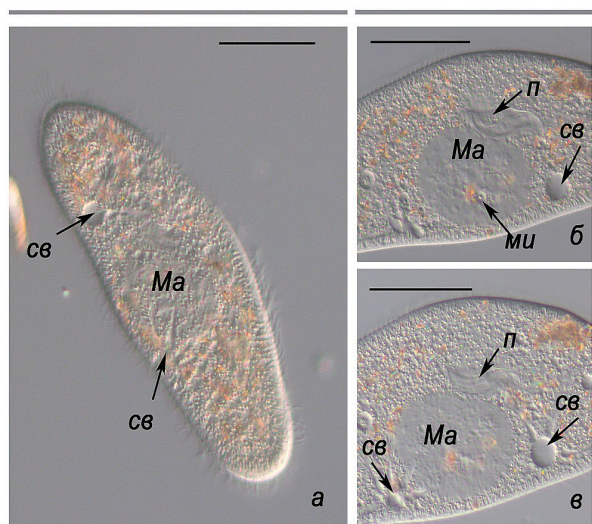


Рис. 1. Строение инфузорий *P. caudatum*:
 Ma — макронуклеус, ми — микронуклеус,
 св — сократительная вакуоль, п — перистом.
 Масштабная линейка 50 мкм

более 20 видов инфузорий [Янковский, 2007]. На светооптическом уровне виды парамеций различают по следующим морфологическим признакам: форма макронуклеуса; количество, структура и положение в клетке микронуклеусов; количество и структура сократительных вакуолей. Детали строения *P. caudatum* представлены на рис. 1.

В лаборатории парамеций культивируют в стеклянных пробирках объемом 16 мл³ под ватными пробками или алюминиевыми колпачками на салатной среде с добавлением бактерий *Klebsiella aerogenes* [Sonneborn, 1970]. Культуру инфузорий, предназначенную для проведения эксперимента, ведут при температуре 25 °С, каждый день в пробирки добавляют 1–2 мл среды, инкубированной с пищевыми бактериями, раз в неделю простейших пересаживают в чистые пробирки. Такой режим культивирования позволяет не только интенсифицировать размножение парамеций, но и синхронизировать их по жизненному циклу, что является важной составляющей при стандартизации условий эксперимента (при соблюдении указанной методики через 3–4 дня большинство инфузорий приступает к делению через 2–3 часа после кормления). Стоковую (музейную) культуру *P. caudatum* поддерживают при температуре +10–12 °С, интервал между кормлениями составляет 2 недели.

При исследовании образцов на общую токсичность желательнее использовать клональную культуру инфузорий (представляющую собой потомство одной клетки). Это позволяет исключить возможные генетические вариации

между особями в популяции и получить более однородные результаты. Клональные культуры довольно быстро вырождаются, клетки становятся менее жизнеспособными, падает скорость размножения, что затрудняет получение материала для проведения эксперимента. Таким образом, культуру парameций для тестирования желательнее обновлять не реже одного раза в год. Для этого можно выделять инфузорий из природных популяций или обращаться для получения культуры в лаборатории, занимающиеся культивированием парameций (например, РЦ СПбГУ «Культивирование микроорганизмов»). Следует иметь в виду, что клоны парameций, выделенные из различных географических популяций, могут значительно отличаться по чувствительности к различным токсикантам. Так, мы проверяли чувствительность 4 клонов *P. caudatum* к модельному токсиканту $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, учитывая процент смертности инфузорий при различных концентрациях и времени воздействия токсиканта. Характеристики клонов и результаты исследований представлены в табл. 1.

Таблица 1. Процент гибели различных клонов инфузорий с течением времени при воздействии модельного токсиканта $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ в концентрации 100 мг/л

Клоны парameций \ Время воздействия	1 час	4 часа	сутки
Уз-4 (Запорожье, Украина)	100 %		
Вл 12-5 (Владимир, Россия)	100 %		
Sp 3-2 (Испания)		100 %	
MF 17-1 (Франция)			80 %

Видно, что клоны Уз-4 и Вл 12-5 оказались наиболее чувствительными, а клон MF-1 — наименее чувствительным к модельному токсиканту. Таким образом, мы рекомендуем, по возможности, тестировать несколько клональных культур парameций из различных географических популяций на чувствительность к определенному виду токсиканта.

Тестирование суспензий наночастиц на общую токсичность удобнее всего проводить в 96-лунковых планшетах для ИФА.

Культуру инфузорий предварительно концентрируют при помощи центрифугирования в течение 3×5 мин при оборотах 3000 об/мин, надосадочную жидкость сразу после центрифугирования удаляют пипеткой. Суспензию для тестирования готовят непосредственно перед началом эксперимента. Навеску наночастиц нужной массы вносят в центрифужную пробирку объемом 2 мл, добавляют 1,5 мл жидкости (используют питьевую воду из бутылок, неминеральную, негазированную, или среду Лозина-Лозинского), тщательно перемешивают на вортексе и сразу же раскапывают по 10 лункам планшета. В каждую

лунку помещают по 150 мкл суспензии наночастиц заданной концентрации и 15 мкл культуры инфузорий. Параллельно с опытными лунками то же количество лунок используют в качестве контроля. В этом случае в лунки вместо суспензии наночастиц добавляют по 150 мкл чистой жидкости, используемой для приготовления суспензии, и 15 мкл культуры инфузорий. Если одновременно тестируют несколько концентраций наночастиц, то количество лунок для каждой концентрации, в том числе и контрольных, должно быть равно. Количество повторностей эксперимента — не менее трех. Количество живых клеток во всех лунках подсчитывают в начале эксперимента, а затем через 1, 4 и 24 часа. Погибшими считаются инфузории, не проявляющие двигательной активности. Выживаемость инфузорий N вычисляется по формуле $N = (N_2/N_1) \times 100$, где N_2 — среднее арифметическое (из трех повторностей) количества инфузорий в начале эксперимента, N_1 — в конце эксперимента.

Образец считается остротоксичным в исследуемой концентрации, если через сутки наблюдается гибель более 50 % инфузорий.

При необходимости наличие достоверных различий между опытом и контролем (токсичность образца) оценивают, используя метод однофакторного дисперсионного анализа в программе Statistica v. 6.0 и выше, в качестве фактора рассматривается воздействие суспензии наночастиц. Если планируется проводить дисперсионный анализ, необходимо, чтобы количество клеток было одинаковым во всех трех повторностях. Для этого лишние инфузории удаляют оттянутой стеклянной пипеткой Пастера с минимальным количеством жидкости, стараясь, чтобы инфузории были распределены по лункам более или менее равномерно.

Определение средней токсической концентрации образцов наночастиц можно проводить, используя метод Спирмена — Кербера [Лакин, 1990]. Этот способ позволяет не только рассчитать среднюю дозу эффекта, но и построить доверительный интервал для генеральной средней, при этом количество клеток инфузорий в опыте для каждой тестируемой концентрации может не превышать 10. В этом случае при приготовлении суспензии обычно используют метод серийных разведений. В качестве исходной точки можно использовать ПДК, установленную для тестируемого вещества (в ионной форме), и в зависимости от результата готовить серию разведений повышающейся или понижающейся концентрации. Тестирование проводят в 48 луночных планшетах, в каждую лунку вносят 1,5 мл суспензии и 6–10 клеток инфузорий. Если для нанесения наночастиц используют композиты с крупным размером частиц, навески можно вносить непосредственно в лунки планшета. При проведении эксперимента необходимо соблюдать следующие условия. Тестируемые концентрации в последовательном ряду должны отличаться друг от друга на одну и ту же величину; количество клеток в группах должно быть одинаковым. Для того чтобы выровнять количество клеток в лунках, можно

использовать следующий способ. Вначале подсчитывают, сколько клеток инфузорий в среднем приходится на 20 мкл концентрированной культуры (по результатам 5 измерений). Рассчитывают, какой объем V культуры нужно отобрать, чтобы в каждую каплю попало в среднем 30 клеток. На дно пластиковой чашки Петри наносят отдельные капли среды объемом 50 мкл и к ним добавляют соответствующий объем V культуры инфузорий. Из подготовленных капель с инфузориями в лунки планшета вносят 2×15 мкл. При необходимости количество инфузорий в лунках выравнивают при помощи пипетки Пастера. Результаты эксперимента удобно представлять в виде таблицы.

Концентрация				сумма
Число погибших клеток				
Доля погибших клеток				
Накопленная доля погибших клеток				

Среднюю дозу эффекта определяют по формуле

$$\bar{m} = m - d(P_1 - 0,5),$$

где m — минимальная доза, вызывающая эффект у 100 % клеток, d — разница между концентрациями, P_1 — суммарная доля реагирующих на воздействие инфузорий.

Среднее квадратичное отклонение вычисляют по формуле

$$s_m = d \sqrt{2P_2 - P_1^2 - P_1 - \frac{1}{12}},$$

где P_2 — сумма ряда накопленных долей реагирующих на воздействие клеток. Доверительный интервал для истинной средней дозы эффекта

$$\Delta m = t s_m / \sqrt{n},$$

где $t = 1,96$ для 5 % уровня значимости.

Литература

- Лакин Г. Ф. 1990. *Биометрия: учеб. пособие для биол. спец. вузов*. Москва, Высш. школа.
- Терехова В. А., Воронина Л. П., Гершкович Д. В. и др. 2014. *Биотест-системы для задач экологического контроля: методические рекомендации по использованию стандартизованных тест-культур*. Москва, Доброе слово.
- Янковский А. В. 2007. Тип Ciliophora Doflein, 1901 — Инфузории. Систематический обзор. *Протисты. Ч. 2 (Руководство по зоологии)*. С.-Петербург, Наука: 415–997.
- Sonneborn T. M. 1970. Methods in Paramecium research. In: *Prescott, D. M. (ed.). Methods in Cell Physiology*. New York, London, Academic Press: 241–339.

ИЗОЛЯЦИЯ ИЗ ПРИРОДНЫХ МЕСТООБИТАНИЙ И ВЫДЕЛЕНИЕ В КУЛЬТУРУ ИНFUЗОРИЙ *STYLONYCHIA MYTILUS* EHRENBURG 1838

Инфузории *Stylonychia mytilus* Ehrenberg 1838 используются в качестве тест-объекта при определении общей токсичности различных сред и материалов, в том числе кормов, комбикормов и комбикормового сырья [ГОСТ 31674-2012, 2014]. Известно, что при длительном поддержании в лабораторных условиях наблюдается так называемый процесс старения культур. Понижается жизнеспособность инфузорий, увеличивается неоднородность реакции отдельных клеток на воздействие при проведении тестирования. Таким образом, становится затруднительным получить статистически достоверные результаты в эксперименте. В связи с этим рекомендуется обновлять тест-культуру стилонихий не реже 1 раза в год [ГОСТ 31674-2012, 2014]. Однако руководство по выделению *St. mytilus* из природных местообитаний и подготовке культур, пригодных для биотестирования, отсутствует. Наши рекомендации по введению *St. mytilus* из природной популяции в лабораторную культуру мы приводим в настоящей публикации.

Стилонихии — брюхоресничные инфузории (Polyhymenophora, Hymenotrichida) [Янковский, 2007]. Обычно они скользят по субстрату, совершая иногда характерные резкие движения на одном месте, или плавают в толще воды. Форма клетки уплощенная, часто слегка расширенная спереди и суженная сзади. Практически весь ресничный аппарат сконцентрирован на брюшной стороне. Для стилонихий, как и других брюхоресничных инфузорий, характерно образование цирр — структур, формирующихся за счет слияния нескольких отдельных ресничек. Род *Stylonychia* Ehrenberg 1830 насчитывает свыше 15 видов. Для использования в качестве тест-объекта рекомендована *St. mytilus* как повсеместно распространенная, легко культивируемая и чувствительная к разным токсинам инфузория. Детали строения *St. mytilus* представлены на рис. 1 [Иванов и др., 1981]. Длина клетки колеблется между 100–350 мкм. У *St. mytilus* выделяют следующие группы брюшных цирр: фронтальные, брюшные, анальные, каудальные, маргинальные.

* Ресурсный центр «Культивирование микроорганизмов», Научный парк СПбГУ.

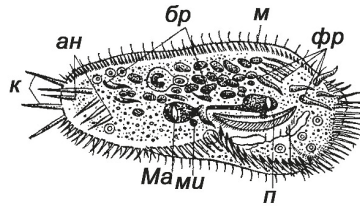


Рис. 1. Схема строения *Stylonychia mytilus*: фр — фронтальные цирри, м — маргинальные цирри, бр — брюшные цирри, ан — анальные цирри, к — каудальные цирри, п — перистом, Ма — макронуклеус, ми — микронуклеус

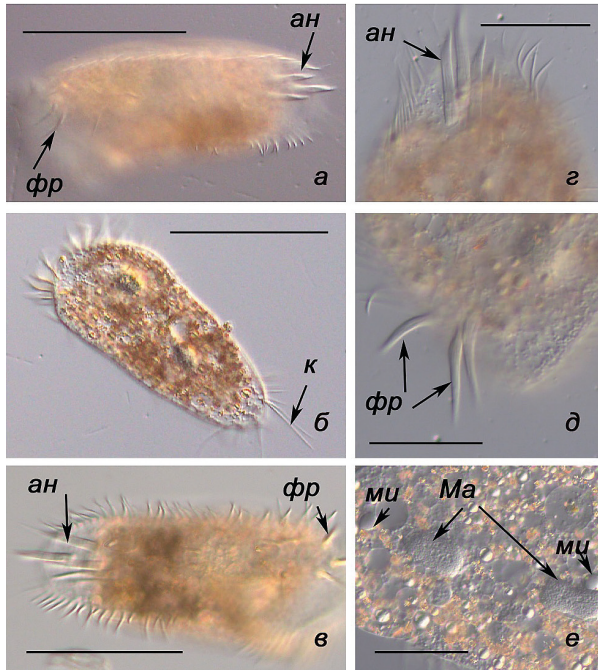


Рис. 2. Детали строения *St. mytilus* (контраст Номарского): а — в — общий вид, г — каудальные цирри, д — фронтальные цирри, е — ядерный аппарат. Обозначения как на рис. 1. Масштабные линейки: а — в — 100 мкм, г — е — 50 мкм

При изучении прижизненных препаратов хорошо заметны три крупные фронтальные цирри, пять анальных и три каудальных, которые иногда изгибаются на концах (рис. 2). На светооптическом уровне также следует обратить внимание на двойной макронуклеус, две части которого связаны перетяжкой; к обеим половинкам *Ма* прилегают маленькие сферические микронуклеусы.

Строение стилонихий на прижизненных препаратах лучше всего изучать с использованием микроскопа, оснащенного дифференциальным интерференционным контрастом (контрастом Номарского) (например, Leica DM2500), клетки при этом должны быть слегка придавлены (рис. 2). Организацию ресничного аппарата стилонихий можно рассмотреть и с использованием инвертированного микроскопа (например, Nikon TS100) непосредственно в чашках Петри, с помощью метода фазового контраста.

Места обитания стилонихий — водоемы с пресной стоячей водой, такие как пруды, озера, застойные области рек и ручьев. Стилонихии размножаются на мелководье, в придонном слое вблизи органического субстрата, обычно на поверхности гниющих растительных остатков. Краткие рекомендации по отбору проб стилонихий из природных популяций изложены в Приложении 1.

Для выделения *St. mytilus* в культуру образец природной воды с находящимися в ней микроорганизмами переносят в чашку Петри и тщательно обследуют с помощью бинокулярной лупы или стереомикроскопа. В микроаквариум вносят 2–3 мл культуральной среды, минеральной (Лозина-Лозинского [ГОСТ 31674-2012, 2014], также можно использовать питьевую воду из бутылок) или органической (WG, см. Приложение 3), инкубированной с пищевыми бактериями (например, *Klebsiella aerogenes*). С помощью капиллярной пипетки отбирают стилонихий и помещают их в микроаквариум. Если наряду со стилонихиями в микроаквариум попали другие простейшие, следует либо удалить чужеродные организмы, либо перенести стилонихий в аналогичный микроаквариум. В культуре инфузорий не должно быть чужих клеток.

Далее следует определить видовую принадлежность стилонихий. Для целей биотестирования обычно бывает достаточно исследовать их строение на прижизненных препаратах, как было описано выше, и выявить комплекс специфических признаков (размеры клетки, организация ресничного аппарата и строение ядер). Более точное определение производят после детального изучения цилиатуры на препаратах, импрегнированных серебром [Иванов и др., 1981], или с использованием молекулярно-генетических методов. При условии однородности полученных клеток, для определения достаточно просмотреть 3–5 инфузорий.

Далее в микроаквариум с инфузориями добавляют в качестве корма одноклеточные зеленые водоросли *Chlorogonium elongatum*. из расчета 1 капля плотной суспензии на 250–500 мкл питательной среды, и поддерживают растущую культуру в соответствии с поставленными задачами.

При необходимости генетически однородной (клональной) культуры стилонихий поступают следующим образом: в чашки Петри диаметром 40 мм добавляют по 0.5–1 мл среды (Лозина-Лозинского, WG, воды), после чего в каждую чашку вносят по одной клетке стилонихий и 1 каплю корма. Просматри-

вают чашки, контролируя, чтобы в каждой находилось только по одной инфузории.

Чашки помещают во влажную камеру при температуре 18–20 °С. Факт клонирования записывают в рабочий журнал с указанием происхождения материала. Чашки регулярно просматривают (раз в 1–3 дня) и при необходимости подкармливают. Когда количество стилонихий в чашках достигнет 15–20, их переносят в чашку большего размера и т. д.

В рабочем журнале записывают индекс полученного клона и тот же индекс указывают на чашке. Новые клоны подкармливают через день-два, в зависимости от темпа роста культуры. Как правило, из одной популяции выделяют несколько клонов стилонихий.

В лабораториях, занимающихся биотестированием, обычно поддерживают небольшой объем музейной (стоковой) культуры стилонихий, откуда при проведении экспериментов берут определенное количество инфузорий для получения массовой культуры. По стандартной методике стилонихий культивируют на среде Лозина-Лозинского с добавлением дрожжей и обязательным переносом культуры в свежую среду два раза в неделю [ГОСТ 31674-2012, 2014]. Этот способ позволяет быстро наращивать биомассу инфузорий, но не очень удобен для длительного поддержания музейной культуры. В ресурсном центре «Культивирование микроорганизмов» НП СПбГУ мы используем альтернативный способ ведения коллекционных клонов *St. mytilus*. Стилоникий культивируют в пластиковых чашках Петри диаметром 60 мм. В качестве культуральной среды используют питьевую негазированную бутилированную воду (типа Аква Минерале) или среду WG*. Культуру ведут при температуре 18 °С, один-два раза в неделю (зависит от скорости поедания корма данной культурой) кормят одноклеточными зелеными водорослями *Chl. elongatum* (1–2 мл плотной суспензии водорослей на чашку). Часть культур поддерживается при более низкой температуре (10–12 °С), что позволяет кормить стилонихий 1 раз в неделю, также 1–2 мл плотной суспензии водорослей на чашку. Пересев осуществляют по мере зарастания культуры, но опыт показывает, что популяция стилонихий стабильно существует в одной и той же чашке 1–2 месяца. При использовании вышеописанных рекомендаций формируется стабильная популяция стилонихий, не подверженная резким перепадам численности, что, безусловно, важно при поддержании музейных коллекций.

При необходимости проведения эксперимента, стилоники легко переводятся на культивирование по методике ГОСТ.

* По нашим наблюдениям, культура стилонихий наиболее стабильна при использовании среды WG.

Приложение 1. Рекомендации по отбору проб

Стилонихии обитают на мелководье, в придонном слое, обычно на поверхности гниющих растительных остатков.

Круговым или зигзагообразным движением необходимо предварительно стряхнуть инфузорий с субстрата (детрита) и отобрать 30–50 мл воды вместе с частицами субстрата в подходящую емкость. В пробе должно быть некоторое количество частиц субстрата или придонного грунта.

Пробу воды с находящимися в ней микроорганизмами переносят в чашку Петри и тщательно обследуют с помощью бинокулярной лупы.

Если нет возможности обследовать пробу сразу, можно оставить ее в чашке Петри на несколько дней, добавив 1–2 зернышка риса. Стилонихии активно размножаются на рисовом субстрате. Однако нежелательно оставлять пробу более чем на 3–5 дней, поскольку на богатом органикой субстрате могут интенсивно размножиться и другие организмы.

Приложение 2. Подготовка кормовой культуры водорослей *Chlorogonium elongatum*

Кормовую культуру водорослей наращивают в стеклянных бутылках с завинчивающимися крышками объемом 250 или 500 мл, при комнатной температуре и дневном освещении, желательно — при постоянном продуве воздухом при помощи компрессора; плотность продува регулируют интенсивностью завинчивания крышки (рис. 3). Для культивирования используют среду следующего состава: 1000 мл дистиллированной воды, 1 мл 2% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 1 мл 10% NaNO_3 , 65 мл почвенного экстракта (среду готовят в соответствии с модифицированной методикой, используемой сотрудниками коллекции культур Института эволюции и экологии Тюбингенского университета). Среду разливают по стеклянным бутылкам и автоклавировуют 40 минут при температуре 100 °С. В готовую охлажденную среду вносят 5–10 мл культуры хлорогониума. Плотная суспензия водорослей обычно образуется в течение 5–7 дней, готовую кормовую культуру можно хранить в закрытой бутылки при температуре 18–20 °С и дневном освещении в течение 1–2 недель. Для получения новой порции культуры небольшой объем суспензии водорослей в стерильных условиях переносят в свежую среду и инкубируют, как указано выше.

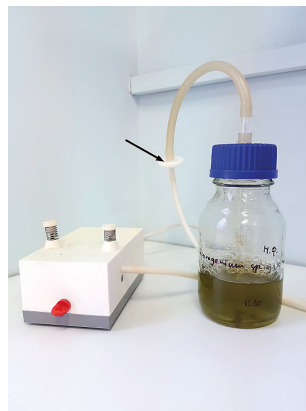


Рис. 3. Установка для культивирования хлорогониума. Стрелка — насадка шприцевая фильтрующая, размер пор 0,22 мкм

Желательно также иметь стоковую культуру хлорогониума, которая хранится в стеклянных пробирках под ватными пробками при температуре 10–12°C, пересев осуществляют раз в 3–4 месяца на ту же среду.

Приложение 3. Приготовление среды WG [Beisson et al., 2010]

Приготовление концентрата. Порошок из проростков пшеницы (WG) в количестве 5 г помещают в коническую колбу или стакан, добавляют 75 мл дистиллированной воды. Кипятят 15 минут, слегка остужают, фильтруют через бумажный фильтр. Доводят объем фильтрата до 100 мл (можно разлить на 2–3 порции меньшего объема). Автоклавируют 20 минут при 120°C. Стерильный концентрат хранят в холодильнике при 4–5°C.

Приготовление рабочего раствора. Чтобы приготовить рабочий раствор WG, 1 мл стокового раствора добавляют к 100 мл дистиллированной воды и автоклавируют 20 минут при 120°C.

В колбу (флакон) с рабочим раствором WG вносят кормовые бактерии (*Klebsiella aerogenes*) и инкубируют среду в течение 12–20 часов в термостате при 25–30°C.

Литература

- ГОСТ 31674-2012. 2014. *Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения общей токсичности.* Межгосударственный стандарт ГОСТ 31674-2012. Москва, Стандартинформ.
- Иванов А. В., Полянский Ю. И., Стрелков А. А. 1981. *Большой практикум по зоологии беспозвоночных. Простейшие, губки, кишечнополостные, гребневика, плоские черви, немертины, круглые черви.* Учеб. пособие для биолог. спец. ун-тов. Москва, Высш. школа.
- Янковский А. В. 2007. Тип Ciliophora Doflein, 1901 Инфузории. Систематический обзор. *Протисты. Ч. 2 (Руководство по зоологии).* С.-Петербург, Наука: 415–997.
- Beisson J., Bétermier M., Bré M. H. et al. 2010. Paramecium tetraurelia: the renaissance of an early unicellular model. *Cold Spring Harb Protoc.* doi: 10.1101/pdb.emo140.

Н. Ю. Григорьева, Л. В. Чистякова,
Т. Р. Жангиров, А. Перков, А. А. Лисс,
Д. Д. Снарская*

МЕТОДЫ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСПЕКТРОСКОПИИ ДЛЯ МОНИТОРИНГА ТОКСИЧЕСКОГО ЦВЕТЕНИЯ ВОДЫ

Массовое размножение цианобактерий, так называемое цветение, оказывает негативное воздействие на экосистемы, иногда приводя к практически полной их деградации [Huisman et al, 2005; Румянцев и др, 2017; Колмаков, 1999]. Ситуация осложняется тем, что многие виды цианобактерий способны синтезировать токсичные вещества, которые, попадая в воду, вызывают замор рыбы и отравления животных и человека при питье воды и купании. Токсины, выделяемые цианобактериями, имеют различную природу и механизм действия. Так, некоторые цианобактерии, относящиеся к родам *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Anabaena*, *Nostoc* продуцируют гепатотоксины, *Aphanizomenon* — нейротоксины [Колмаков, 1999]. Помимо острых отравлений, токсические метаболиты цианобактерий могут служить причиной различных заболеваний, в том числе онкологических. В современном мире токсическое цветение воды приобретает характер глобальной проблемы [Huisman et al, 2005; Румянцев и др, 2017]. Активно разрабатываются методики подавления размножения цианобактерий, причем предпочтение оказывается тем из них, которые, угнетая рост цианобактерий, не оказывают существенного влияния на другие компоненты экосистемы [Румянцев и др, 2017; Purcell et al, 2013; Doosti et al, 2012]. Для своевременного и адекватного применения подобных воздействий крайне важным представляется мониторинг видового состава и жизнеспособности отдельных видов цианобактерий (в первую очередь потенциально токсигенных) в водоеме. Традиционно для этой цели используют метод прямого микроскопирования проб, как непосредственно взятых из водоема, так и после их культивирования на минеральных средах [Колмаков, 1999]. К сожалению, подобная методика не дает возможности оценить жизнеспособность обнаруженных цианобактерий. Кроме того, на основании анализа морфологических признаков

* Ресурсный центр «Культивирование микроорганизмов», Научный парк СПбГУ, ЛЭТИ им. В. И. Ульянова (Ленина).

не всегда удается достоверно определить систематическую принадлежность этих организмов.

Методы спектроскопии давно и успешно используют для дифференциации крупных систематических групп микроводорослей [Johnsen et al, 1994]. Цианобактерии четко отличаются от остальных групп микроводорослей по интегральным спектрам поглощения и флюоресценции. Три основных типа фотопигментов определяют оптические свойства цианобактерий — хлорофилл *a*, фикобилипротеины и каротиноиды, причем в формировании спектров собственной флюоресценции участвуют только первые два из них. Однако возможность дифференциации отдельных родов (или штаммов) цианобактерий методами спектроскопии всегда ставилась под сомнение в связи с тем, что спектры цианобактериальных культур могут существенно отличаться в зависимости от условий культивирования. Мы, однако, показали, что применение различных статистических методов, в частности метода дискриминантного анализа, позволяет достоверно различать цианобактерии по спектрам собственной флюоресценции отдельных клеток даже на уровне разных штаммов одного рода [Чистякова и др., 2017]. При этом использование при обработке исходных данных кластерного анализа позволяет исключить некорректные измерения, обусловленные ошибками эксперимента. Ранее нами также была разработана методика определения жизнеспособности клеток цианобактерий по спектрам их флюоресценции [Румянцев и др., 2017]. Сочетание этих двух подходов может оказаться довольно эффективным при мониторинге состояния сообществ цианобактерий в водоемах. Мы полагаем, что методы спектроскопии могут быть с успехом использованы для выявления угрозы массового размножения потенциально токсигенных штаммов на самых ранних этапах, и предлагаем следующую базовую схему проведения подобного рода исследований.

1. Получение спектров флюоресценции клеток цианобактерий

Из исследуемого водоема стандартными методами отбирают пробы. Для приготовления препаратов с помощью КЛСМ (конфокальной лазерной сканирующей микроскопии) отбирают определенное количество материала из пробы (обычно 200 мкл) и равномерно распределяют между предметным и покровным стеклом. Общее количество препаратов, приготовленных из одной пробы, должно быть не менее 30.

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ). Для проведения спектроскопических исследований отдельных клеток цианобактерий используется конфокальный лазерный сканирующий микроскоп, например Leica

TCS-SP5, оснащенный тремя лазерами: диодный лазер (405 нм), аргоновый лазер (458, 476, 488, 496, 514 нм), гелий-неоновый лазер (543, 633 нм). Спектры флуоресценции снимаются с помощью стандартной операции ламбда-сканирования программного обеспечения Leica Confocal Software. Серия из пространственных распределений интенсивности флуоресценции с размером 512×512 пикселей снимается при полосе пропускания 6 нм и с шагом 6 нм. Картинки распределений интенсивности флуоресценции снимаются одновременно с обычными «светлопольными» изображениями клеток. В качестве объектива удобно использовать иммерсионный объектив с апертурой 1.3 (объектив HCX PL APO 63.0x1.30 GLYC 37°C UV) с глицериновой иммерсией (глицерин 80 % H₂O). Для лучшего спектрального и пространственного разрешения ламбда-сканирование проводится с малой частотой развертки 400 Гц в двунаправленном режиме (bidirectional scan mode). При первичной обработке спектров флуоресценции используется графическое усреднение по так называемой области интереса (ROI), охватывающей отдельную клетку.

Очевидно, что из-за узкой локализации лазерного луча и высокой мощности возбуждающего излучения достаточно высока вероятность повреждения живой клетки во время ламбда-сканирования. Поэтому изначально должен быть выбран определенный режим снятия спектров для каждой лазерной линии, наименее повреждающий клетку. Минимальная степень повреждения клетки фиксируется по отклонению спектра от исходной формы. При снятии серии из 8 спектров изменение формы первого спектра не должно превышать 10 %. Этим требованиям (при указанных выше приборных установках) удовлетворяет режим мощности аргонового лазера 29 % и 10 % на лазерных линиях 476, 488, 496, 514, 543 нм; 2 % на 633 нм; 30 % на 458 нм и 3 % на диодном лазере 405 нм и при цифровом увеличении 9 %.

Использование промежуточных линий возбуждения. В предлагаемой нами методике дифференциации видов цианобактерий по спектрам собственной флуоресценции отдельных клеток основным моментом является то, что спектры флуоресценции каждой клетки снимаются при нескольких длинах волн возбуждающего излучения (405, 458, 476, 488, 496, 514, 543, 633 нм), большинство из которых не соответствуют максимумам поглощения отдельных пигментов, например фикобилинов или хлорофилла *a*. Спектры флуоресценции, соответствующие возбуждающим линиям, близким к максимумам поглощения отдельных пигментов (458 нм и 543 нм), имеют простую форму — один максимум либо на 682 нм для хлорофилла, либо на 656 нм для фикоцианина, или дополнительно еще на 580 нм для видов, обладающих фикоэритрином. Спектры при возбуждении на 633 нм имеют практически одинаковый вид для всех цианобактерий, поскольку это длина волны возбуждения фикоцианина. Однако все компоненты антенного комплекса (фикобилисомы) начинают работать только тогда, когда возбуждающий свет может в равных (воз-

можно очень малых) долях поглощаться всеми пигментами, тогда и на спектре флуоресценции появляются перегибы и максимумы, соответствующие излучению всех пигментов (рис. 1).

Чем более ярко выражен максимум или перегиб, тем менее эффективно идет передача энергии на этой ступени антенного комплекса. Таким образом, чтобы наиболее полно охарактеризовать строение и эффективность передачи энергии в светособирающем комплексе фотосинтетической системы, следует выбирать промежуточные длины волн для возбуждения, например 488, 496, 405 нм. Благодаря этим вариациям в строении антенного комплекса цианобактерий мы имеем возможность уверенно дифференцировать различные виды и штаммы цианобактерий.

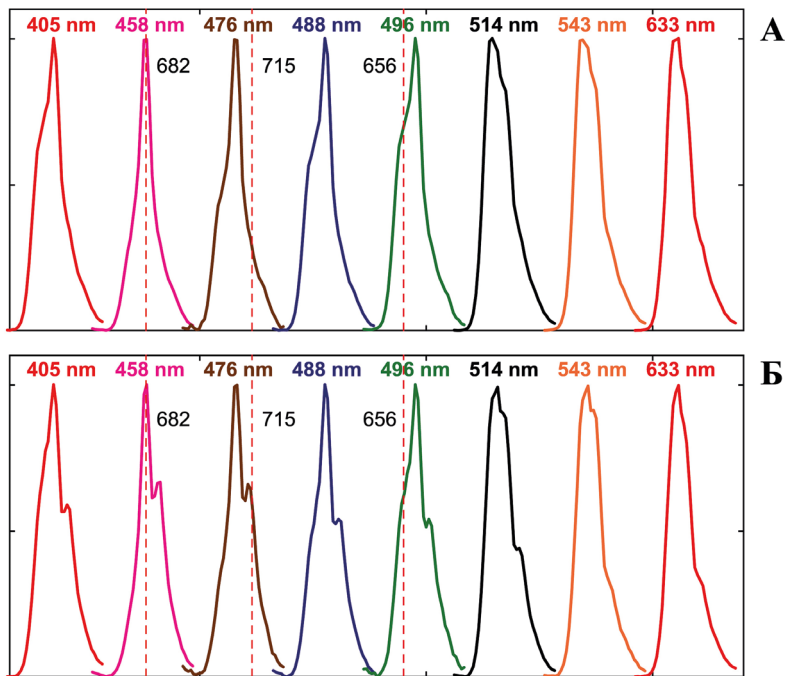


Рис. 1. Спектры собственной флуоресценции клеток: А — *Geitlerinema sp. CALU 1718* и Б — *Leptolyngbya sp. CALU 1715* при возбуждении разными длинами волн лазерного излучения.

Цифры над графиками указывают длины волн возбуждающего лазерного излучения. Пунктирные линии указывают ориентировочное положение максимумов излучения трех основных пигмент-белковых комплексов. 656 нм — длина волны флуоресценции фикоцианина, 682 и 715 нм — длины волн флуоресценции хлорофилл-белковых комплексов ФСII и ФСI соответственно. Каждый спектр сдвинут по горизонтальной оси на 90 нм относительно предыдущего для удобства сравнения серий между собой

2. Обработка полученных данных с целью исключения некорректных измерений

Отбор жизнеспособных клеток. Отбор спектров флуоресценции клеток в хорошем физиологическом состоянии для последующего анализа производится на основе ранее разработанной нами методики, описанной в [Румянцев и др., 2017]. Она основана на том, что при прочих равных условиях изменения в спектре флуоресценции живых клеток напрямую связаны с нарушениями в функционировании других клеточных структур, которые, в свою очередь, вызывают нарушения в работе фотосинтетической цепи. Это было показано еще в 60-х годах в работах С. В. Горюновой [Сиренко и др., 1975]. Причем спектры клеток в плохом физиологическом состоянии сильно отличаются от спектров здоровых клеток как формой, так и амплитудой. Для примера на рисунке 2 приведены нормированные спектры флуоресценции клеток *Synechocystis CALU 1336*, находящихся в различных физиологических состояниях (жирные линии — здоровая клетка, тонкие линии — клетка в угнетенном физиологическом состоянии [Румянцев и др., 2017]). Таким образом, из рассмотрения могут быть исключены поврежденные и старые клетки, спектры флуоресценции которых уже не отражают их видовой принадлежности.

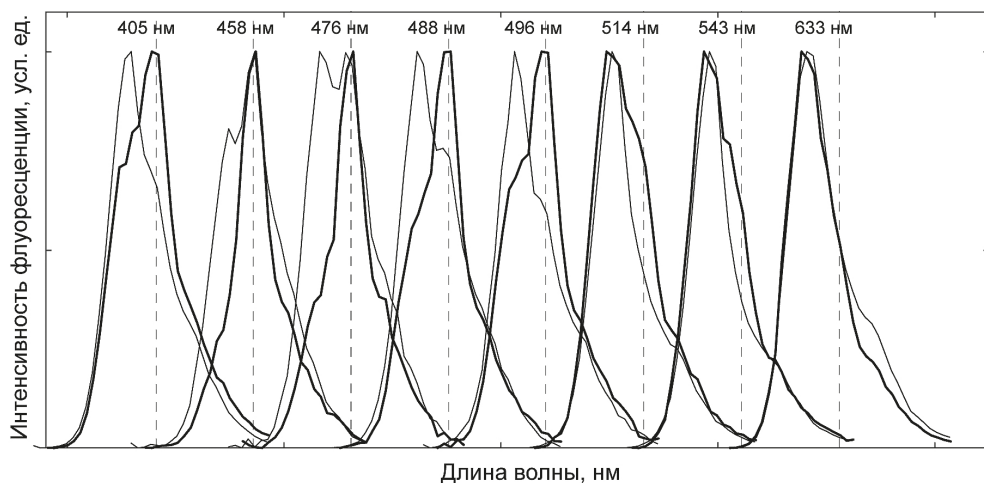


Рис. 2. Спектры собственной флуоресценции клеток цианобактерий *Synechocystis CALU 1336*, находящихся в разных физиологических состояниях.

Жирные линии — здоровая клетка, тонкие линии — клетка в угнетенном физиологическом состоянии. Каждая пара спектров сдвинута по горизонтальной оси на 90 нм относительно соседней для удобства сравнения. Цифры над кривыми указывают длину волны возбуждающего лазера. Штриховые линии отмечают положение максимума флуоресценции хлорофилл-белковых комплексов (682 нм)

Для дополнительной селекции данных была применена так называемая кластеризация методом двухходового объединения, которую следует проводить для каждого вида отдельно [StatSoft, Inc, 2012]. Она показывает разброс параметров внутри выборки для каждого измерения, в результате некорректные измерения исключаются из дальнейшего анализа

3. Дискриминантный анализ имеющихся спектров, дифференциация обнаруженных штаммов, определение их систематической принадлежности

Использование для анализа различных наборов параметров, и варьируя их в зависимости от поставленной задачи, можно изменять точность дифференцирования цианобактерий от рода до штамма.

Продемонстрируем на конкретном примере работу нашей методики [Чистякова и др., 2017]. Из коллекции CALU были взяты произвольно 3 штамма нитчатых цианобактерий, принадлежащих к родам *Geitlerinema* и *Leptolyngbya*. Штаммы 1715 и 1713 очень близкие, но все же имеющие небольшие отличия. В течение 3 месяцев для каждого штамма было выбрано по 5 экспериментальных дней, в каждый из которых было снято около 20 серий спектров по 8 спектров в каждой серии. Всего было снято около 2000 спектров, из них отобрано порядка 650 удачных спектров, подходящих для статистического анализа. Для статистического анализа выделено 3 выборки (для 3 штаммов) по 20–30 наборов параметров в каждой. Общая выборка — 82 измерения. Анализ проводился по 46 параметрам. Дискриминантный анализ проводился с минимальной толерантностью 0.01.

Вначале (А) были использованы только отношения интенсивностей пиков, соответствующих различным пигментам — при этом штаммы одного вида показали довольно сильно перекрывающиеся выборки (здесь эллипсы — это доверительный диапазон 95%). Затем (Б) были использованы параметры асимметрии и эксцесса исходных спектров — перекрытие близких штаммов еще больше, но штамм другого вида по-прежнему хорошо выделяется. При применении одновременно обеих групп параметров (В) результат получился вполне удовлетворительный. Матрица классификации в этом случае показала процент ошибки в определении отдельных штаммов 95.5%. В данном случае перемешивание близких штаммов 1713 и 1715 одного вида *Leptolyngbya* показывает, что эти штаммы родственно близки, но все же имеют достаточно отличий, чтобы провести их разделение.

Следует отметить, что мы намеренно не увеличивали толерантность, что увеличило бы процент разделения, так как более сильное разделение штаммов не позволило бы нам определить общность вида.

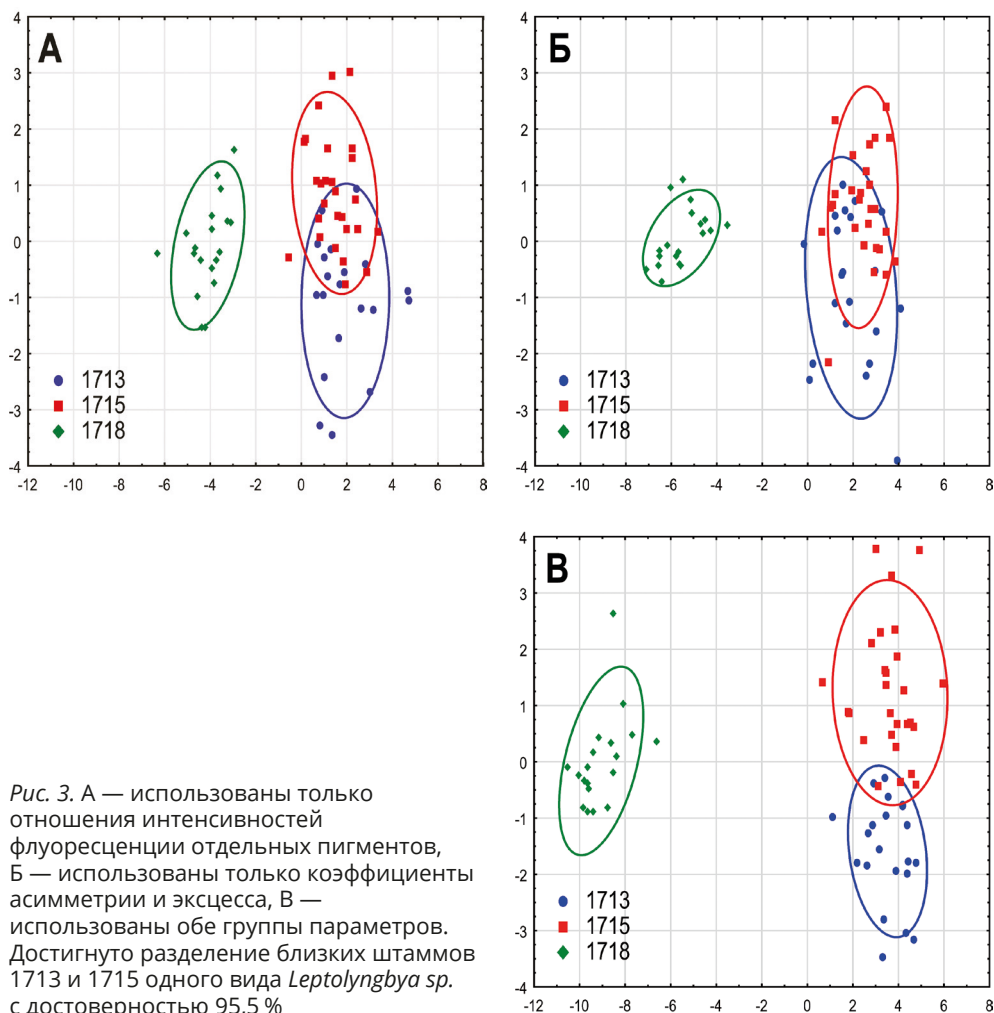


Рис. 3. А — использованы только отношения интенсивностей флуоресценции отдельных пигментов, Б — использованы только коэффициенты асимметрии и эксцесса, В — использованы обе группы параметров. Достигнуто разделение близких штаммов 1713 и 1715 одного вида *Leptolyngbya sp.* с достоверностью 95,5 %

Таким образом, следуя предложенной схеме, мы имеем возможность выявить в пробе активно размножающиеся штаммы потенциально токсигенных цианобактерий. Фактически мы предлагаем создание автоматизированной системы по выявлению токсического цветения воды на самых ранних этапах. В будущем предполагается разработать программное обеспечение, которое позволит пользователю проводить анализ спектров собственной флуоресценции автоматически. В число первостепенных задач на настоящем этапе входит создание референтной библиотеки спектров собственной флуоресценции цианобактерий. Широкие возможности для этого предоставляет коллекция цианобактерий и одноклеточных водорослей CALU, депонированная на базе ресурсного центра «Культивирование микроорганизмов» НП СПбГУ; на на-

стоящий момент нами уже получены спектры собственной флуоресценции для 47 коллекционных штаммов.

Литература

- Колмаков В. И. 1999. Токсичное «цветение» воды континентальных водоемов: глобальная опасность и методы ликвидации. <http://biokomfort74.ru>
- Румянцев В. А., Григорьева Н. Ю., Чистякова Л. В. 2017. Исследование изменений физиологического состояния цианобактерий после слабого ультразвукового воздействия. *Доклады Академии наук* 475: 580–583.
- Румянцев В. А., Поздняков Ш. Р., Рыбакин В. Н., Григорьева Н. Ю., Рудский И. В., Киселев Е. Ю., Коровин А. Н. 2017. Многопрофильные натурные и лабораторные эксперименты по оценке работоспособности и экологической безопасности ультразвука при регуляции цветения цианобактерий. *Ученые записки РГГМУ* 46: 118–133.
- Сиренко Л. А., Сакевич А. И., Осипов Л. Ф. 1975. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. Киев, Наук. думка.
- Чистякова Л. В., Жангиров Т. Р., Лисс А. А., Григорьева Н. Ю. 2017. Флуоресцентная микроспектроскопия для исследования биологического разнообразия цианобактерий в пресноводных экосистемах. *III Международная конференция «Биоиндикация в мониторинге пресноводных экосистем»*, 16–20 октября 2017, Санкт-Петербург.
- Doosti M. R., Kargar R., Sayadi M. H. 2012. Water treatment using ultrasonic assistance: A review. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences* 2: 96–110.
- Huisman J., Matthijs H. C. P., Visser P. M. 2005. Harmful cyanobacteria. *Springer*, Netherlands.
- Johnsen G., Samset O., Ranskog L., Sakshaugl E. 1994. In-vivo absorption characteristics in 10 classes of bloom-forming phytoplankton-taxonomic characteristics and responses to photoadaptation by means of discriminant and HPLC analysis. *Marine Ecology Progress Series* 105: 149–157.
- Purcell D., Parsons S. A., Jefferson B. 2013. Experiences of algal bloom control using green solutions barley straw and ultrasound, an industry perspective. *Water and Environment Journal* 27: 148–156.
- StatSoft Inc. 2012. Электронный учебник по статистике. <http://statsoft.ru/home/textbook/>

*А. Ф. Сайфитдинова**,

*С. А. Галкина** , Е. Р. Гагинская****

МЕТОДИКА ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ ХРОМОСОМ — ЛАМПОВЫХ ЩЕТОК ИЗ ООЦИТОВ ПТИЦ И РЕПТИЛИЙ

1. Введение

Хромосомы типа ламповых щеток — это хромосомы особой формы, которую они приобретают в ядрах растущих ооцитов многих животных, в том числе у птиц и рептилий, в связи с очень интенсивной транскрипцией многих последовательностей. Свое название эти хромосомы получили благодаря необычайно крупным размерам и чисто внешнему сходству с ершиками для мытья стекол керосиновых ламп. Сходство это обусловлено высокой степенью деспирализации хроматина и присутствием вдоль хромосомной оси многочисленных хроматиновых петель, на которых и происходит транскрипция. Высокая степень деконденсации наряду с сохранением осевой структуры хромосом делает ламповые щетки уникальным модельным объектом для высокоразрешающего картирования и верификации данных геномной сборки. Первые попытки микрохирургического выделения ламповых щеток из ядер ооцитов птиц на основе метода, который был разработан для амфибий [Gall, 1954; Callan, Lloyd, 1960; Макгрегор, Варли, 1986], относятся к 60-м годам XX века [Koescke, Muller, 1965; Ahmad, 1970]. Однако мировой приоритет в разработке и внедрении методики приготовления препаратов хромосом ламповых щеток из ядер растущих ооцитов птиц и рептилий принадлежит коллективу лаборатории структуры и функции хромосом и Центру коллективного пользования оборудованием «Хромас» Санкт-Петербургского государственного университета [Macgregor, 2012]. Систематические исследования ламповых щеток, изолированных из ядер ооцитов птиц, начались после выхода работ Е. В. Кропотовой и Е. Р. Гагинской (1984), а также Н. Хатчисон [Hutchison, 1987], объединивших методы микрохирургического выделения хромосом и получения по-

* Ресурсный центр «Центр коллективного пользования оборудованием “Хромас”», Научный парк СПбГУ.

** Кафедра генетики и биотехнологии СПбГУ.

*** Кафедра цитологии и гистологии СПбГУ.

стоянных препаратов для светооптического и электронно-микроскопического анализа. Существенный вклад в развитие метода внесла И. В. Соловей [Solovei et al., 1993]. В настоящее время основной протокол претерпел некоторые изменения и позволяет стабильно получать препараты хромосом ламповых щеток высокого качества, пригодных для последующего анализа с использованием методов иммуноцитохимии и флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH).

2. Оборудование и инструменты

- *Стереомикроскоп* с нижним освещением переменной яркости, суммарным увеличением от 10х до 100х и длиной фокусного расстояния не менее 60 мм.
- *Цитологическая центрифуга* с охлаждением, ускорением не менее 3500g, с бакетным ротором и корзинками с крышками, позволяющими разместить горизонтально предметные стекла размером 76×24 мм.
- *Источник постоянного тока (6V)* с клеммами.
- *Глазные ножницы* из хирургической стали.
- *Пинцет* для гистологических работ длиной 115 мм.
- *Дозаторы переменной объема до 20 мкл и до 200 мкл* с наконечниками из полипропилена, наконечники предварительно стерилизуют автоклавированием.
- *Дозатор переменной объема до 10 мкл* с наконечниками из оптически прозрачного низкоадгезивного пропилен или пипетка-стриппер со сменными стеклянными наконечниками диаметром 150–200 мкм с закругленными краями.
- *Стеклянные микропипетки*, которые можно изготовить из стерильных стеклянных пипеток Пастера путем вытягивания кончика, разогретого в пламени горелки. В зависимости от силы и скорости растягивания получают заготовки разной длины и толщины. С помощью предварительно прокаленного пинцета полученные заготовки обламывают строго перпендикулярно на том уровне, где диаметр стеклянной трубки немного превышает требуемый, затем острый край оплавливают, кратковременно внося кончик пипетки в пламя горелки. На широкий конец пипетки надевают небольшую резиновую грушу.
- *Вольфрамовые иглы* для изоляции ядер ооцитов и удаления ядерной оболочки, которые изготавливают из вольфрамовой проволоки методом электролитической заточки. Для этого проволоку диаметром от 120 до 500 мкм режут на заготовки длиной 5–7 см. К источнику постоянного тока (6V) подключают платиновый катод и опускают его в стек-

лянный стакан со свежеприготовленным 10% раствором КОН. Вольфрамовые заготовки соединяют с положительным полюсом источника тока электрическим зажимом и опускают в стакан с электролитом. Для придания инструменту необходимой конфигурации заготовку необходимо постепенно опускать в раствор, чтобы равномерно сократить диаметр. При необходимости, инструментам можно придать любую требуемую форму (чаще всего используют прямые, слегка изогнутые и Г-образные вольфрамовые иглы). Концы игл дополнительно затачивают кратковременным касанием поверхности раствора электролита во время работы. Процесс заточки контролируют под стереомикроскопом. В качестве рукояток для таких игл используют цанговые держатели. Для стерилизации вольфрамовый инструмент прокалывают в пламени горелки.

- *Стеклянные оптически прозрачные солонки* с лункой емкостью 1–2 мл. Солонки перед использованием моют мыльным раствором и ополаскивают дистиллированной водой.
- *Предметные стекла* 76×24 мм, толщиной до 1,2 мм. Стекла предварительно моют в растворе детергента 7х, тщательно отмывают дистиллированной водой и высушивают в термостате при температуре +60 °С.
- *Камеры из боросиликатного стекла* размером 22×22 мм, толщиной 1,2 мм с отверстиями диаметром 4 мм (от 1 до 4 отверстий). Камеры предварительно замачивают в 70% растворе этилового спирта и протирают насухо перед использованием. Стеклянные камеры наклеивают на предметные стекла строго посередине резиновым клеем марки А (на основе натурального каучука и петролейного эфира) и дают просохнуть не менее 16 часов при комнатной температуре. Готовые камеры могут храниться некоторое время при +4 °С. Оценка качества клеевого слоя производится непосредственно перед использованием. Клей удаляют из лунок механически и лунки заполняют гипотонической средой для выделения хромосом.
- *Стеклянные чашки Петри* для защиты камер от высыхания во время распластывания хромосом при +4 °С. На дно чашки кладут сухую фильтровальную бумагу для защиты от конденсата.
- *Стеклянный бюкс* с притертой крышкой для хранения яичника и предотвращения его высыхания в процессе работы, на дно кладут фильтровальную бумагу, смоченную буферным раствором.
- *Хладагент* на основе солевого раствора в пластиковой упаковке размером не менее 15×15 см. Предварительно хладагент замораживают при –20 °С. Во время работы для защиты от примерзания препарата на поверхность хладагента кладут бумажную салфетку.

- *Стеклянные стаканы* объемом 50 мл и высотой 75 мм, одноразовая пластиковая посуда для хранения растворов и фиксации готовых препаратов.

3. Растворы

- *Среда для выделения ядер «5:1»*: 83 mM KCl, 17 mM NaCl, 6,5 mM Na₂HPO₄, 3,5 mM NaH₂PO₄ (KH₂PO₄), pH 7,0.
- *Гипотоническая среда для выделения хромосом «1/4»*: готовится на основе среды «5:1», разведенной в 4 раза, дополнительно содержит 0,25 mM MgCl₂, 0,1 % формальдегид.
- *Фиксатор*: готовится на основе среды «1/4», с добавлением 2 % формальдегида, а также 0,25 mM CaCl₂, 0,25 mM MgCl₂ если планируются иммуноцитохимическая окраска.
- Свежеприготовленные *растворы спиртов для дегидратации* препаратов: 50 %, 70 % и 96 %

4. Протокол

Все манипуляции по выделению хромосом — ламповых щеток проводят избегая нагревания растворов и препаратов, свободные солонки и камеры должны постоянно находиться на охлаждаемом хладагентом месте. Бюкс со свежепрепарированным яичником и готовые препараты во время распластывания хромосом должны находиться в холодильнике при +4 °С. Все ооциты в яичнике окружены фолликулярным эпителием и находятся в кортикальном слое яичника, наиболее крупные выступают над его поверхностью. Такие ооциты диаметром 0,3–1,5 мм вырезают из яичника ножницами и помещают в солонку с охлажденной средой «5:1». Место расположения ядра в ооците определяют под стереомикроскопом по светлой области внутри ооцита. Затем ооцит располагают так, чтобы не повредить ядро при вскрытии фолликула.

С помощью двух острых вольфрамовых игл разрывают фолликулярную оболочку и плазматическую мембрану ооцита и освобождают ядро от ооплазмы. Неповрежденное ядро полностью прозрачно, но хорошо видно благодаря опалесцирующей ядерной оболочке, имеет правильную сферическую форму. Ядро переносят пипеткой в другую солонку с гипотонической средой «1/4», дополнительно очищая его от остатков ооплазмы путем втягивания в кончик пипетки и выпускания обратно в солонку. Затем с помощью той же пипетки переносят ядро в камеру, заполненную средой «1/4». Тонкими вольфрамовыми иглами удаляют ядерную оболочку и оставляют хромосомы рас-

пластываться по дну камеры под действием гипотонического раствора и силы притяжения.

Камеры с изолированным содержимым ядер выдерживают в чашках Петри при +4°C в течение 30 минут, затем центрифугируют 30 минут при 3500 g в охлажденной до +4°C цитологической центрифуге. После этого камеры целиком погружают в фиксатор и оставляют фиксироваться при комнатной температуре в течение 30 минут. Затем препараты дегидратируют в 50 % и 70 % этаноле, по 5 минут в каждом, и оставляют на ночь в новой смене 70 % этанола. На следующий день, после маркировки положения отверстий камер алмазным карандашом на нижней стороне предметного стекла, камеры удаляют с помощью лезвия бритвы, а препараты хромосом на предметных стеклах помещают в 96 % этанол на 5 минут и высушивают. Препараты можно хранить высушенными при комнатной температуре и использовать в течение нескольких месяцев. При приготовлении препаратов хромосом типа ламповых щеток для последующих иммуноцитохимических исследований в среду «1/4» и в фиксатор добавляют соли двухвалентных металлов (0,25 mM CaCl₂, 0,25 mM MgCl₂), обеспечивающие сохранение рибонуклеопротеиновых комплексов хроматина. В этом случае препараты хранят, не высушивая, в 70 % этаноле при +4°C и используют в течение недели.

4. Заключение

Хромосомы типа ламповых щеток из растущих ооцитов служат моделью для анализа структуры и функции хромосом, регуляции процессов транскрипции, а также исследования механизмов компартментализации эукариотического ядра. Они могут быть использованы как уникальный инструмент, позволяющий проводить физическое картирование нуклеотидных последовательностей на хромосомах с высочайшим разрешением, применяя методы молекулярной цитогенетики. Разработанная методика была использована для высокоточного картирования последовательностей на конденсированной и трудной для разрешения на стадии метафазы половой W-хромосоме курицы [Bellott et al., 2017], а также позволила идентифицировать микрохромосомы курицы путем картирования последовательностей ВАС-клонов [Galkina et al., 2017].

Благодарности

Авторы благодарны Антону Владимировичу Радаеву и Михаилу Романовичу Кулешину за техническое обеспечение реализации проекта. Все работы выполнены на оборудовании ресурсного центра «Центр коллективного пользования оборудованием “Хромас”» Научного парка СПбГУ.

Литература

- Кропотова Е. В., Гагинская Е. Р. 1984. Хромосомы типа ламповых щеток из ооцитов японского перепела. Данные световой и электронной микроскопии. *Цитология* 26: 1008–1015.
- Макгрегор Г., Варли Дж. 1986. *Методы работы с хромосомами животных*. Москва, Мир.
- Ahmad M. S. 1970. Development, structure and composition of lampbrush chromosomes in domestic fowl. *Canad. J. Genet. Cytol.* 12: 728–737. <https://doi.org/10.1139/g70-095>
- Bellott D. W., Skaletsky H., Cho T. J., Brown L., Locke D., Chen N., Galkina S., Pyntikova T., Koutseva N., Graves T., Kremitzki C., Warren W. C., Clark A. G., Gaginskaya E., Wilson R. K., Page D. C. 2017. Avian W and mammalian Y chromosomes convergently retained dosage-sensitive regulators. *Nature Genet.* 49(3): 387–394. <https://doi.org/10.1038/ng.3778>
- Callan H. G., Lloyd L. 1960. Lampbrush chromosomes of crested newts *Triturus cristatus* (Laurenti). *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond., Ser. B* 243: 135–219. <https://doi.org/10.1098/rstb.1960.0007>
- Galkina S., Fillon V., Saifitdinova A., Daks A., Kulak M., Dyomin A., Koshel E., Gaginskaya E. R. 2017. Chicken Microchromosomes in the Lampbrush Phase: A Cytogenetic Description. *Cytogenet Genome Res.* 152(1): 46–54. <https://doi.org/10.1159/000475563>
- Gall J. G. 1954. Lampbrush chromosomes from oocyte nuclei of the newt. *J. Morphol* 94: 283–352. <https://doi.org/10.1002/jmor.1050940203>
- Hutchison N. 1987. Lampbrush chromosomes of the chicken, *Gallus domesticus*. *J. Cell. Biol.* 105: 1493–1500. <https://doi.org/10.1083/jcb.105.4.1493>
- Koecke H. U., Muller M. 1965. Formwechsel und Anzahl der Chromosomen bei Huhn und Ente. *Naturwissenschaften* 52: 483. <https://doi.org/10.1007/BF00626256>
- Macgregor H. C. 2012. Chromomeres revisited. *Chromosome Research* 20: 911–924. <https://doi.org/10.1007/s10577-012-9310-3>
- Solovei I., Gaginskaya E., Hutchinson N., Macgregor H. 1993. Avian sex chromosomes in the lampbrush form: the ZW lampbrush bivalent from six species of bird. *Chromosome Res.* 1: 153–166. <https://doi.org/10.1007/BF00710769>

А. А. Лобов, М. А. Иванов, А. С. Коростелева,
О. А. Мураева, Д. Д. Смирнов*

УСОВЕРШЕНСТВОВАННЫЙ МЕТОД ПЕРЕРАБОТКИ ГЛИКОЛЬСОДЕРЖАЩИХ ТЕПЛОНОСИТЕЛЕЙ

1. Введение

Гликоль-содержащие теплоносители активно применяются в большинстве промышленных инженерных систем, служащих для распределения тепла [Беликов, 2014]. На 2005 год в России было произведено 368 тонн моноэтиленгликоля [Ким, Апашина, 2006]. В среднем около 70–85 % потребляемого в России МЭГ приходится на сектор антифриза, охлаждающих и тормозных жидкостей [Ким, Апашина, 2006]. При этом количество теплоносителя, использующегося в одной системе, может достигать до нескольких тонн. Состав наиболее распространенных гликольсодержащих теплоносителей [Szymonik, 2010], [Schmidt, 2002]:

- 1) дистиллированная или деионизованная вода (40–60 %);
- 2) этилен-/пропиленгликоль (60–40 %);
- 3) различные добавки (не более 5 %).

Ингибиторы коррозии:

- неорганические: нитриты, нитраты, бораты, силикаты, молибдаты, фосфаты;
- органические: соли карбоновых кислот, антиоксиданты, рН-буфер (рН 9–11), антивспенивающие агенты, красители.

Несмотря на наличие большого числа добавок, во время эксплуатации гликоль-содержащего теплоносителя происходит частичное окисление компонентов жидкости (в первую очередь гликолей) кислородом воздуха: чем больше температура жидкости, тем интенсивнее окисление. Продуктами окис-

* Ресурсный центр «Развитие молекулярных и клеточных технологий», Научный парк СПбГУ.

ления гликолей являются различные органические кислоты. В этих же условиях образуются полимеры и аморфный углерод — часть твердой фазы отработавшей жидкости и целый ряд других соединений.

Кроме того, происходит коррозия внутренних поверхностей трубопроводов и емкостей (особенно при длительной эксплуатации, когда в смеси появляются продукты окисления гликолей), приводящая к загрязнению теплоносителя металлами в виде частиц металла, ионов и оксидов, в частности ионами тяжелых металлов — свинцом и кадмием [Schmidt, 2002].

Все эти факторы приводят к изменениям физико-химических свойств теплоносителей [Schmidt, 2002]:

- 1) повышение температуры замерзания;
- 2) снижение удельной теплоемкости;
- 3) повышение вязкости;
- 4) повышение коррозионной активности;
- 5) появление твердых осадков.

Существенное ухудшение рабочих характеристик делает необходимым регулярную замену гликольсодержащих теплоносителей, что, в свою очередь, приводит к накоплению большого объема гликольсодержащих отходов.

В настоящее время для утилизации используются методы сжигания, что наносит урон экосистеме из-за продуктов неполного окисления гликолей и тяжелых металлов [Jehle et al., 1995]. В худшем случае теплоносители могут незаконно сливаться в окружающую среду. Несмотря на то что гликоли потенциально биоразлагаемы [WEBA Technology Corp., 2003], часто используемый в теплоносителях этиленгликоль ядовит [Leth, Gregersen, 2005]. Не менее опасны и тяжелые металлы, появляющиеся в процессе эксплуатации. Поэтому во многих странах слив отработанных антифризов запрещен.

Очевидно, что нужно искать другие подходы для работы с отслужившими свой срок теплоносителями. И переработка теплоносителей является очень перспективным и экономически выгодным решением этой проблемы.

Ранее проблема переработки гликольсодержащих отходов рассматривалась европейскими и американскими компаниями, специализирующимися на переработке отходов. Поэтому информация по данной теме включает ряд патентов [Marburger, Okey, 2013; Haddock, 2001; Woyciesjes et al., 2000] и кратких обзорных статей [Hilal et al., 2003; Schmidt, 2002; Jehle et al., 1995; Metcalf and Eddy, 1991]. В большинстве случаев реутилизация гликолей состоит из трех этапов: предочистка, собственно очистка (то есть получение чистого гликоля или смеси гликоль—вода значительной степени чистоты), за которой следует дополнительная постобработка, представляющая собой контроль качества готового продукта и добавление всех необходимых для его дальнейшей эксплуатации компонентов [Schmidt, 2002].

Предочистка направлена на удаление крупных частиц-загрязнителей, например продуктов полимеризации гликолей и коррозии, а также эмульгированных органических веществ и неполярных растворителей. Этот этап необходим для повышения эффективности последующего этапа очистки.

Первым этапом предочистки может быть отстаивание отходов в конечном сосуде с последующим отделением масляной фазы [Marburger, Okey, 2013].

Удаление крупных частиц-загрязнителей. В ряде случаев для этой задачи используется последовательное фильтрование гликольсодержащих отходов через фильтры с последовательно уменьшающимся диаметром пор (100–115 мкм, 20–50 мкм и 1–10 мкм) [KFM Coolant Purification System, 2003; Haddock, 2001]. Этот метод позволяет получить продукт высокой степени очистки, однако он имеет ряд недостатков: значительные затраты на материал тонких фильтров, низкая скорость ультрафильтрации и необходимость постоянной замены фильтров.

Один из вариантов решения этой проблемы — предварительная обработка магнитами для удаления ферромагнетиков, прокачка жидкости через матерчатый фильтр и активированный уголь и лишь затем фильтрация через фильтры с диаметром пор 10 и 5 мкм [Marburger, Okey, 2013].

Альтернативным способом удаления крупных частиц может быть их осаждение путем добавления коагулянтов [Woyciesjes et al., 2000]. Из-за того что этот процесс зависит от pH, предварительно необходимо довести его до значения pH 4.5–7 [Woyciesjes et al., 2000].

Как правило, на этом завершается предобработка, и только в одном из рассмотренных патентов проводится дополнительное *удаление эмульгированных масел*. Для этого используют флотацию с газовым барботажем (опционально применение гидроциклонового сепаратора) [Haddock, 2001].

На выходе мы получаем раствор, содержащий гликоли с примесями продуктов их окисления, ионов тяжелых металлов, ингибиторов коррозии и других добавок. Принципиально дальнейшая *очистка* гликолей может проводиться двумя путями — получение смеси гликоль—вода или получение чистого гликоля.

Получение смеси гликоль—вода. При недостаточно эффективной предобработке на этом этапе также может использоваться последовательная очистка через фильтры с различным диаметром пор 0.2–100 мкм с последующей фильтрацией через активированный уголь [Woyciesjes et al., 2000].

Удаление ионов может проводиться либо путем обратного осмоса [Haddock, 2001] либо на ионообменных смолах [KFM Coolant Purification System, 2003; Woyciesjes et al., 2000]. Наиболее эффективным считается метод, запатентованный EET Corporation, — высокоэффективный электродиализ [Schmidt, 2002]. Использование этого метода позволяет эффективно удалять ионы из предобработанных теплоносителей [Schmidt, 2002].

Зачастую полученный раствор повторно фильтруется через угольные фильтры [KFM Coolant Purification System, 2003].

Получение чистого раствора гликолей и воды. Для этого проводится вакуумная дистилляция со стальными роторными дисками с дальнейшей прокачкой гликолевой фазы через фильтры с диаметром пор 2–4 мкм (для отделения воды) [Marburger, Okey, 2013].

После очистки производится контроль проводимости (проводимость менее 50 мкС/см считается достаточным условием полной очистки) [KFM Coolant Purification System, 2003] и общий контроль качества полученной смеси (таблица). Недостатком методов очистки, направленных на получение смеси гликоль—вода, является то, что мы не знаем точной концентрации гликоля в итоговой смеси. Поэтому на этом этапе очень важно определить точную концентрацию компонентов полученной смеси.

Таблица. Допустимые значения физико-химических свойств переработанного 50 % антифриза на основе этиленгликоля

Точка замерзания (Фаренгейт)	-34
pH	7,5–11
Зольность (% массы)	2
Гликоляты (ppm)	900
Формиаты (ppm)	300
Хлориды (ppm)	25
Железо (ppm)	10
Свинец (ppm)	5
Медь (ppm)	5
Алюминий (ppm)	5
Визуальные характеристики	Гомогенный р-р, без примесей

Составлено по: US Patent Application Publication (US 2013/0206580 A1) — Continuous coolant purification process and device, 2013.

В случае с разделением гликоля и воды в дальнейшем происходит соединение водной фазы (со значительной концентрацией ионов металлов) с гликолевой фазой (чистым гликолем) в любых концентрациях [Marburger and Okey, 2013].

Затем в полученную смесь добавляются гликоли или воду (при необходимости), pH-буферы, ингибиторы коррозии, антиоксиданты, красители и другие добавки [Woyciesjes et al., 2000]. В результате мы получаем готовые к использованию гликольсодержащие теплоносители.

Общим недостатком всех существующих методов является недостаточно подробное описание дальнейшего обращения с опасными отходами, особенно с тяжелыми металлами, которые образуются как побочный продукт переработки. Сами методы переработки достаточно эффективны, однако зачастую используются фильтры, требующие постоянной замены и другие дорогостоящие элементы, например мембраны для обратного осмоса, повышающие стоимость процесса переработки.

2. Предлагаемый метод

Основные задачи, поставленные при разработке данного метода, связаны с уменьшением образующихся отходов переработки и с экономической рентабельностью.

2.1. Предобработка

Дорогостоящие и сложные в эксплуатации фильтры мы предлагаем заменить седиментацией коагулированных коллоидных частиц [Hilal et al., 2003] в гидроциклоне [Haddock, 2001]. В качестве коагулянта можно использовать 0.015М раствор $Al_2(SO_4)_3$ [Tzoupanos, Zouboulis, 2008; Hilal et al., 2003]. Наиболее эффективно этот процесс будет проходить при pH 8.5 [Hilal et al., 2003]. Доведение pH до этого значения будет проводиться путем добавления раствора NaOH [Hilal et al., 2003]. Таким образом мы выделяем твердые частицы с радиусом от 0.1–0.01 мкм [Tzoupanos, Zouboulis, 2008]. Слой шлама в нижней части сосуда и образующийся слой масел в верхнем слое жидкости удаляются. Остальная часть жидкость представляет собой частично очищенные гликольсодержащие отходы.

Для их переработки мы предлагаем использовать метод воздушной флотации [Haddock, 2001]. Принцип работы этого метода заключается в продувании мелких пузырьков воздуха через раствор. Пузыри воздуха выталкивают капли эмульгированных масел, углеводов и легкие коллоидные частицы в верхние слои жидкости [Haddock, 2001]. За счет этого мы удаляем значительную часть эмульгированных масел (до 97 %) [Marburger, Okey, 2013]. В качестве газа может быть использован обычный воздух.

После удаления верхнего слоя жидкости раствор гликолей предпочищен и мы можем перейти непосредственно к окончательной очистке. В результате предпочистки мы получаем твердые осадки и масла, объемы которых небольшие по сравнению с общим объемом отходов [Marburger, Okey, 2013].

Предлагаемая предобработка включает семь шагов.

Сначала отработанный теплоноситель загружается в гидроциклон (1), затем к нему добавляется необходимое количество раствора NaOH (в зависи-

мости от значения рН гликольсодержащих отходов) и коагулянт — $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ до 0.015М концентрации (2). После этого проводится седиментация в гидроциклоне (3). В дальнейшем шлам и масла собираются в отдельные емкости, а частично очищенный раствор гликоля загружается во флотационную емкость (4). Для воздушной флотации мы предлагаем использовать воду, аэрированную обычным воздухом (под высоким давлением). Поэтому предварительно необходимо провести ее аэрацию в отдельном сосуде (5). После этого мы проводим воздушную флотацию (6). В результате раствор разделяется на два слоя: слой масел и легких частиц-загрязнителей и слой предпочищенных гликолей. Верхний слой сливается в емкость с маслами, а предобработанный раствор гликоля используется на следующих этапах очистки.

Предобработка отходов коагулирующим агентом, седиментацией в гидроциклоне и воздушной флотацией избавляет от необходимости использовать большое количество фильтров с разным диаметром пор [Hilal et al., 2003; Haddock, 2001; Woyciesjes et al., 2000], то есть значительно снижает затраты на эксплуатацию установки. Кроме того, скорости потоков жидкости не ограничены тонкими порами очищающих фильтров.

В качестве отходов предобработки мы получаем отдельные концентрированные твердые осадки и масла [Haddock, 2001]. Масла не имеют определенного состава и не представляют ценности — такие масла возможно утилизировать сжиганием [Hilal et al., 2003] в атмосфере кислорода при высоких температурах без получения продуктов неполного сгорания, что не наносит вред окружающей среде [Wright, 2003]. Твердые осадки в основном состоят, как уже отмечалось ранее, из различных соединений металлов, которые могут быть растворены в кислотах. Растворы солей металлов имеют определенную ценность, так как из них могут быть извлечены металлы гидрометаллургическими методами [Marburger, Okey, 2013]. В результате мы можем эффективно переработать побочные продукты реутилизации.

2.2. Собственно очистка

Первый вариант очистки направлен на получение чистой смеси гликоль/вода.

Сначала предобработанные отходы прокачиваются через угольные фильтры, на развитой поверхности которых адсорбируется большая часть всех оставшихся масел, органических веществ с большой молекулярной массой, часть низкомолекулярных органических веществ, коллоидных частиц и ионов металлов [Marburger, Okey, 2013; Metcalf, Eddy, 1991] (1).

Теперь отходы практически не содержат примесей органических веществ, и мы можем приступить к удалению примесных ионов из отработанного теплоносителя с помощью ионообменных смол, не опасаясь их загрязнения [Dabrowski et al., 2013; Schmidt, 2002; Haddock, 2001; Wheaton, Lefevre,

2000]. Для этого раствор гликоля поочередно прокачивается через катионит (2) и анионит (3).

В результате мы получаем чистую смесь гликоль/вода (4). Концентрация гликоля может сильно варьироваться, но не превышает 50 % [Woyciesjes et al., 2000]. Для получения качественного продукта следует добавить необходимое количество концентрированного гликоля (с минимальным содержанием воды) для придания ему первозданных свойств [Woyciesjes et al., 2000]. Также необходимо добавление pH-буфера, ингибиторов коррозии и других добавок [Woyciesjes et al., 2000].

Данный способ переработки не требует больших затрат энергии [Marburger, Okey, 2013; Woyciesjes et al., 2000]. Примеси органических веществ отфильтровываются при помощи угольного фильтра. Ионообменные смолы обеспечивают удаление большей части примесных ионов [Dabrowski et al., 2013; Haddock, 2001]. Катиониты, загрязненные ионами тяжелых металлов, могут быть восстановлены обработкой растворами сильных минеральных кислот — мы можем выделить ионы тяжелых металлов в отдельный раствор [Wheaton, Lefevre, 2000], который также представляет некоторую ценность для металлургии [Marburger, Okey, 2013]. С отходами переработки легко обращаться [Hilal et al., 2003; Haddock, 2001].

Недостатки этого метода в том, что для получения готового продукта с заданной температурой заморзания необходимо отрегулировать концентрацию гликоля в переработанном продукте [Woyciesjes et al., 2000]. Кроме того, само качество продукта не является высоким: в переработанной жидкости остается небольшое количество сложно отделяемых загрязнителей: коллоидных частиц, примесных органических веществ и ионов металлов — поэтому после *нескольких* циклов использования и переработки качество переработанного продукта может не соответствовать нормам [Hilal et al., 2003; Haddock, 2001].

Альтернативный способ направлен на получение чистого гликоля и воды.

После предобработки проводится вакуумная дистилляция теплоносителя. Принцип метода основан на разнице в температуре кипения воды и гликолей, которая при атмосферном давлении составляет 100 °С для воды и 197.3 °С и 188.2 °С для этилен- и пропиленгликоля соответственно.

Классическая дистилляция может привести к частичному окислению и термическому разложению гликолей. Поэтому мы предлагаем использовать вакуумную дистилляцию. При пониженном давлении температуры кипения воды и гликоля падают [Marburger, Okey, 2013], и мы можем не опасаться большой скорости окисления или термического разложения гликоля. Кроме того, мы экономим значительное количество энергии [Marburger, Okey, 2013].

В результате мы получаем продукты дистилляции: чистую воду и чистый гликоль [Marburger, Okey, 2013], но также и побочный продукт — кубовой

остаток [Marburger, Okey, 2013]. Очевидно, он содержит те же примеси, что и теплоноситель после предобработки, но в большей концентрации.

Очистка кубового остатка проводится тем же способом, что и очистка смеси гликолей для получения раствора гликоль—вода. Это позволяет сгруппировать отходы, содержащиеся в кубовом остатке и полностью их переработать.

В дальнейшем чистая вода и гликоль смешиваются в необходимом соотношении, добавляется рН-буфер, ингибиторы коррозии, краситель и другие добавки [Woyciesjes et al., 2000].

При практически тех же объемах отходов переработки мы получаем продукт значительно более высокой степени чистоты [Marburger, Okey, 2013]. Более того, мы можем получить продукт переработки с любой концентрацией гликоля [Marburger, Okey, 2013]. Существенным недостатком метода являются значительные энергозатраты [Marburger, Okey, 2013].

3. Обсуждение

Разработанный метод представляет собой последовательность процедур по очистке гликольсодержащих отходов. Несмотря на то что мы не делали прототип установки, каждая из использованных процедур полностью работоспособна и хорошо изучена по отдельности.

Предлагаемая предобработка позволяет уйти от использования фильтров с низким диаметром пор, что значительно удешевляет эксплуатацию установки.

В то же время осаждение частиц коагуляцией требует постоянной закупки коагулянтов. Поэтому мы предлагаем использовать дешевый, но достаточно эффективный коагулянт — $Al_2(SO_4)_3$. Несмотря на то что соли алюминия опасны [Шугалей и др., 2012], мы не меняем качественного состава образующихся отходов. В конечном итоге алюминий будет переработан соответствующим образом вместе с другими крупными частицами загрязнителя.

Отдельное выделение из смеси органических и минеральных масел позволяет свободно проводить их утилизацию путем сжигания в атмосфере кислорода. Предлагаемый способ предобработки не только экономически оправдан, но и характеризуется меньшим, по сравнению с предложенными ранее, количеством экологически опасных продуктов переработки.

Для дальнейшей очистки мы предлагаем два различных способа. Один не требующий серьезных экономических затрат, но характеризующийся низкой эффективностью, и второй, значительно более эффективный, но сопряженный с существенными энергозатратами.

Наиболее рационально, на наш взгляд, использовать эти методы поочередно. После первых нескольких использований гликольсодержащие смеси це-

лесообразно перерабатывать первым, более простым способом. В дальнейшем после накопления в смеси сложно выделяемых соединений, гликольсодержащие отходы рекомендуется перерабатывать вторым способом — для более глубокой очистки.

Реализация предлагаемого метода позволит значительно снизить не только экономические затраты на утилизацию гликольсодержащих отходов и экологические последствия от существующих методов утилизации, но и снизить объемы их производства из первичного сырья (нефти или природного газа). Как следствие этого, мы не только снизим прямое антропогенное воздействие, вызванное утилизацией гликолей, но и косвенно снизим потребность в нефтегазодобыче. Кроме того, предлагаемый метод представляет экономическую выгоду, так как позволяет производствам снизить затраты на утилизацию и закупку новых теплоносителей.

4. Заключение

На основе существующих разработок в области переработки гликольсодержащих отходов нам удалось сформировать метод полной и практически безотходной их реутилизации. Предлагаемый метод прост в использовании и реализации и, как следствие, представляет большой экономический интерес. Получаемые в ходе такой переработки гликольсодержащие теплоносители практически не отличаются от полученных из первичного сырья. При этом использование такого подхода к утилизации отходов существенно снизит антропогенное воздействие на окружающую среду.

Литература

- Беликов С. 2014. *Незамерзающие теплоносители*. ISBN: 978-5-905024-11-5
- Ким С., Апашина О. 2006. Обзор мирового и российского рынка моноэтиленгликоля. *Нефтехимия* 5: 32–36.
- Шугалей, И. В., Гарабаджиу А. В., Илюшин М. А., Судариков А. М. 2012. Некоторые аспекты влияния алюминия и его соединений на живые организмы. *Экологическая химия* 21(3): 172–186.
- Dabrowski A., Hubick Z., Podkoscielny P., Robbins E. 2013. Selective removal of the heavy metal ions from watersand industrial wastewaters by ion-exchange method. *Chemosphere* 56(2): 91–106.
- Haddock M. 2001. *Multi-stage Engine Coolant Recycling Process*. US Patent Application Publication (US 6187197 B1).
- Hilal N., Busca G., Talens-Alesson F., Atkin B. P. 2003. Treatment of waste coolants by coagulation and membrane filtration. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 43(7): 811–821.

- Jehle W., Staneff T., Wagner B., Steinwandel J. 1995. Separation of glycol and water from coolant liquid by evaporation, reverse osmosis and pervaporation. *J. Membrane Sci* 102: 9–19.
- John Marburger J., Okey P. 2013. *Continuous coolant purification process and device*. US Patent Application Publication (US 2013/0206580 A1).
- KFM Coolant Purification System, 2003. *Introduction to the Patented Deionization Process For Recycling Used Antifreeze*.
- Leth P.M., Gregersen M. 2005. Ethylene glycol poisoning. *Forensic Sci Int* 155, 179–184.
- Tchobanoglous G., Burton F.L., Stensel H.D. 1991. Wastewater engineering. *Management* 7: 1–4.
- Tzoupanos N.D., Zouboulis A.I. 2008. Coagulation-flocculation processes in water/wastewater treatment: the application of new generation of chemical reagents. *6th IASME/WSEAS international conference on heat transfer, thermal engineering and environment (HTE'08)*, Greece.
- Peter M., Woyciesjes A., Gershun V., Woodward S. M. 2000. *Reinhibition of recycled antifreeze/coolant*. European Patent Application (CA2065480C).
- Schmidt E. 2002. Recycling used engine coolant; What every recycler needs to know. *NORA 2002 annual recycling conference & trade show*, US.
- Szymonik M. 2010. Wodne roztwory glikoli z inhibitorami. *Chłodnictwo i Klimatyzacja* 1–2: 26–30.
- WEBA Technology. 2003. *Glycol-Based Heat Transfer Fluid Technical Manual*.
- Wheaton R.M., Lefevre L.J. 2000. *Fundamental of ion exchange*. DOW Liquid Separations Corp.
- Wright J. 2003. *Environmental Chemistry*. New York, Routledge.

С. В. Сладкова*

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО КУЛЬТИВИРОВАНИЮ АВСТРАЛИЙСКИХ КРАСНОКЛЕШНЕВЫХ РАКОВ *CHERAX* *QUADRICARINATUS* (VON MARTENS, 1868) С ЦЕЛЬЮ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИХ В БИОТЕСТИРОВАНИИ ВОД

1. Введение

Австралийские красноклешневые раки являются перспективным видом аквакультуры и в настоящее время популярны у аквариумистов. Раки этого вида являются почти идеальным тест-объектом для биотестирования неразбавленных биологически очищенных сточных вод и уже используются в системах биомониторинга на юго-западных очистных сооружениях Санкт-Петербурга [Мельник и др., 2013]. В России работы по разведению и выращиванию этого вида раков в качестве объекта аквакультуры ведутся в Астраханской области [Лагуткина, Пономарев, 2008]. Исследования по содержанию и разведению австралийских раков в условиях установки замкнутого водоиспользования проводятся в аквариальной лаборатории марикультуры ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии» (г. Москва) [Борисов и др., 2013; Жигин и др., 2017]. Настоящие рекомендации по культивированию красноклешневых раков в тропическом экотроне ресурсного центра основываются на базовых принципах культивирования этого вида раков в лабораторных (аквариальных) условиях [Barki et al., 2006; Борисов и др., 2013]. При этом они содержат ряд дополнений и изменений, связанных с гидрохимическим составом Невской воды и целевым назначением культивируемых гидробионтов.

2. Биология вида

Австралийский красноклешневый рак относится к типу Arthropoda (членистоногие), подтипу Crustacea (ракообразные), классу Malacostraca (высшие раки),

* Ресурсный центр «Обсерватория экологической безопасности», Научный парк СПбГУ.

отряду Decapoda (десятиногие ракообразные), семейству Parastacidae, роду *Cherax*, вид *Cherax quadricarinatus*.

Красноклешневые раки являются тропическим аборигенным видом для водоемов северо-восточной Австралии и Папуа — Новой Гвинеи, инвазивным видом во многих тропических странах и как объект аквакультуры выращиваются в Австралии, Турции, Израиле.

В настоящее время морфология и физиология красноклешневых раков, как теплолюбивых представителей речных раков, достаточно хорошо изучена [Lowrence, Jones, 2002; Сладкова и др., 2017]. В природных условиях раки предпочитают водоемы с непроточной или слабопроточной водой. Предпочитают пользоваться готовыми убежищами — полостями под корягами и камнями, а не рыть норы в грунте. Этот вид раков толерантен к вариации ряда физико-химических характеристик воды, а именно: мутности, содержанию кислорода и биогенов, солености воды до 5 ‰. Его предпочтительный температурный диапазон составляет от 23 °С до 31 °С. Все это в сочетании с высокой плодовитостью и высокой скоростью роста, отсутствием стадий пелагических личинок позволяет успешно культивировать красноклешневых раков в искусственных условиях.

Окраска раков варьирует в зависимости от местообитания. Основной цвет ярко-синий с желтоватыми крапинами по всему телу. В мягкой воде окраска становится более темной. Самцы отличаются мощными клешнями, на наружной стороне клешней развивается широкий плоский нарост. Появляется этот вырост у самцов не сразу, а только после наступления половой зрелости в возрасте 6–9 месяцев (рис. 1). В природе длина рака может достигать 20 см, вес до 500 г., самки поменьше и изящнее. Продолжительность жизни до 5 лет. Питаются раки разнообразной пищей как растительного, так и животного происхождения, детритом.

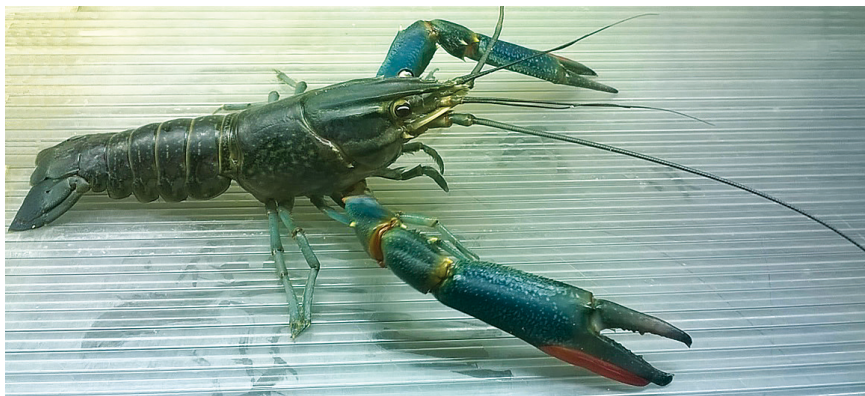


Рис. 1. Самец красноклешневого рака *Cherax quadricarinatus* [Von Martens, 1868]

Красноклешневые раки очень плодовиты: крупная самка может вынашивать до 1000 икринок, которые располагаются у нее под брюшком. Однако выживает лишь небольшая часть молодняка. Время развития эмбрионов зависит от температуры воды, процесс этот может занимать от 8 до 9 недель.

3. Основные вопросы культивирования красноклешневых раков

Культура красноклешневых раков, поддерживаемая в РЦ ОЭБ, была получена от одной пары производителей, что является важным моментом для дальнейшего успешного создания референтных групп раков, которых можно использовать в качестве биоиндикаторов в биоэлектронных системах мониторинга качества воды.

Раки культивируются в климатической (тропической) комнате ресурсного центра «Обсерватории экологической безопасности». Температура воды (26°C) и освещенность (12/12) поддерживаются в автоматическом режиме. Раки содержатся в аквариумных системах замкнутого водоснабжения (УЗВ), состоящих из аквариумов большого объема (от 200 литров) и аквариумов меньшего объема 60 литров. Система аквариумов оборудована циркуляционным насосом и биологическим фильтром, обеспечивающим циркуляцию и биологическую фильтрацию воды. Большие аквариумы закрываются неплотно прилегающими полипропиленовыми листами, которые препятствуют испарению воды и уменьшают освещенность. Основные гидрохимические показатели должны соответствовать требованиям нормативов для УЗВ [Жигин, 2011]. Учитывая автоматическую работу системы рециркуляции и автоматический контроль температуры и освещенности, обслуживание ограничивается периодическим контролем параметров воды и частичной ее сменой, если содержание нитратов превысит предельно допустимое значение (40 мг/л). Для культивирования раков используют отстоянную водопроводную воду. Поскольку невская вода имеет низкую минерализацию и содержание кальция в ней недостаточно для нормальной жизнедеятельности раков, то для повышения жесткости воды на дно аквариума в качестве грунта насыпается мраморная крошка. С этой же целью рекомендуется добавлять в воду морскую соль в таком количестве, чтобы соленость воды была около 1 ‰. Повышение солености воды в сочетании с периодической обработкой ультрафиолетовой лампой также является и профилактической мерой заболевания раков.

Для обеспечения максимально комфортного кислородного режима используется компрессор. Чтобы уменьшить агрессию и каннибализм у раков в аквариумы помещается достаточное количество убежищ для взрослых особей, в качестве которых используются полипропиленовые трубки разного



Рис. 2. Рак в аквариуме

диаметра. Чтобы максимизировать выживание и рост молоди, необходимо большое количество укрытий и для нее (рис. 2). Это достигается помещением в аквариумы пучков спутанных пластиковых нитей, которые структурируют объем и обеспечивают много пространств для использования их молодью. Кормить раков можно раз в 3 дня личинками хиронамид и аквариумным кормом для ракообразных (2% от массы раков в пересчете на суточный рацион).

При указанных выше условиях самки впервые откладывают икру при массе выше 30 г, а далее с периодичностью 2 или 3 раза в год. Период развития икры под абдоменом самки длится в пределах полутора месяцев. О нормальном развитии эмбрионов можно судить по тому, что в яйце становятся видимыми так называемые глазные точки — органы зрения будущего рака (рис. 3). Вылупившиеся личинки продолжают находиться на абдомене самки еще около 15 суток. За это время они претерпевают три личинных стадии и приобретают все черты строения взрослой особи. После этого молодь покидает самку и живет самостоятельно.

Количество молоди зависит от размера самки и составляет 100 и более экземпляров. Для достижения среднего размера молоди от 5 до 15 г, при котором хорошо видны половые различия, необходим период культивирования от 3 до 4 месяцев. Половой зрелости раки достигают в возрасте от 7 до 12 месяцев при размере тела около 6–10 см. Однако если не проводить никаких манипуляций по формированию маточного стада и отсаживанию молодняка в отдельные аквариумы, то в аквариуме сформируется маточное стадо, состоящее из 8–10 взрослых особей, в основном самок, и большого количества молоди разного размера. Это связано с тем, что у раков, выращиваемых в аквариумных условиях, сильно развит каннибализм, особенно среди молодняка, а борьба за доминирование среди самцов приводит многих из них к потере конечностей и гибели.



Рис. 3. Самка красноклешневого рака с молодью 1-й стадии

Поэтому, чтобы избежать больших потерь самцов, которые, как правило, используются в качестве тест-объектов в системах биотестирования качества теплых вод, необходимо периодически сортировать маленьких рачков по размеру, начиная с 5 г, и отсаживать часть самцов в отдельные аквариумы для индивидуального выращивания. Когда раки достигнут длины тела (от роострума до тельсона) 6 см, из них можно формировать референтные группы раков для биотестирования.

4. Оборудование, материалы, реактивы

- УЗВ, состоящая из аквариумов разного размера;
- корм для раков: мелкий и крупный мотыль, аквариумный корм для ракообразных;
- мраморная крошка;
- полипропиленовые трубки разных размеров и пучки пластиковых нитей;
- соль морская профессиональная;
- тест для определения нитратов.

Литература

- Борисов Р.Р., Ковачева Н.П., Акимова М.Ю., Паршин-Чудин А.В. 2013. *Биология и культивирование австралийского красноклешневого рака *Cherax quadricarinatus* (Von Martens, 1868)*. Москва, Изд-во ВНИИРО.
- Жигин А.В. 2011. *Замкнутые системы в аквакультуре*. Москва, Изд-во РГАУ-МСХА им. К. А. Тимирязева.

- Жигин А. В., Борисов Р. Р., Ковачева Н. П., Загорская Д. С., Арыстангалиева В. А. 2017. Выращивание австралийского красноклещевого рака в циркуляционной установке. *Рыбное хозяйство* 1: 61–65.
- Лагуткина Л. Ю., Пономарев С. В. 2008. Новый объект тепловодной аквакультуры — австралийский красноклещевой рак (*Cherax quadricarinatus*). *Вестник АГТУ* 6 (47): 220–223.
- Мельник Е. А., Рублевская О. Н., Панкова Г. А., Холодкевич С. В., Иванов А. В., Корниенко Е. Л., Сладкова С. В., Любимцев В. А., Куракин А. С. 2013. Биоэлектронная система контроля токсикологической безопасности биологически очищенных сточных вод, сбрасываемых Юго-Западными очистными сооружениями ГУП «Водоканал Санкт-Петербурга» в Невскую губу. *Водоснабжение и санитарная техника* 1: 7–12.
- Сладкова С. В., Холодкевич С. В., Сафронова Д. В., Борисов Р. Р. 2017. Кардиоактивность раков *Cherax quadricarinatus* (von Martens 1868) в различных физиологических состояниях. *Принципы экологии* 6 (3): 43–58. doi: 10.15393/j1.art.2017.6442
- Barki A., Karplus I., Manor R., Parnes S., Aflalo E. D. & Sagi A. 2006. Growth of redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) in a three-dimensional compartments system: Does a neighbor matter? *Aquaculture* 252: 348–355.
- Lawrence C., Jones C. 2002. *Cherax*. In: Holdich D. M. (ed). *Biology of Freshwater Crayfish*. UK, Oxford, Blackwell Science: 635–670.

*А. Ю. Лянгузов, Т. А. Петрова**

ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДА АНАЛИЗА СПЕКТРОВ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПОЛЛЮТАНТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВОЗМОЖНОСТЕЙ СВОБОДНОГО ЯЗЫКА ПРОГРАММИРОВАНИЯ R

В модельных экспериментах на примере широко распространенных поллютантов (фенолы, антибиотики) показано как можно повысить эффективность спектрального анализа веществ, используя возможности открытого языка программирования R. Исследованы УФ-спектры и их 4-е производные растворов резорцина, бензилпенициллина и тетрациклина и их смесей. Продемонстрированы возможности качественного и количественного анализа препаратов и их смесей в разных соотношениях. Приведен вариант авторской разработки скрипта на языке R для выполнения спектральных исследований веществ.

Метод спектрального анализа веществ широко используется при исследовании загрязнения окружающей среды, а также на производствах, связанных с химическими и биологическими технологиями, проведением лабораторных анализов биомолекул, пестицидов, химреагентов, лекарств [<http://pharmascroeia.ru/ofs-1-2-1-1-0003-15-spektrofotometriya-v-uf-i-vidimj-oblastyah/>]. Современные спектрофотометры укомплектованы фирменными пакетами программного обеспечения, позволяющими производить некоторые варианты математической обработки первичных результатов экспериментов и представлять результаты в цифровом и графическом виде [UV WinLab Software 6.0.4].

Тем не менее, поскольку прилагаемое к приборам программное обеспечение является коммерческим продуктом, оно не только изначально ограничено в своих возможностях, но и достаточно быстро устаревает и требует регулярного дорогостоящего обновления.

* Ресурсный центр «Обсерватория экологической безопасности», биохимический блок, Научный парк СПбГУ.

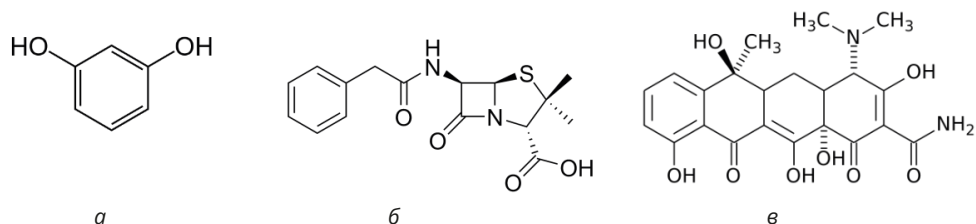


Рис. 1. Структурные формулы резорцина (*a*), бензилпенициллина (*б*) и тетрациклина (*в*)

В настоящей работе мы покажем, как, используя преимущества свободного (бесплатного) языка программирования R, можно с максимальной эффективностью извлекать информацию из первичных спектральных данных и представлять конечные результаты в удобном для каждого пользователя формате [3].

В качестве модельных объектов выбраны 3 вида потенциальных поллютантов: резорцин, натриевая соль бензилпенициллина и тетрациклина гидрохлорид. Структурные формулы резорцина, бензилпенициллина и тетрациклина приведены на рис. 1.

Резорцин — препарат группы фенолов — широко востребован в химической промышленности в качестве сырья для производства искусственных красителей, флуоресцеина, резорцино-формальдегидных смол, растворителей, стабилизаторов, пластификаторов и поглотителей УФ-излучения для пластмасс, а также при производстве резиново-технических изделий и в меховой промышленности. Активно используется в медицине и фармацевтике. Применяется как дезинфицирующее, прижигающее, ранозаживляющее средство. Препарат хорошо растворим в воде, в больших количествах обнаруживается в сточных водах соответствующих промышленных производств.

Натриевая соль бензилпенициллина, тетрациклин и его производные — основные виды антибиотиков, применяемых в ветеринарии, скотоводстве и птицеводстве в качестве кормовой добавки для защиты от болезней, а также ускоренного роста животных и увеличения продолжительности хранения сельскохозяйственных продуктов. Для этих целей в мире ежегодно используются тысячи тонн антибиотиков, существенная доля которых в итоге попадает во внешнюю среду.

Исходные спектры многих химических реагентов и биомолекул в УФ- и видимой областях представляют собой слившиеся полосы поглощения света отдельными хромофорными группами. Математическая обработка первичных данных с использованием производных спектров позволяет разложить спектр на отдельные составляющие и более точно идентифицировать некоторые виды сложных молекул. Наиболее продуктивно использование 4-х производных [Talsky G., 1994]. Положение максимумов на графике 4-й производной указы-

вает на положение полос, составляющих исходный спектр. Кроме того, в процессе обработки сглаживаются приборные шумы и элиминируются тренды базовой линии, появляющиеся, например, из-за наличия светорассеивающих примесей, что может быть полезным в том числе и в количественном анализе. В целом же наблюдается более выраженная и характерная, по сравнению с исходными спектрами, картина.

На рис. 2 представлены спектры поглощения растворов натриевой соли бензилпенициллина (рис. 2, *а*) и резорцина (рис. 2, *б*) в ультрафиолетовой области и их 4-е производные. Растворы приготовлены на 0.1 М фосфатном буфере pH 7.4. Исследования проведены на спектрофотометре PerkinElmer Lambda 35. Обработка спектральных данных и графическое оформление результатов выполнены с использованием функций и скриптов, написанных нами на свободном языке программирования R.

При сравнении рисунков 2, *а* и 2, *б* на графиках 4-х производных отчетливо идентифицируются три полосы резорцина с максимумами в зоне 267–283 нм и пять полос бензилпенициллина в области 245–265 нм. Выбирая непрерывающиеся полосы и учитывая линейную зависимость амплитуд полос от концентраций компонентов, можно количественно определять их содержание даже в составе смесей (рис. 2, *в*). Эта опция количественного анализа в коммерческом программном пакете не предусмотрена.

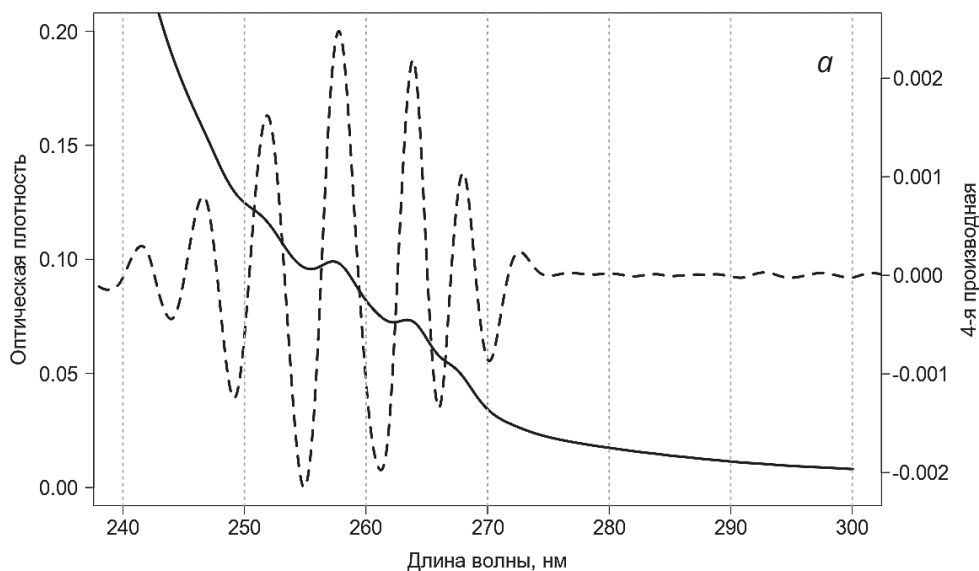


Рис. 2. Спектры поглощения в УФ-области и их 4-е производные: раствора натриевой соли бензилпенициллина (*а*); раствора резорцина (*б*) и их смеси (*в*) в 0.1 М фосфатном буфере pH 7.4 (начало)

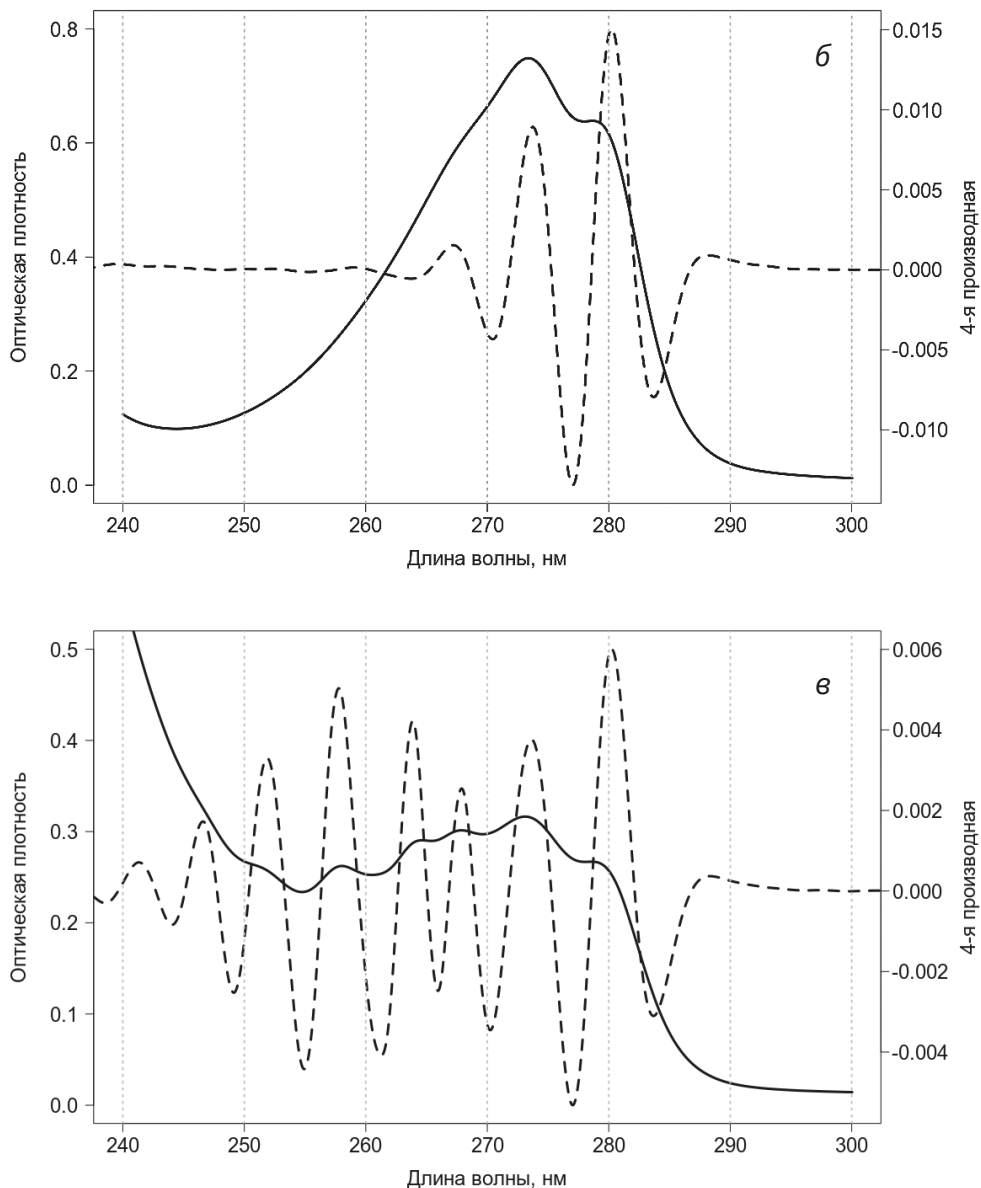


Рис. 2. Спектры поглощения в УФ-области и их 4-е производные: раствора натриевой соли бензилпенициллина (а); раствора резорцина (б) и их смеси (в) в 0.1 М фосфатном буфере рН 7.4 (окончание)

Характеристиками амплитуды полос могут служить величины

$$A_R = (S_{281} + S_{274})/2 - S_{277}$$

для оценивания количества резорцина и

$$A_{BP} = (S_{252} + 2 \cdot S_{258} + S_{264})/2 - S_{255} - S_{261}$$

для оценивания количества бензилпенициллина, где S_l — значение 4-й производной при длине волны l (значения максимумов и минимумов). Эти величины пропорциональны концентрации компонентов $C = k \cdot A$. Коэффициент k можно определить, выполнив калибровочные эксперименты, учитывающие конкретные особенности используемых растворителей, влияющих на профиль спектров.

В наших опытах в смесях с разными соотношениями резорцина и натриевой соли бензилпенициллина наблюдалась линейная зависимость между амплитудами пиков 4-й производной и концентрациями реагентов: коэффициент корреляции составил 0.999.

Спектр еще одного потенциального поллютанта, тетрациклина гидрохлорида (рис. 3), существенно отличается от рассмотренных выше. В нем есть пик с максимумом в зоне 370–371 нм, обнаружению и использованию которого для количественного анализа тетрациклина в смесях не препятствуют ни бензилпенициллин, ни резорцин (у них отсутствует поглощение в этой области). Высота этого пика пропорциональна концентрации тетрациклина, согласно закону Бугера—Ламберта—Бера. В то же время значения 4-й производной спектра тетрациклина в диапазоне 240–280 нм на порядок меньше соответствующих значений бензилпенициллина и резорцина и практически не влияют на их оценки. Следовательно, достаточно надежно можно определять концентрации всех трех исследуемых поллютантов в смесях, сочетая анализы спектров и 4-х производных спектров (рис. 4).

Функции расчета производных и некоторые графические опции реализованы и в пакетах коммерческих программ, прилагаемых к современным высокотехнологичным аналитическим приборам, но, как мы уже указывали, диапазон их возможностей изначально ограничен и не допускает расширения. Однако эти программы позволяют сохранить спектральные данные в виде таблицы со значениями длин волн и оптических плотностей в формате файла ASCII, который затем может быть проанализирован с помощью скрипта на языке R.

Свободный язык программирования R включает в себя множество функций, позволяющих прочесть спектральные данные с диска, провести их математическую обработку, включая статистический анализ, и вывести результаты в табличной или графической форме. Некоторые готовые функции анализа и представления результатов уже встроены в язык R, но они могут быть дополнены подключением модулей из репозитория [<http://cran.r-project.org>] или самостоятельными разработками. Простейший скрипт для обработки спектральных данных состоит всего из двух строк, считывающих данные и вы-

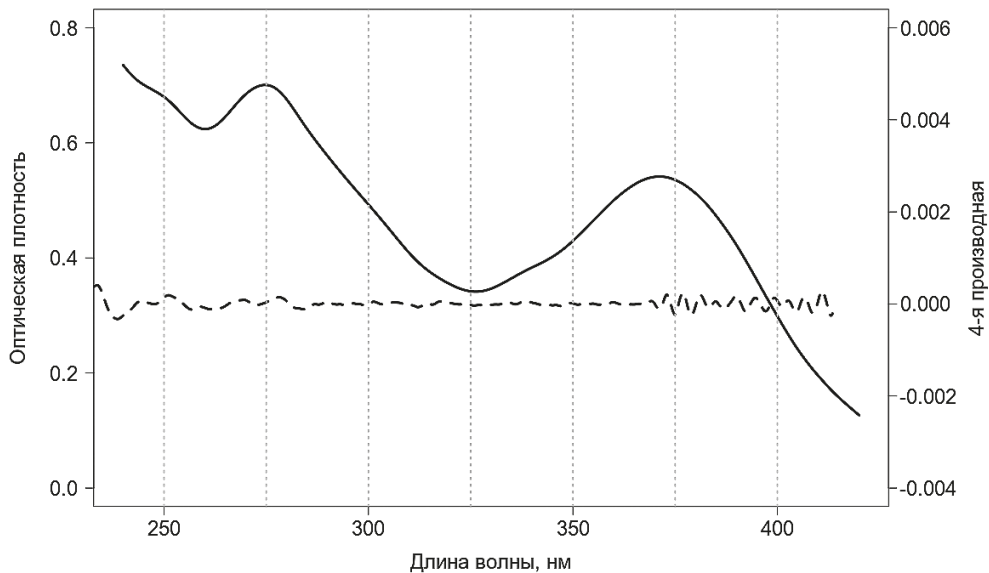


Рис. 3. УФ-спектр поглощения раствора тетрациклина гидрохлорида в 0.1 М фосфатном буфере рН 7.4 и его 4-я производная

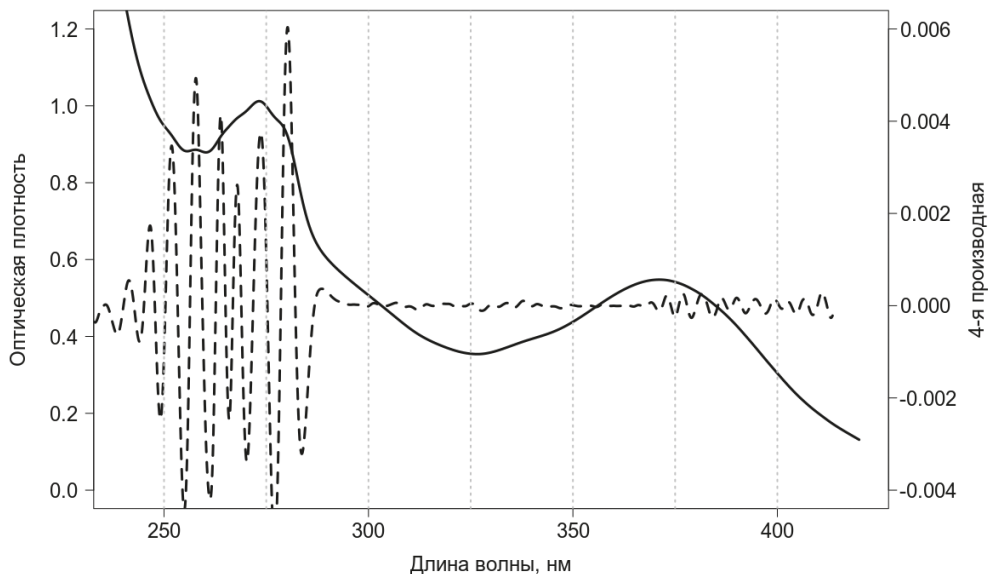


Рис. 4. УФ-спектр смеси, содержащей натриевую соль бензилпенициллина, резорцин и тетрациклина гидрохлорид в 0.1 М фосфатном буфере рН 7.4, и его 4-я производная

водящих их в виде графика. Затем, по мере надобности, в скрипт добавляются новые функции, модифицирующие и дополняющие операции над данными (вычисление производных спектра, вывод графика производной поверх исходного спектра, количественный анализ спектральных данных, необходимый статистический анализ, корректное оформление графиков, добавление надписей и обозначений и т. д.). Усложнение скрипта осуществляется последовательно для решения новой усложненной задачи анализа спектра.

Для облегчения работы со скриптами используются графические интерфейсы, в частности RStudio, который представляет собой свободную среду вычислений, состоящую из нескольких окон: текст скрипта, вывод результатов и графиков. RStudio позволяет написать и модифицировать скрипт, отладить его работу, а затем выполнить его и получить результаты обработки данных, сохранить графики и таблицы результатов в нужном формате. Пример работы со спектром смеси натриевой соли бензилпенициллина, резорцина и тетрациклина гидрохлорида в среде RStudio показан на рис. 5. В Приложении представлен соответствующий авторский скрипт для обработки спектральных данных на языке R.

Приведенные примеры — всего лишь иллюстрация общего подхода использования методов спектрального анализа тысяч и тысяч других веществ и их смесей, обладающих свойством поглощения света в ультрафиолетовом и видимом диапазонах длин волн.

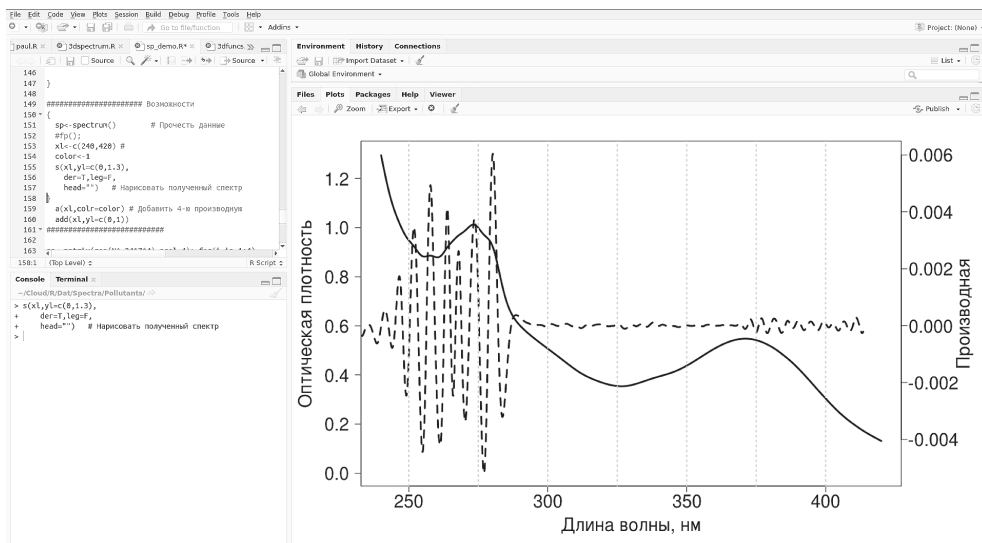


Рис. 5. Пример анализа спектра смеси натриевой соли бензилпенициллина, резорцина и тетрациклина гидрохлорида в свободной среде вычислений Rstudio

В заключение необходимо подчеркнуть, что использование свободного языка программирования R позволяет выйти за жесткие рамки коммерческого программного обеспечения, расширить возможности спектрального анализа, представить конечные результаты в соответствии с конкретными интересами каждого пользователя.

Литература

- Государственная фармакопея РФ XIII online (ГФ 13 online). <http://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-1-1-0003-15-spektrofotometriya-v-uf-i-vidimoj-oblastyah/>
- Коммерческая компьютерная программа к спектрофотометру PerkinElmer Lambda 35, UV WinLab Software 6.0.4. <http://www.perkinelmer.com/>
- Сайт свободного языка программирования R. <http://cran.r-project.org/>
- Talsky G., 1994. *Derivative spectrophotometry*. Weinheim.

Приложение

Пример скрипта на языке R для обработки данных спектрального анализа (авторская разработка)

```
fn<-"/Pollutants" # Директория со спектральными данными
{
library("magicaxis")
setwd(paste("/home/andy/Cloud/R/Dat/Spectra",fn,sep=""))

# Прочсть данные, вычислить 4-ю производную
spectrum<-function(instr=1,fn=file.choose()) {
t<-read.table(fn, header=FALSE, dec=",",
  sep="\t", blank.lines.skip=FALSE, skip=90)
ss<-spline(t$V1,t$V2,n=17*length(t$V1)); ss[[3]]<-y4(ss,37)
return(ss)
}

# Нарисовать спектр
s<-function(xl=c(min(sp$x),max(sp$x)),ccol=1,
  head="",der=F,leg=F) {
par(plt=c(0.1, 0.88, 0.14, 0.94))
xn<-"Длина волны, нм"; yn<-"Оптическая плотность"
X1<-which(sp$x>=xl[1])[1]
if(xl[2]<max(sp$x)) X2<-which(sp$x>=xl[2])[1] else X2<-length(sp$x)
plot(smooth.spline(sp$x[X1:X2],sp$y[X1:X2],df=70), type="l",
  las=1, xlab=xn,ylab=yn, main=paste("\n",head,sep=""),
  xlim=xl, lwd=2,col=ccol,axes=T, cex.axis=1.2,cex.lab=1.3)
if(der) a(xl,leg,colr=4)
gr()
}
```



```

# Добавить 4-ю производную на график
a<-function(xl=c(par("ххр")[1],par("ххр")[2]),colr="blue",leg=T){
  par(new=T)
  plot(sp[[3]]~sp$x,type="l",lwd=2,pty=2,col=colr,
       xlim=c(xl[1],xl[2]),xlab="",ylab="",axes=F)
  axis(side=4,las=1,col.axis=colr,cex.axis=1.2)
  mtext(side=4,"Производная",line=4,col=colr,cex=1.3)
  if(leg) legend("bottomleft",legend=c("Спектр","Производная"),
               lwd=3,pty=c(1,2), col=c("black",colr))
}

# Добавить сетку на график
gr<-function(){
  xxl<-par("ххр"); x0<-xxl[1]; x1<-xxl[2]; nn<-xxl[3]
  if(nn<=3) nn<-nn*2
  dx<-(x1-x0)/nn
  abline(v=x0+(0:nn)*dx,col="grey",lwd=2,pty=3)
}

# Вычисление 4-й производной
y4<-function(s,st){
  yt<-rep(NA,length(s$y)); h<--(s$x[2]-s$x[1])*st
  for(i in (3*st+1):(length(s$x)-3*st))
    yt[i]<-(-6*s$y[i-2*st]+24*s$y[i-st] -36*s$y[i]
           +24*s$y[i+st]-6*s$y[i+2*st])/(6*h^4)
  return(yt)
}

# Измерение высот пиков
fp<-function(){
  mn<-c(254,261,277); mx<-c(251,257,263,273,280.5)
  Mn<-NULL; Mx<-Mn; l<-Mn; h<-Mn
  for(i in 1:3) {
    Mn[i]<-min(which(sp$x>=mn[i]))
    l[i]<-min(sp[[3]][Mn[i]:(Mn[i]+50)])
    Mn[i]<-min(which(sp[[3]][Mn[i]:(Mn[i]+50)]<=l[i]))+Mn[i] }
  for(i in 1:5) {
    Mx[i]<-min(which(sp$x>=mx[i]))
    h[i]<-max(sp[[3]][Mx[i]:(Mx[i]+50)])
    Mx[i]<-min(which(sp[[3]][Mx[i]:(Mx[i]+50)]>=h[i]))+Mx[i] }
  a1<-1000*((h[1]+h[2])/2-l[1]+(h[3]+h[2])/2-l[2])
  a2<-1000*((h[4]+h[5])/2-l[3])
  a3<-mean(sp[[2]][wl(370):wl(371)])
  return(c(a1,a2,a3))
}

wl<-function(l){
  min(which(sp[[1]]>=l))
}
}

##### Возможности

sp<-spectrum() # Прочсть данные из указанной директории

```

fp() # Измерение параметров, пропорциональных концентрации компонентов

s(xl=c(240,420),

der=T,leg=F,

head="Тетрациклин") # Нарисовать полученный спектр (и 4-ю производную)

Комментарии: xl — диапазон длин волн для построения графика,

если не вводить, спектр будет нарисован полностью

der=T (или F) — добавить или нет 4-ю производную

leg=F (или T) — не добавлять легенду на график

head= "" — название графика

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ ВОДЫ ПО АЭРОБНОМУ ЭНЕРГООБМЕНУ ДАФНИЙ

1. Введение

Назначение и принцип методики

Методика устанавливает процедуру определения токсичности сточных, поверхностных и подземных вод, донных отложений (водных вытяжек), водных растворов различных веществ в лабораторных условиях с использованием в качестве тест-объекта дафнии вида *Daphnia magna* Straus, а в качестве тест-функции скорость потребления кислорода ими.

Интенсивность аэробного энергообмена гидробионтов, которую можно оценивать по скорости потребления кислорода, может служить индикатором качества водной среды. [Бигон и др., 1989; Колупаев, 1992; Martin et al., 2007]. В случае, когда токсические вещества, находящиеся в воде, оказывают острое летальное воздействие, угнетение энергетического обмена у дафний наблюдается уже в первый час воздействия. Проведенный анализ собственных и литературных данных [Spicer, Weber, 1991; Сладкова, 2016] влияния загрязняющих веществ на скорость потребления кислорода дафниями, позволяет сделать вывод, что регистрация интенсивности потребления кислорода в районе часового диапазона, когда собственно токсический эффект уже присутствует, а механизмы компенсации еще недостаточно проявились, является оптимальной для оценки токсичности воды.

Методика основана на установлении различия между скоростью потребления кислорода дафниями в анализируемой пробе (опыт) и культивационной воде (контроль). Измерение скорости потребления кислорода дафниями проводится полярографическим методом.

Предлагаемая методика чувствительна к биологически активным химическим веществам (тяжелые металлы, сильные окислители, дыхательные яды и т. д.) и является экспресс-методом по сравнению с классическим дафниевым тестом.

* Ресурсный центр «Обсерватория экологической безопасности», Научный парк СПбГУ.

2. Подготовка, условия и процедура выполнения биотестирования

Исследования проводятся на лабораторной партеногенетической культуре *Daphnia magna* Straus, которая культивируется в лаборатории в контролируемых условиях. Культуру дафний выращивают в стеклянной посуде вместимостью до 2 дм³ в термолуминостане или экотроне с умеренным климатом. Для культивирования дафний используют водопроводную воду. Водопроводную воду предварительно дехлорируют путем отстаивания и аэрируют микрокомпрессором до достижения концентрации растворенного кислорода не менее 6 мг/дм³. Один раз в неделю взрослых дафний в возрасте до 4 недель и молодь (для дальнейшего поддержания культуры) пересаживают отдельно в посуду со свежей водой. Дафний кормят один раз в сутки суспензией зеленых водорослей и один раз в неделю — суспензией хлебопекарных дрожжей. Условия и процедура культивирования дафний в лабораторных условиях подробно описана в «Методике определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний» (ФР.1.39.2007.032226). Для биотестирования используют дафний в возрасте 5 суток. Чтобы получить необходимое количество тест-объектов для биотестирования, 4–5 самок дафний с выводковыми камерами, полными яиц или зародышей, за 5 суток до биотестирования пересаживают в стеклянную посуду емкостью от 0,5 до 1,0 дм³ с водой для культивирования и вносят корм. После появления молоди (каждая самка может выметать от 10 до 40 молодых дафний) взрослых особей удаляют.

Биотестирование проводят в помещении, где не хранят и не работают с летучими веществами, при оптимальной температуре (20±2)°С. Концентрация кислорода в пробе в начале биотестирования — не менее 6 мг/дм³. Если его концентрация ниже 6 мг/дм³, пробу аэрируют микрокомпрессором.

Перед измерением скорости потребления кислорода дафниями проводят оценку потребления кислорода микроорганизмами, присутствующими в опытной и контрольной воде. Для этого в бюкс или стаканчик емкостью 10 мл наливают культивационную воду (контрольная проба), через 1 час туда помещается полярографический зонд оксиметра, сосуд герметично закрывают и в течение 20 минут проводят измерения концентрации растворенного кислорода, осуществляя перемешивание с помощью магнитной мешалки.

Аналогичную процедуру проводят и с исследуемой водой, используя другой стаканчик. Наличие двух оксиметров позволяет проводить измерения скорости потребления кислорода микроорганизмами в контрольной и опытной пробе одновременно. Предварительные собственные исследования показали, что данное измерение является принципиально важным при оценке токсичности сточных вод. При оценке токсичности поверхностных вод водо-

емов потребление кислорода микроорганизмами не является существенным и составляет не более 3 % от потребления кислорода дафниями.

Дафний в количестве 10 штук помещают в сосуды для исследования. Для этого их отлавливают стеклянной трубкой с внутренним диаметром 5–7 мм из культуры и вместе с водой, попавшей в трубку, переносят в пустой сосуд для измерения. Затем пастеровской пипеткой отсасывают жидкость и осторожно приливают в один сосуд отмеренный объем контрольной, в другой — тестируемой воды. Через 1 час сосуды герметично закрывают (см. рис. 1) и проводят ежеминутную регистрацию содержания концентрации растворенного в воде кислорода.

Перемешивание не осуществляют, во избежание травмирования дафний, кроме того, постоянное характерное движение рачков обеспечивает достаточное перемешивание воды. Через 20 минут измерения заканчивают. После проведения измерений дафний взвешивают на торсионных или аналитических весах. Для этого их помещают на сачок из планктонного газа. Затем осторожно с помощью пинцета или гистологической иглы переносят на фильтровальную бумагу. Повторность измерений трехкратная.

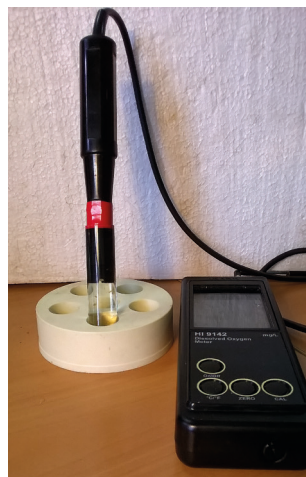


Рис. 1. Общий вид установки для измерения скорости аэробного дыхания дафний

3. Обработка и оценка результатов

Для определения скорости потребления кислорода дафниями строят кинетические кривые зависимости содержания растворенного кислорода в воде от времени и методом наименьших квадратов аппроксимируют их линейной зависимостью, тангенс угла наклона этих кривых характеризует скорость потребления кислорода живыми организмами, находящимися в сосуде. В качестве примера на рис. 2 показаны типичные экспериментальные кривые падения концентрации кислорода в сосуде с дафниями в контрольной среде и в токсическом растворе 1 мг/л Cu^{2+} .

Видно, что в течение 20-минутной записи угол наклона экспериментальной кривой, отражающей изменение кислорода в контрольной среде, не изменяется, что свидетельствует в пользу того, что дафнии не испытывают гипоксии, поскольку не изменяют скорости потребления кислорода. Коэффициент корреляции в контроле — 0,96, а в растворе медного купороса — 0,7. Снижение коэффициента корреляции, в свою очередь, тоже свидетельствует о токсическом действии на процессы аэробного дыхания дафний.

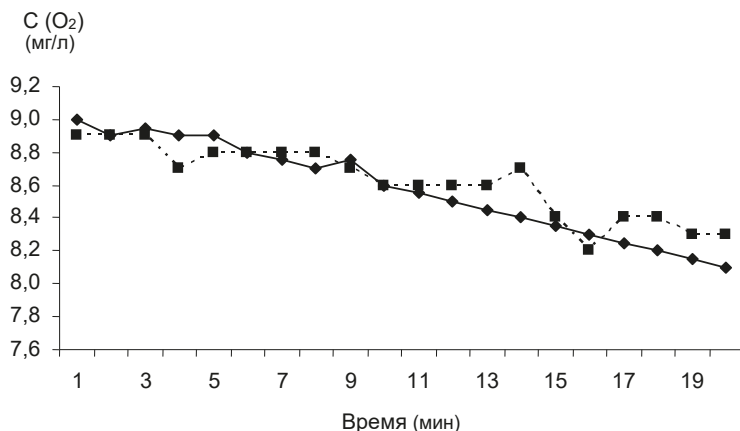


Рис. 2. Динамика содержания кислорода в воде с дафниями после часовой экспозиции: сплошная линия — контрольная среда, пунктир — токсический раствор меди в концентрации 1 мг/л Cu^{2+}

Интенсивность потребления кислорода дафниями при условии монотонной линейной зависимости содержания кислорода в сосуде от времени, определяется по формуле

$$Q = \frac{(C_{t_1} - C_{t_2})V}{(t_1 - t_2)W}, \quad (1)$$

где Q — скорость потребления кислорода (мг O_2 /г·мин), t — время (мин), C — концентрация кислорода мг/л в среде в момент времени t , V — объем сосуда (л), W — масса всех дафний (г).

В нашем конкретном случае формула, по которой рассчитывается скорость потребления кислорода дафниями, имеет следующий вид:

$$Q_n = \frac{((C_{t_1} - C_{t_2}) - \Delta C)0,01}{20W_n}, \quad (2)$$

где ΔC — количество кислорода потребленное микроорганизмами, n -кратность измерения ($n = 1, n = 2, n = 3$), остальные обозначения как ранее.

Рассчитывается средняя арифметическая скорость потребления кислорода дафниями в контрольных и опытных образцах (контроль принимается за 100%).

$$Q_{\text{cp}} = (Q_1 + Q_2 + Q_3)/3. \quad (3)$$

Далее рассчитывается процент изменения скорости потребления кислорода дафниями в тестируемой воде по сравнению с контролем:

$$\Delta Q = \frac{(Q_K - Q_T)100}{Q_K}, \quad (4)$$

где Q_K — среднее арифметическое скорости потребления кислорода дафниями в контроле, Q_T — среднее арифметическое скорости потребления кислорода дафниями в тестируемой воде.

Критерием токсичности является отклонение в скорости потребления кислорода дафниями на 15 % и более ($|\Delta Q| \geq 15\%$) в тестируемой воде по сравнению с контролем. Данный критерий обоснован в работе [Сладкова, 2016], где представлены сравнительные данные по выживаемости дафний и скорости потребления кислорода в токсических растворах.

4. Оборудование, материалы, реактивы

Используют обычное лабораторное оборудование, приборы, посуду, материалы и реактивы, в том числе:

- термолюминодат, бокс или экотрон с умеренным климатом, обеспечивающий регулируемый режим освещенности и температуры (температура воды $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$, освещенность $(500 + 100)$ лк);
- оксиметр с полярографическим зондом, например оксиметр HI 914 с погрешностью 1,2 % по кислородной шкале, $\pm 0,2^\circ\text{C}$ по шкале температуры (2 шт.);
- микрокомпрессор аквариумный;
- лупа складная;
- газ мельничный № 26–38 и сачок из него;
- трубки стеклянные внутренним диаметром 5–7 мм для отлова дафний;
- дрожжи хлебопекарные;
- культура зеленых водорослей (*Chlorella* или *Scenedesmus*).

Литература

- Бигон М., Хартер Дж., Таунсенд Дж. 1989. *Экология: Особи, популяции и сообщества*. Москва, Изд-во Мир.
- Колупаев Б. И. 1992. Дыхание гидробионтов в токсичной среде. Казань, Изд-во КГУ.
- Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний*. ФР. 1.39.2007.03222. Москва, Изд-во АКВАРОС.
- Сладкова С. В. 2016. Интенсивность аэробного энергообмена ракообразных как индикатор качества водной среды, в *Экология родного края: проблемы и пути решения*. Киров, Изд-во Радуга-ПРЕСС: 401–404.

- Martin J. S., Saker M. L., Teles L. F., Vasconcelos V. M. 2007. Oxygen consumption by *Daphnia magna* Strauss as a marker of chemical stress in the aquatic environment. *Environ. Toxicol. Chem.* 26: 1987–1991. doi: 10.1897/07-051R.1
- Spicer J. I., Weber R. E. 1991. Respiratory impairment in crustaceans and molluscs due to exposure to heavy metals. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 100: 339–342. doi: 10.1016/0742-8413(91)90005-E

*Н. С. Власенко, В. В. Шиловских**,
*П. Д. Мурзин, А. А. Мурашкина***

МЕТОДИКА КОНТРОЛЯ КАТАЛИЗАТОРА НА ОСНОВЕ TiO_2 ДЛЯ РАЗЛОЖЕНИЯ ФЕНОЛА В СТОЧНЫХ ВОДАХ

1. Введение

Фенолы являются одними из наиболее распространенных загрязнений, поступающих в поверхностные воды со стоками предприятий. Сброс фенольных вод в водоемы и водотоки резко ухудшает их общее состояние, оказывая негативное влияние на живые организмы не только своей токсичностью [Беспамятов, 1975], но и значительным изменением содержания биогенных элементов и растворенных газов. Процесс самоочищения водоемов от фенола протекает относительно медленно и его следовые концентрации обнаруживаются на больших расстояниях от источника, поэтому проблема регулирования концентрации фенолов остро стоит перед экологами [Kottuparambil et al 2014; Проскуряков, Шмидт, 1977].

Перспективным методом очистки сточных вод от фенола является каталитическое разложение на диоксиде титана. Каталитическая способность диоксида титана к разложению фенола может зависеть от таких факторов, как размер, концентрация допанта, удельная поверхность [Pelaez et al, 2012]. Литературные данные показывают, что катализаторы, допированные ионами переходных металлов, металлов платиновой группы [Magdziarz et al, 2016] и алюминия [Navas et al, 2014; de los Santos et al, 2014] демонстрируют более высокую каталитическую способность, чем чистый диоксид титана, однако концентрации допанта, при которых каталитические свойства наиболее ярко выражены, в таких исследованиях незначительны. Контроль состава и однофазности для получаемых соединений оказывается критически важным, однако чувствительность метода порошковой дифракции недостаточна для обнаружения микроколичеств примесной фазы, а спектральные методы не обладают

* Ресурсный центр «Геомодель», Научный парк СПбГУ.

** Лаборатория ФНМ, физический факультет, СПбГУ.

необходимой локальностью для измерения отдельных частиц катализатора [Bloh et al, 2012].

Решением этой проблемы может стать использование методов электронной микроскопии и микроанализа для контроля качества получаемых катализаторов на основе диоксида титана.

Для отработки методики была использована серия соединений диоксида титана, допированных алюминием в различных концентрациях.

2. Техника эксперимента

2.1. Синтез

Первая серия поликристаллического $Al_xTi_{1-x}O_2$ синтезирована методом золь-гель-синтеза из изопропоксида титана (ТТИР, Sigma-Aldrich, 97%) и изопропоксида алюминия (АТИР, Acros Organics, 99.98%). Порошок АТИР растворили в смеси ТТИР и изопропанола в рассчитанном соотношении. Затем к раствору добавлена двухводная лимонная кислота (Вектон, 98%) как лиганд из расчета три части лимонной кислоты на одну часть ($Al^{3+}+Ti^{4+}$) в мольных долях. Полученные смеси нагреты до 200 °С и выдержаны 3 часа до удаления большей части продуктов разложения органической составляющей исходных реагентов, затем продукт прокален при 650 °С в течение 5 часов на воздухе.

Вторая серия получена классическим методом твердофазного синтеза. Для этого навески порошка TiO_2 и $Al(OH)_3$, взятые в заранее рассчитанных соотношениях, перемешивали в агатовой ступке в течение 30 минут в среде этилового спирта. Синтез порошков проводили в корундовых тиглях в муфельной печи при изотермической выдержке 650, 800, 1000 °С, скорость нагрева и охлаждения составляла 5 °С/мин с промежуточными перетирами. После обжига порошки растирали непродолжительное время всухую для разделения спекшихся частиц.

Все образцы охарактеризованы методом порошковой дифракции на дифрактометре Rigaku Miniflex II (CuK α , 15мА, 30кВ, 5°/мин) в диапазоне углов $20^\circ < 2\Theta < 80^\circ$. Структурные данные получены из базы данных ICSD.

Фотокаталитическая активность оценивалась по разложению фенола под воздействием света при стандартных условиях. Водная суспензия, содержащая 1 г/л исследуемого $Al_xTi_{1-x}O_2$ и 100 ppm фенола, диспергируется в ультразвуковой ванне в течение 10 минут, затем перемешивается в течение часа для установления сорбционного равновесия. Облучение светом производилось при помощи ксеноновой лампы (OSRAM) мощностью 150 Ватт. Оптический фильтр отсекал свет с длиной волны менее 300 нм. Измеренная интенсивность света составляла 50 мВатт/см². Для определения активности через равные промежутки времени отбирались аликвоты суспензии, после фильтрации опре-

делялось содержание фенола методом ВЭЖХ-УФ на установке 1260 Infinity (Agilent) на колонке C18 (Agilent). В качестве подвижной фазы использовали смесь воды и метанола в равных соотношениях. Детектирование проводили на длине волны 210 нм.

2.2. Элементный состав и распределение частиц по размерам

Распределение частиц по размерам и элементные составы получены на сканирующем электронном микроскопе HITACHI S-3400N с энергодисперсионным спектрометром Oxford X-Max 20 при ускоряющем напряжении 20 кВ, токе зонда 1 нА и времени экспозиции 30 секунд на точку и волнодисперсионным спектрометром Inca Wave 500 при ускоряющем напряжении 20 кВ, токе зонда 10 нА, времени экспозиции $30+15 \times 2$ секунд на элемент. Обработка энергодисперсионных спектров проводилась в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения AzTec Energy. Расчет волнодисперсионных спектров проводился с использованием программного обеспечения Inca Wave с использованием процедуры XPP матричной коррекции. Стандартизация спектрометра проводилась по образцам Ti (99,7%) и Al_2O_3 (99,99%) (Geller Microanalytical Laboratory).

Для получения элементных спектров высокого качества образцы были закреплены на поверхности предметного стекла при помощи двухкомпонентной эпоксидной смолы холодной заливки (Technovit), выдержаны в течение трех суток до полного застывания и последовательно отполированы на алмазных суспензиях уменьшающегося размера вплоть до 0.25 мкм.

3. Результаты и обсуждение

3.1. Результаты исследования образцов методом рентгеновского облучения

Полученные рентгенограммы представлены на рис. 1. Согласно дифракционным данным, первая серия образцов, полученная методом твердофазного синтеза, по данным рентгеновской дифракции состоит из рутила.

Вторая серия образцов, полученная золь-гель-синтезом, в основном состоит из фазы рутила, однако для допированных образцов появляется небольшая примесная фаза со структурой анатаза. Полученные данные согласуются с литературными источниками, в которых описывается влияние алюминия на фазовый переход анатаз-рутил при температурах 650 °С и выше [Grzmil et al, 2007; Sharma et al, 1998; Zhou, Snyder, 1991].

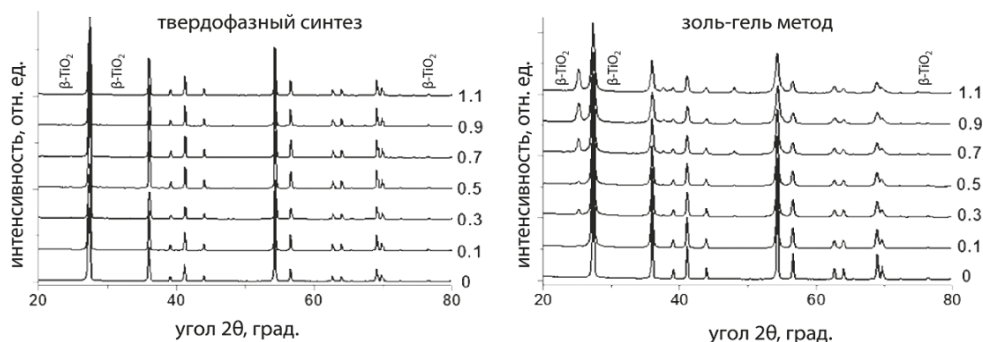


Рис. 1. Дифрактограммы порошкового $\text{Al}_x\text{Ti}_{1-x}\text{O}_2$, полученного твердофазным синтезом (слева) и золь-гель-методом (справа), расположенные в порядке уменьшения концентрации допанта в шихте сверху вниз

3.2. Каталитическая активность образцов при разложении фенола

Для двух синтезированных серий построены зависимости каталитической активности от концентрации допанта. Несмотря на одинаковые концентрации допанта, графики демонстрируют кардинально различное поведение (рис. 2).

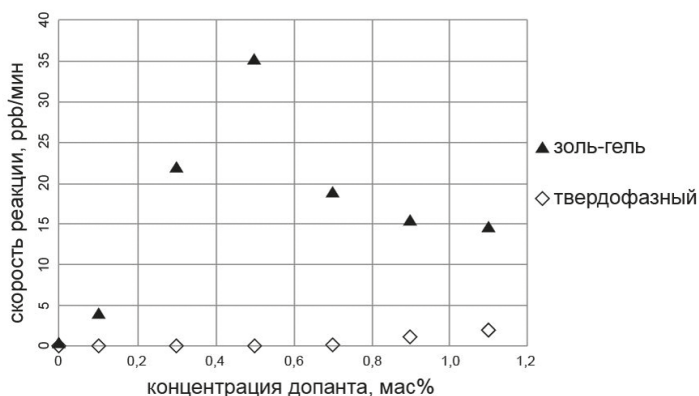


Рис. 2. Скорость реакции разложения фенола на $\text{Al}_x\text{Ti}_{1-x}\text{O}_2$, полученном золь-гель-методом (\blacktriangle) и твердофазным синтезом (\blacklozenge)

3.3. Результаты исследований образцов методами электронной микроскопии

Чтобы объяснить подобное расхождение, порошки были изучены методами электронной микроскопии. Полученные изображения (рис. 3) позволяют различить методы синтеза по виду полученных продуктов и характерному размеру частиц.

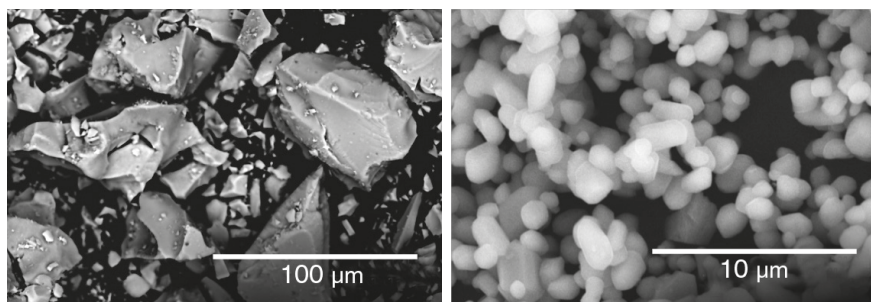


Рис. 3. Микрофотографии частиц допированного алюминием диоксида титана с концентрацией допанта 0,9 %, полученным золь-гель-методом (слева) и твердофазным синтезом (справа)

Оценочные спектры ЭДС были получены с поверхности частиц порошка, малое количество которого было нанесено на углеродный скотч. Полученные составы соответствовали данным по шихте. После этого порошки обеих серий синтеза диоксида титана были закреплены на твердом носителе с помощью эпоксидной смолы и последовательно отполированы на суспензиях, содержащих порошок алмазов с размерами 6, 3, 1 и 0.25 мкм, для выявления внутренней структуры частиц и проведения количественного химического анализа.

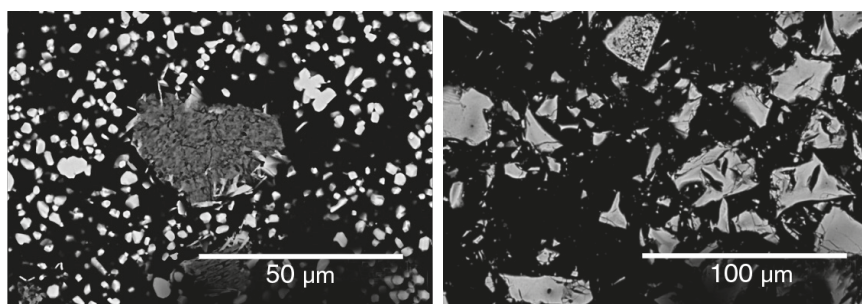


Рис. 4. Микрофотографии частиц допированного алюминием диоксида титана с концентрацией допанта 0,9 %, полученным золь-гель-методом (слева) и твердофазным синтезом (справа)

Для частиц серии полученных методом золь-гель-синтеза частиц обнаружена зональная структура. Середина частицы зачастую имеет меньший средний атомный номер, чем края, что может быть связано с окклюзией алюминия в процессе синтеза, перекристаллизацией диоксида титана при поверхности или изменением локальных концентраций в ходе синтеза. Частицы, полученные твердофазным методом, зональности не обнаруживают, однако в них обнаружена выраженная примесная фаза. Меньшая яркость частиц в режиме обратнорассеянных электронов говорит о меньшем среднем атомном

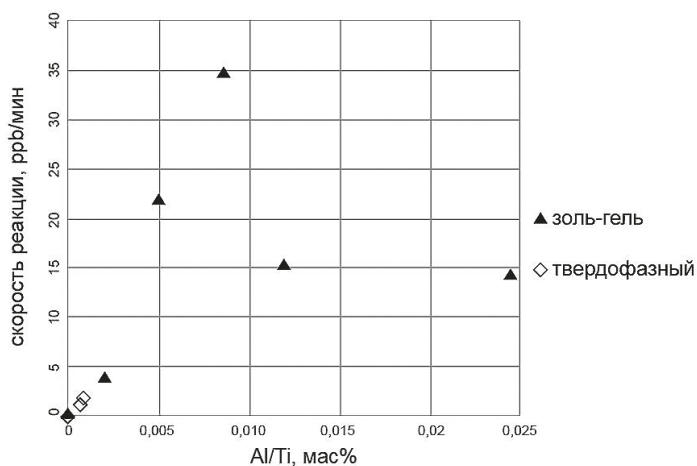


Рис. 5. Скорость реакции разложения фенола на $Al_xTi_{1-x}O_2$, полученным золь-гель-методом (▲) и твердофазным синтезом (◆) в зависимости от доли алюминия, замещающего титан

номере. Проверка методом ЭДС показала, что примесная фаза состоит преимущественно из оксида алюминия, который не входит в состав диоксида титана в ходе синтеза. Для исключения влияния размера частиц на абсолютные значения концентрации допанта графики были построены в координатах ррм/мин — Al/Ti (мас %). Провести точное определение концентрации алюминия в образцах, полученных методом твердофазного синтеза методом ЭДС не удалось, поскольку концентрации допанта находятся на уровне чувствительности метода, в связи с чем применен более ресурсоемкий и длительный метод ВДС, как имеющий более высокую чувствительность. Значения концентраций алюминия, определенных методами ЭДС и ВДС, хорошо согласуются с прямыми измерениями каталитической активности. Полученные данные могут в дальнейшем быть использованы для соотнесения элементных составов и активности фотокатализатора.

Выводы

Проведенные исследования показали, что сканирующая электронная микроскопия с возможностью микроанализа является оптимальным методом определения характеристик катализатора с точки зрения временных затрат и трудоемкости анализа. Полученные данные наглядно демонстрируют отличительные особенности структуры и состава синтезированных частиц. Использование энергодисперсионного спектрометра для микроанализа в методике очистки сточных вод от фенола для определения доли допанта в катализаторе

позволяет увеличить скорость определения качества катализатора на основе диоксида титана, допированного алюминием, что является важным фактором при использовании предлагаемой методики. Применение более трудоемкого волнодисперсионного анализа расширяет возможности методики, однако не является необходимой для поиска оптимального состава фотокатализатора.

Литература

- Беспамятнов Г.П. 1975. *Предельно допустимые концентрации вредных веществ в воздухе и воде*, 2-е изд. Ленинград, Химия.
- Проскураков В. А., Шмидт Л. И. 1977. *Очистка сточных вод в химической промышленности*. Ленинград, Химия.
- Bloh J. Z., Dillert R., Bahnemann D. W. 2012. Designing Optimal Metal-Doped Photocatalysts: Correlation between Photocatalytic Activity, Doping Ratio, and Particle Size. *J. Phys. Chem. C*. 116: 25558–25562.
- Grzmil B., Rabe M., Kic B., Lubkowski K. 2007. Influence of Phosphate, Potassium, Lithium, and Aluminium on the Anatase-Rutile Phase Transformation. *Ind. Eng. Chem. Res.* 46: 1018–1024.
- Kottuparambil S., Kim Y.-J., Choi H., Kim M.-S., Park A., Park J., Shin Han, T., 2014. A rapid phenol toxicity test based on photosynthesis and movement of the freshwater flagellate, *Euglena agilis* Carter. *Aquatic Toxicology* 155: 9–14.
- Magdziarz A., Colmenares J. C., Chernyayeva O., Łomot D., Sobczak K. 2016. Sonication and light irradiation as green energy sources simultaneously implemented in the synthesis of Pd-Fe- and Pt-Fe- doped TiO₂-based photocatalysts. *Journal of molecular catalysis A: Chemical* 425: 1–9.
- Navas J., Iglesias-Arnaiz J.M., Fernández-Lorenzo C., Alcántara R., Blanco G., de los Santos D.M., Sánchez-Coronilla A., Martín-Calleja J. 2014. Synthesis and Characterization of Gel-Derived, Highly Al-Doped TiO₂(Al xTi_{1-x}O_{2-x/2}; x = 0.083, 0.154, 0.2) Nanoparticles: Improving the Photocatalytic Activity. *Sci. Adv. Mater.* 6: 2134–2145.
- Pelaez M., Nolan N. T., Pillai S. C., Seery M. K., Falaras P., Kontos A. G., Dunlop P.S. M., Hamilton J. W. J., Byrne J. A., O'Shea K. et al. 2012. A Review on the Visible Light Active Titanium Dioxide Photocatalysts for Environmental Applications. *Appl. Cat. B: Env.* 125: 331–349.
- de los Santos D.M., Aguilar T., Sánchez-Coronilla A., Navas J., Hernandez N.C., Alcántara R., Fernández-Lorenzo C., Martín-Calleja J. 2014. Electronic and Structural Properties of Highly Aluminum Ion Doped TiO₂ Nanoparticles: A Combined Experimental and Theoretical Study. *Chem. Phys. Chem.* 15: 2267–2280.
- Sharma P.K., Jilavi M. H., Burgard D., Nass R., Schmidt H. 1998. Hydrothermal synthesis of nanosize α -Al₂O₃ from seeded aluminum hydroxide. *J. Am. ceram. soc.* 81: 2732–2734.
- Zhou R.-S., Snyder R.L. 1991. Structures and Transformation Mechanisms of the η , γ and θ Transition Aluminas. *Acta Cryst. B* 47: 617–630.

*Н. А. Зайцев**

РАЗРАБОТКА АЛЬТЕРНАТИВНОЙ МЕТОДИКИ ИНТЕРПРЕТАЦИИ РАДИОЯРКОСТНЫХ ТЕМПЕРАТУР ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПРОФИЛЕЙ ТЕМПЕРАТУРЫ В ТРОПОСФЕРЕ

Наземное микроволновое (МКВ) температурное зондирование тропосферы с помощью аппаратуры RPG-HATPRO, функционирующей на базе ПЦ «Геомодель» Научного парка Санкт-Петербургского государственного университета, позволяет получать оперативную информацию о профилях температуры до высот 3–4 км, если для обработки данных используется алгоритм изготовителя (АИ) аппаратуры (квадратичная регрессия). При этом в пограничном слое погрешности восстановления профилей температуры составляют 1.0–1.5 °К, а в слое 2–4 км возрастают до 2.0–3.5 °К. На высотах более 4 км погрешности восстановленных профилей становятся больше естественных вариаций температуры. Опыт эксплуатации показал, что существуют потенциальные возможности увеличения потолка температурного зондирования и уменьшения погрешностей за счет разработки специализированного алгоритма и процедуры обработки, включающих особенности конкретного прибора и условия эксперимента.

Альтернативный алгоритм восстановления температурных профилей по методу множественной линейной регрессии восстанавливает температурный профиль до 2 км не хуже оперативного (разница между рассогласованиями алгоритма изготовителя и альтернативного алгоритма по методу множественной линейной регрессии составляет ~0.5 °К по среднеквадратическому отклонению); свыше 2 км альтернативный алгоритм по методу множественной линейной регрессии восстанавливает температурный профиль лучше оперативного (рассогласования альтернативного алгоритма по методу множественной линейной регрессии меньше рассогласования алгоритма изготовителя на ~5–6 °К по среднеквадратическому отклонению).

* Ресурсный центр «Геомодель», Научный парк СПбГУ.

1. Введение

Методы дистанционного зондирования атмосферы на основе измерений микроволнового излучения развиваются с середины прошлого века, в том числе методы термического зондирования с использованием измерений в полосе кислорода 50–60 ГГц [Наумов, 1999; Караштин, 2009]. Достигнуты значительные успехи как в теоретических исследованиях, включающих усовершенствование алгоритмов решения обратных задач, так и в экспериментальных исследованиях, направленных на уточнение спектроскопической информации по поглощению МКВ-излучения кислородом и создание современной высоко-точной автоматизированной аппаратуры.

В 2012 году на базе Научного парка Санкт-Петербургского государственного университета в РЦ «Геомодель» началась эксплуатация микроволнового радиометра RPG-HATPRO производства немецкой компании RadiometerPhysicsGmbH (Интернет-ресурс1). В основе принципа работы прибора лежит регистрация радиоярких температур собственного излучения атмосферы в 14 каналах. Радиометр имеет 7 каналов в области полосы поглощения кислорода 0.5 см и 7 каналов в области линии поглощения водяного пара 1.35 см и предназначен для определения профилей температуры и влажности в тропосфере, а также водозапаса облаков в автоматическом непрерывном режиме.

Определение профилей температуры на первом этапе осуществлялось с помощью программного обеспечения, предоставляемого изготовителем аппаратуры RPG-HATPRO (HumidityAndTemperaturePROfiler).

Целями настоящей работы являются:

1. Оценки и анализ погрешностей определения профилей температуры в тропосфере при использовании программного обеспечения изготовителя аппаратуры RPG-HATPRO при сравнении полученных значений профилей температуры с радиозондовыми данными (станция радиозондирования в поселке Воейково Ленинградской области).
2. Разработка альтернативной методики интерпретации радиоярких температур для восстановления профилей температуры в тропосфере.

Исследования подобного рода выполнялись ранее в Западной Европе: в работе [Lohnert, 2012] получены оценки погрешностей определения профилей температуры в тропосфере по измерениям МКВ-излучения аппаратурой RPG-HATPRO на измерительной станции Payerne в Швейцарии. Эти оценки были получены при сравнении с радиозондовыми значениями профилей температуры в течение около 3.5 лет наблюдений. В упомянутой работе использовался алгоритм, подобный АИ, но уточненный авторами работы и адаптированный к конкретному экземпляру радиометра.

2. Описание стандартной методики



Рис. 1. Внешний вид аппаратуры RPG-HATPRO, установленной на крыше здания

Технические характеристики микроволнового радиометра RPG-HATPRO представлены на сайте разработчика, там же доступны для загрузки руководства по установке, эксплуатации и проведению измерений [4]. Центральные частоты и значения полуширины так называемых температурных каналов радиометра RPG-HATPRO представлены в табл. 1.

Таблица 1. Центральные частоты f и полуширина Δf температурных и влажностных каналов аппаратуры RPG-HATPRO

Влажностные	1	2	3	4	5	6	7
f [GHz]	22.24	23.04	23.84	25.44	26.24	27.84	31.4
Δf [MHz]	230	230	230	230	230	23	230
Температурные	8	9	10	11	12	13	14
f [GHz]	51.26	52.28	53.86	54.94	56.66	57.30	58.00
Δf [MHz]	230	230	230	230	600	1000	2000

Прибор работает круглосуточно и непрерывно, измерения осуществляются в двух режимах. В основном режиме измеряется интенсивность нисходящего МКВ-излучения в зенитном направлении — выдача данных 1 раз в 2 секунды. Дополнительный режим включается периодически (1 раз в 20 минут), в этом режиме производится угловое сканирование. Дополнительный режим

предназначен для повышения точности определения температуры и влажности в пограничном слое атмосферы. Такая комбинация режимов работы рекомендована изготовителем прибора и позволяет заметно увеличить информативность МКВ-измерений относительно профилей температуры и влажности.

Алгоритм изготовителя (АИ) радиометра RPG-HATPRO, который используется в аппаратуре, основан на методе квадратичной регрессии (в принципе, изготовителем также предусмотрены алгоритмы на основе линейной регрессии и нейронных сетей, но в нашем случае они отсутствуют). Настройка алгоритма осуществляется изготовителем в следующей последовательности:

- 1) создается банк данных радиозондирования, включающий измерения в течение нескольких лет на станции радиозондирования, ближайшей к планируемой точке установки аппаратуры заказчиком;
- 2) для различных состояний атмосферы, описываемых данными радиозондирования, а также модельными значениями влажности облаков, рассчитываются значения яркостной температуры в каналах прибора на основе радиационной модели атмосферы в МКВ-области спектра;
- 3) вычисляются коэффициенты квадратичной регрессии для измеренных яркостных температур и показаний с приземных датчиков (давление, температура, относительная влажность).

АИ был настроен на основе результатов радиозондирования в поселке Воейково (Ленинградская область, 50 км от точки описываемых МКВ-измерений) в период, предшествующий 2012 году.

3. Краткий анализ точности восстановления температурных профилей с использованием алгоритма интерпретации изготовителя

В настоящей работе для сравнения с результатами МКВ-зондирования были взяты данные радиозондирования с метеорологической станции в поселке Воейково для периода времени начиная с июня 2012 года, с момента запуска в эксплуатацию прибора. Данные радиозондирования загружались из банка данных университета штата Вайоминг [Интернет-ресурс 2].

В настоящей работе используется три величины для количественного описания расхождений между МКВ и радиозондовыми данными по температуре на заданной высоте. Среднее рассогласование:

$$M = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - y_i),$$

среднеквадратическое рассогласование:

$$S = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - y_i)^2}$$

и стандартное отклонение от среднего рассогласования:

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - y_i - M)^2},$$

где N — количество пар сопоставляемых значений температуры, x и y — МКВ- и радиозондовые значения температуры на заданной высоте соответственно. Если принять радиозондовые данные в качестве эталонных, то величина M характеризует систематическую погрешность МКВ-измерений профиля температуры, S характеризует полную погрешность, а σ — погрешность без систематической составляющей.

Следует отметить, что точность радиозондовых измерений существенно лучше МКВ-измерений. В данной работе рассогласования между результатами МКВ-измерений и результатами радиозондирования будем называть погрешностями. В качестве эталонных измерений выбраны измерения радиозонда.

Обратимся к таблице 2, в которой представлены периоды измерений, для которых выполнялись сопоставления с радиозондовыми данными, даты калибровок с использованием жидкого азота в качестве «холодной нагрузки» и значения среднеквадратического рассогласования S на различных высотах. Калибровки с использованием жидкого азота в качестве «холодной нагрузки» выполнялись 3 раза: перед запуском прибора в эксплуатацию и затем через 8 и 12 месяцев. В течение анализируемого периода работы прибора значения среднеквадратического отклонения профиля температуры от радиозондовых данных находились в пределах 1.1-2.0°K на высоте 0.5 км, 1.2-2.0°K на высоте 1.5 км и 1.8-2.4°K на высоте 2.5 км. Из табл. 2 видно, что погрешности заметно уменьшились после калибровки в конце зимы 2012 г. Влияние калибровки иллюстрируют две последние строки таблицы, в которых даны погрешности, полученные непосредственно перед калибровкой и после нее (февраль и март 2013 г.). После проведения калибровки погрешности на высоте 0.5 км уменьшились на 0.4°K, а на высотах 1.5 км и 2.5 км на 0.7°K и 1.0°K соответственно.

Рис. 2, а демонстрирует зависимость от высоты различных характеристик рассогласований между МКВ- и радиозондовыми измерениями для периода весна-2013. Показан высотный диапазон 0–10 км, поскольку такой диапазон определения профилей температуры заявлен изготовителем аппаратуры. Показанная зависимость является типичной для всех периодов проведения МКВ-измерений в СПбГУ с июня 2012 года. Величина среднего рассогласования M

Таблица 2. Периоды измерений, для которых выполнялись сопоставления с радиозондовыми данными, даты калибровок и значения среднеквадратического рассогласования S на различных высотах

Название периода	Время	Даты калибровки с использованием жидкого азота	Среднеквадратическое рассогласование S (градусы, К) на высоте:		
			0.5 км	1.5 км	2.5 км
Лето-2012	1 июня — 31 августа 2012	31.05.2012	1.2	1.5	1.8
Осень-2012	1 сентября — 30 ноября 2012	-	1.1	1.6	2.4
Зима-2012	1 декабря 2012 — 28 февраля 2013	18.02.2013	2.0	2.0	2.0
Весна-2013	1 марта — 31 мая 2013	-	1.2	1.2	2.0
Лето-2013	1 июня — 31 августа 2013	03.06.2013	2.0	1.5	2.3
Февраль-2013	15 января — 13 февраля 2013	18.02.2013	1.2	1.9	3.0
Март-2013	1–31 марта 2013	-	0.8	1.2	2.0

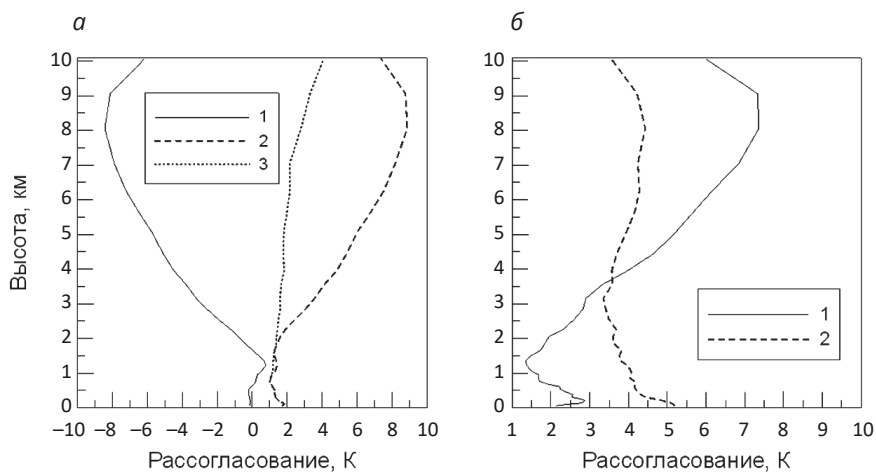


Рис. 2. Сравнение МКВ- и радиозондовых значений температуры в период весна-2013 (1 — M , 2 — S , 3 — σ) (а) и сравнение рассогласования S (1) с величиной естественной изменчивости температуры (2) в период лето-2013 (б)

близка к нулю и не превышает 1°K до высоты ~ 1.2 км, затем величина M достаточно быстро растет по абсолютной величине и достигает $\sim 5^\circ\text{K}$ на высоте 4 км и $\sim 8^\circ\text{K}$ на высоте 8–9 км. Среднеквадратическое рассогласование S составляет $1\text{--}2^\circ\text{K}$ примерно до высоты 2 км, затем постоянно растет, достигая 8.5°K на высоте 9 км. Погрешность без систематической составляющей (σ) близка к полной погрешности S до высоты 2 км. Как видно из рис. 2, а, для высот, превышающих 2 км, наблюдается незначительное увеличение значений σ по сравнению с увеличением значений S , что свидетельствует о существенном вкладе систематической составляющей погрешности.

Рис. 2, б иллюстрирует реальную информативность МКВ-измерений на различных высотах. С учетом высокую точность измерений температуры в тропосфере радиозондом (менее 0.5°K) на рисунке сравниваются естественные среднеквадратические вариации температуры в период лето-2013, рассчитанные по радиозондовым данным на различных высотах, с величиной СКО (S) МКВ-измерений температуры. Принято считать, что если погрешность МКВ-метода равна или превышает естественные вариации исследуемого параметра, то дистанционный метод не несет (не доставляет) никакой новой информации.

Из рис. 2, б видно, что на уровне около 3.5 км они становятся равными, а выше 3.5 км погрешности определения температуры с помощью МКВ-измерений больше естественной изменчивости температуры. Отметим, что в этот сезон естественные вариации температуры составляли примерно 4°K .

4. Построение альтернативного алгоритма восстановления температурных профилей по методу множественной линейной регрессии

Для того чтобы получить более точную информацию о профиле температуры в тропосфере, был разработан альтернативный алгоритм интерпретации радиоярких температур, регистрируемых аппаратурой RPG-NATPRO, а именно алгоритм множественной линейной регрессии, использующий радиозондовые измерения и измерения спектров радиоярких температур аппаратурой RPG-NATPRO. Преимущество такого подхода состоит в том, что для него не требуется расчет точной радиационной модели атмосферы и точное задание спектральных характеристик конкретного прибора.

В основе решения обратных задач, при отсутствии информации об операторе \mathbf{A} , лежит предположение, что искомые величины $\vec{\phi}$ могут быть найдены с помощью некоторого линейного преобразования измеряемых величин:

$$\vec{\phi} = \mathbf{R} \vec{f},$$

где \mathbf{R} — некоторая неизвестная и, следовательно, подлежащая определению матрица (решающий оператор). Таким образом, первым этапом построения решения на основе регрессионного подхода является построение решающего оператора \mathbf{R} . Решение этой задачи возможно при наличии статистического ансамбля пар векторов $\vec{\phi}$ и \vec{f} , причем каждая пара этих векторов в общем ансамбле должна удовлетворять условию пространственно-временной синхронизации. Это означает, что нужно прежде всего сформировать статистический ансамбль одновременных измерений характеристик излучения \vec{f} и независимых измерений искомого параметра физического состояния атмосферы $\vec{\phi}$ (температуры и влажности, измеряемых радиозондом на станции Воейково), согласованных во времени и пространстве. Оператор \mathbf{R} ищется в виде $R = K_{\phi f} K_f^{-1}$, где

$$\mathbf{K}_{\phi} = \left\{ k_{\phi i,j} \right\}_{\substack{i=1,n \\ j=1,n}};$$

$$k_{\phi i,j} = \frac{1}{l-1} \sum_{s=1}^l (\phi_{si} - \bar{\phi}_i)(\phi_{sj} - \bar{\phi}_j);$$

$$\mathbf{K}_f = \left\{ k_{f i,j} \right\}_{\substack{i=1,m \\ j=1,m}};$$

$$k_{f i,j} = \frac{1}{l-1} \sum_{s=1}^l (f_{si} - \bar{f}_i)(f_{sj} - \bar{f}_j);$$

$$\mathbf{K}_{\phi f} = \left\{ k_{\phi f i,j} \right\}_{\substack{i=1,n \\ j=1,m}};$$

$$k_{\phi f i,j} = \frac{1}{l-1} \sum_{s=1}^l (\phi_{si} - \bar{\phi}_i)(u_{sj} - \bar{u}_j).$$

Здесь K_f — ковариационная матрица измеренных векторов f радиояркостных температур, $K_{\phi f}$ — взаимоквариационная матрица температуры атмосферы (или влажности), f , u — радиояркостные температуры нисходящего МКВ-излучения; $\bar{\phi}$ и \bar{f} , \bar{u} — средние значения температуры (или влажности) радиозонда и радиояркостной температуры.

Тогда решение можно представить в виде

$$\tilde{\phi} = \bar{\phi} + R(f - \bar{f}),$$

$\tilde{\phi}$ — искомый вектор температуры тропосферы.

Также следует учесть погрешность измерения в каждом канале, для этого к ковариационной матрице K_f нужно добавить матрицу ошибок, состоящую из диагональных элементов. Каждый элемент матрицы ошибок соответствует

квадрату погрешности в соответствующем канале. Для влажностных каналов погрешность — 0.1 °К, для температурных — 0.2 °К.

5. Анализ точности восстановления температурных профилей при использовании методики множественной линейной регрессии

Для примера были рассчитаны решающие операторы \mathbf{R} на основе измеренных радиоярких температур для двух различных режимов наблюдений (зенит и зенит + угловое сканирование). В качестве обучающего массива был выбран период весна-2013. Теперь, при помощи оператора \mathbf{R} , можно восстановить высотный профиль температуры и сосчитать отклонения восстановленных температур от радиозонда.

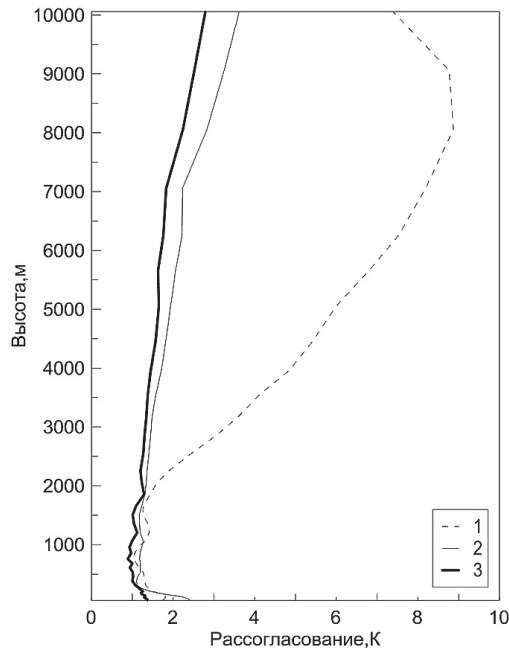


Рис. 3. Среднеквадратическое рассогласование (S) для профиля температуры за период весна-2013: 1 — по алгоритму изготовителя, 2 — по методике линейной регрессии для режима наблюдения «зенит», 3 — по методике линейной регрессии для режима наблюдения «зенит + угловое сканирование».

Анализируя рис. 3, можно заметить, что все методики в диапазоне 0–2 км дают довольно близкие результаты, за исключением методики 3, которая за-

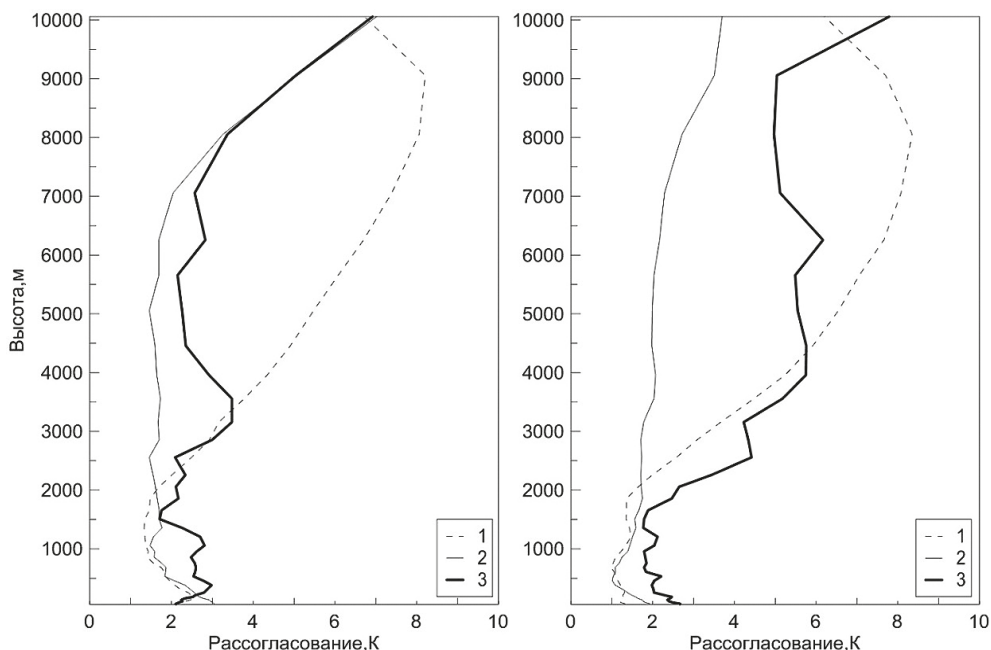


Рис. 4. Среднеквадратическое рассогласование (S) для профиля температуры за период лето-2013 (слева) и осень-2013 (справа): 1 — по алгоритму изготовителя, 2 — по методике линейной регрессии для режима наблюдения «зенит», 3 — по методике линейной регрессии для режима наблюдения «зенит + угловое сканирование»

метно точнее у поверхности земли. До высоты 2 км рассогласование по температурным профилям для 3 методик не превышает 1.5°K . Выше этой отметки методика 2 дает рассогласование $1.3\text{--}3.6^{\circ}\text{K}$ в диапазоне высот 2–10 км, методика 3 дает рассогласование $1.2\text{--}2.8^{\circ}\text{K}$ в диапазоне высот 2–10 км, в отличие от методики 1, которая дает рассогласование $1.5\text{--}8.5\text{ K}$ в диапазоне высот 2–10 км. Также можно отметить уменьшение рассогласования в приповерхностном слое с 2.4°K до 1.4°K при использовании режима «зенит + угловое сканирование».

Для анализа универсальности построенного обратного оператора определим погрешности для других периодов измерений, а именно для периодов лето-2013 и осень-2013.

Из рис. 4 видно, что методика 3 показывает большее рассогласование по температуре в сравнении с методикой 2. Это обусловлено тем, что для методики 3 недостаточно брать в качестве обучающего ансамбля столь малый период времени (3 месяца), так как за этот период не успевает накопиться достаточной статистической информации в обучающем массиве данных об изменчивости состояния атмосферы. Что касается методики 2 и ее универсальности по сезонам, то ее можно пронаблюдать на рис. 4.

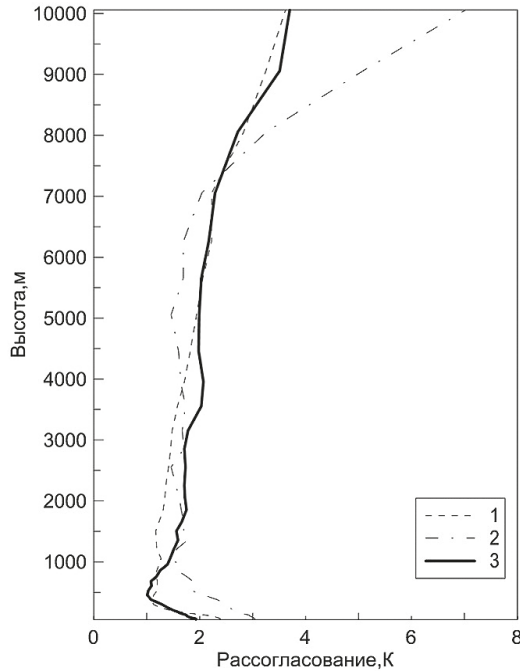


Рис. 5. Среднеквадратическое рассогласование (S) для профиля температуры по методике линейной регрессии для режима наблюдения «зенит»: 1 — за период весна-2013, 2 — за период лето-2013, 3 — за период осень-2013

Рис. 5 показывает, что до высоты 7 км рассогласование между высотными профилями температуры, восстановленными по методике линейной регрессии для режима наблюдения «зенит», за рассмотренные периоды времени не превышает 0.5 К — 1.0 К.

Заключение

1. Разработанный альтернативный алгоритм по методу множественной линейной регрессии восстанавливает температурный профиль до 2 км не хуже оперативного (разница между рассогласованиями алгоритма изготовителя и альтернативного алгоритма по методу множественной линейной регрессии составляет $\sim 0.5^\circ\text{K}$ по среднеквадратическому отклонению); выше 2 км альтернативный алгоритм по методу множественной линейной регрессии восстанавливает температурный профиль лучше оперативного (рассогласования альтернативного алгоритма по методу множественной линейной регрессии

меньше рассогласования алгоритма изготовителя на $\sim 5\text{--}60\text{K}$ по среднеквадратическому отклонению).

2. На основе полученных результатов можно сделать вывод, что разработанный альтернативный алгоритм множественной линейной регрессии может быть использован для массовой обработки данных МКВ радиометра RPG-НАТПРО, а, именно, для восстановления температурных профилей в тропосфере.

Литература

Наумов А. П., Ошарина Н. Н., Троицкий А. В. 1999. Наземное термическое зондирование атмосферы в микроволновом диапазоне. *Изв. Вузов. Радиофизика* 42(1): 45–59.

Караштин Д. А., Мухин Д. Н., Скалыга Н. К., Фейгин А. М. 2009. Байесов подход к восстановлению вертикального профиля температуры стратосферы по данным наземных измерений солнечного излучения в миллиметровых линиях поглощения молекулярного кислорода. *Известия ВУЗов. Радиофизика* 52(10): 785–794.

Караштин Д. А., Мухин Д. Н., Скалыга Н. К., Фейгин А. М. 2009. Восстановление вертикального профиля температуры стратосферы по данным наземных измерений спектра собственного излучения атмосферы в миллиметровых линиях поглощения молекулярного кислорода. *Известия РАН. Серия физическая* 73(12): 1750–1755.

Интернет-ресурс 1. RadiometerPhysicsGmbH. URL: <http://www.radiometer-physics.de/rpg/html/Home.html>

Интернет-ресурс 2: University of Wyoming. College of Engineering. Department of Atmospheric Science. Weather. URL: <http://weather.uwyo.edu/upperair/sounding.html>

Lohnert U., Maier O. 2012. Operational profiling of temperature using ground-based microwave radiometry at Payerne: prospects and challenges. *Atmos. Meas. Tech.* 5: 1121–1134.

*И. В. Токарев**, *В. И. Батуев***,
*П. К. Коносовский****, *И. А. Крайнюкова*****,
*М. Л. Марков******

СПОСОБ РАСЧЕТА СОСРЕДОТОЧЕННОГО ИНФИЛЬТРАЦИОННОГО ПИТАНИЯ ПОДЗЕМНЫХ ВОД ПО ДАННЫМ О РАСПРЕДЕЛЕНИИ ДЕЙТЕРИЯ И КИСЛОРОДА-18

1. Введение

Болотные и озерные угодья являются важным элементом гидролого-гидрогеологической сети, регулирующим водный баланс территорий за счет задержки стока и повышенной эвапотранспирации. Для подземных вод озёра и болота могут играть как роль стоков, так и питающих границ. Последнее, как правило, относится к верховым болотам, для которых одновременно величина потерь на инфильтрацию является одним из наиболее трудно учитываемых параметров.

Для оценки инфильтрационных потерь используют балансовый подход, опирающийся на достаточно длинные ряды наблюдений за атмосферными осадками (включая снеговую съёмку), уровнями подземных вод, поверхностным стоком и сопровождающийся расчетом и/или измерением потерь на эвапотранспирацию [Иванов, 1975; Branfireun, Roulet, 1998; Dam, Feddes, 2000; Wells et al., 2017]. Указанный подход трудоемок, требует много времени и, несмотря на это, остается недостаточно точным. Кроме того, климатические изменения последних десятилетий существенно изменили как характеристики,

* Ресурсный центр «Рентгенодифракционные методы исследования», Научный парк СПбГУ.

** ГУП «Государственный гидрологический институт».

*** Институт наук о Земле СПбГУ.

**** Ресурсный центр «Рентгенодифракционные методы исследования», Научный парк СПбГУ.

***** ГУП «Государственный гидрологический институт».

контролирующие физическое испарение, так и залесенность водосборов, что делает невозможным применение многих ранее полученных оценок параметров, статистических моделей, а во многих случаях также и метода объектов-аналогов.

Неоднократно предпринимались попытки использовать косвенные данные, например распределение температур по глубине зоны аэрации и донных отложений [Gosselin et al., 2016], другие физические сигналы [Манштейн, 2002], а также дистанционные данные [Kite, Droogers, 2000; Ruhoff et al., 2013] для оценки элементов водного баланса и инфильтрационного питания. Однако эти методы, в свою очередь, требуют калибровки по рядам прямых наблюдений, что делает их недостаточно экспрессными и точными.

Вероятнее всего, наиболее правильным и универсальным подходом является расширение возможностей стандартных гидрологических и гидрогеологических методов за счет привлечения изотопно-гидрохимической информации.

При изучении водных объектов наиболее полезны тяжелые изотопы водорода и кислорода — дейтерий (^2H), кислород-18 (^{18}O) и тритий (^3H), входящие в молекулу воды. Униформный вид входного сигнала в атмосферных осадках, интегральный характер сигнала-отклика в водных объектах, а также закономерное изменение соотношений между ^2H и ^{18}O при испарении/конденсации и замерзании, позволяют развивать количественные модели, не требующие учета большого числа параметров, при этом отбор проб прост, а современная аппаратная база позволяет выполнять массовые анализы относительно дешево [Arnoux et al., 2017; Bowen et al., 2011; Environmental..., 2001; Ferronsky, Polyakov, 2012; Gibson et al., 1996; Ladouche et al., 2001; Levy et al., 2014; Perras, 2016; Price et al., 2009; Richey et al., 1998].

Санкт-Петербургский государственный университет (СПбГУ) совместно с Государственным гидрологическим институтом (ГГИ, Росгидромет) разрабатывает комбинированную методику изучения водного баланса, включая оценку инфильтрационного питания подземных вод на территории болотных угодий. Подход основывается на стандартных методах, которые дополняются данными о дейтерии и кислороде-18, а также численным моделированием.

Предлагаемый способ расчета инфильтрационного питания предполагает проведение относительно коротких наблюдений за уровнями и изотопным составом болотных и грунтовых вод. В предельном случае, по-видимому, могут быть использованы данные одноразового опробования. На основании этих наблюдений и данных о гидрогеологическом строении участка строится математическая (численная) модель объекта, позволяющая рассчитать пространственное распределение величины инфильтрационного питания.

В данной работе указанная методика иллюстрируется примером ее использования на полигоне ГГИ — Ламмин-Суо (болотный массив в 7 км се-

вернее г. Зеленогорск, Ленинградская обл.) [Новиков, 2010]. Полигон организован в 1946 г. Государственным гидрологическим институтом для изучения условий функционирования болотных массивов и их роли в гидролого-гидрогеологическом режиме северо-запада России. На полигоне ведутся наблюдения за гидрохимическим, гидрологическим и гидрогеологическим режимом [Рождественская, 1973]. Несмотря на уникально длинные ряды наблюдений, ответы на некоторые вопросы относительно количественной оценки составляющих водного баланса болота Ламмин-Суо и значимости отдельных процессов для его формирования остаются нерешенными. Особенно это заметно в связи с климатическими изменениями, которые, как известно, существенно повлияли на ряд гидрометеорологических характеристик, величину эвапотранспирации, режим весеннего снеготаяния, последующего половодья и другие параметры, что не позволяет использовать расчеты ранее установленных статистических закономерностей, связывающих эти параметры.

Решить указанные вопросы планировалось на основании дополнительной количественной информации, получаемой с использованием ранее не применявшихся на данном объекте видов работ и методов. Стандартные гидрометрические наблюдения были дополнены опытно-фильтрационным опробованием всего фонда скважин на болотный и грунтовый горизонты. С 2012 г. на полигоне выполняется мониторинг изотопного состава атмосферных осадков, а также регулярное опробование поверхностных вод, болотного и грунтового горизонтов. Поставлены эксперименты по оценке влияния испарения на изотопный состав воды остаточной воды. Для уточнения величины инфильтрационного питания и условий подземного водообмена построена численная модель объекта.

2. Теория и методы

Методы измерений

Природные изменения концентраций дейтерия и кислорода-18 в воде, снеге и льдах невелики, поэтому для удобства их выражают в промилле относительно стандарта:

$$\delta^{18}\text{O}_{\text{образца}} = \frac{(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_{\text{образца}} - (^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_{\text{стандарта}}}{(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_{\text{стандарта}}} \times 1000\text{‰},$$

$$\delta^2\text{H}_{\text{образца}} = \frac{(^2\text{H}/^1\text{H})_{\text{образца}} - (^2\text{H}/^1\text{H})_{\text{стандарта}}}{(^2\text{H}/^1\text{H})_{\text{стандарта}}} \times 1000\text{‰}.$$

За начальный состав влаги в атмо- и гидросфере принята океаническая* вода, из которой приготовлен реперный стандарт — Standard of Mean Ocean Water (SMOW). Содержание изотопов кислорода в SMOW [Hagemann et al., 1970]:

$$^{16}\text{O} — 99,763 \%, \ ^{17}\text{O} — 0,0375 \%, \ ^{18}\text{O} — 0,19995 \%;$$

$$^1\text{H} — 99,985 \%, \ ^2\text{H} — 0,01558 \%,$$

или в отношениях (см. формулы выше):

$$^{18}\text{O}/^{16}\text{O} = (2005,20 \pm 0,45) \times 10^{-6};$$

$$^2\text{H}/^1\text{H} = (155,76 \pm 0,05) \times 10^{-6}.$$

Содержание наиболее легкого изотополога воды ($^1\text{H}_2^{16}\text{O}$) в SMOW составляет 997,0325 г/кг.

В данной работе измерения содержаний дейтерия и кислорода-18 производились на лазерном инфракрасном спектрометре Picarro L2120-i в режиме высокой производительности. В качестве стандартов использовались V-SMOW2, GISP, SLAP, USGS-45 USGS-46. Ошибка измерений составляла $\pm 0,1 \text{ ‰}$ по $\delta^{18}\text{O}$ и $\pm 1 \text{ ‰}$ по $\delta^2\text{H}$. Результаты измерений, как это общепринято, приведены относительно SMOW.

Дейтерий и кислород-18 в атмосферных осадках

Основой для интерпретации результатов определения изотопного состава подземных и поверхностных вод являются данные о содержаниях дейтерия и кислорода-18 в атмосферных осадках. В системе «атмосфера — поверхность», как правило, имеет место равновесное изотопное фракционирование при переходах пар \leftrightarrow вода \rightarrow лед. При фракционировании между фазами происходит перераспределение дейтерия и кислорода-18, подчиняющееся простому правилу: тяжелые изотопы накапливаются в более конденсированной фазе. То есть дейтерий и кислород-18 накапливаются в воде при испарении/конденсации и во льду при замерзании.

Степень изотопного фракционирования зависит прежде всего от температуры, что обуславливает закономерное распределение изотопного состава атмосферных осадков во времени и пространстве, которое на диаграмме $\delta^{18}\text{O} \div \delta^2\text{H}$ аппроксимируется прямой, называемой *глобальной линией метеорных вод* (ГЛМВ, рис. 1).

* Океаническая вода используется потому, что это самый большой и хорошо перемешанный водный резервуар на Земле.

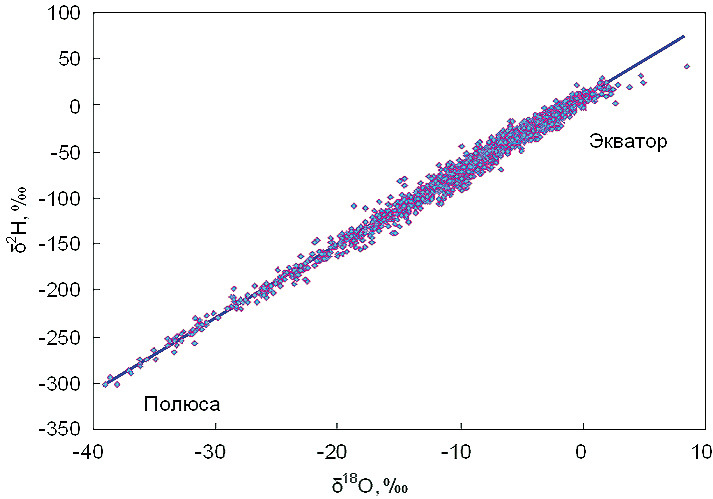


Рис. 1. Глобальная линия метеорных вод (—). Для построения использовано около 5500 среднемесячных анализов (●) (база данных GNIP IAEA [электронный ресурс 2])

Классическое уравнение ГЛМВ имеет вид [Craig, 1961], [Dansgaard, 1964]

$$\delta^2\text{H} = 8 \times \delta^{18}\text{O} + 10 \text{ ‰} \quad (1а)$$

Коэффициенты уравнения многократно уточнялись, например, [Yurtsever, Gat, 1981]:

$$\delta^2\text{H} = (8,17 \pm 0,08) \times \delta^{18}\text{O} + (6,03 \pm 3,08), \quad (1б)$$

или [Araguas-Araguas et al., 2000]:

$$\delta^2\text{H} = (8,17 \pm 0,06) \times \delta^{18}\text{O} + (10,35 \pm 0,65) \text{ при осреднении по годам}, \quad (1в)$$

$$\delta^2\text{H} = (7,96 \pm 0,02) \times \delta^{18}\text{O} + (8,86 \pm 0,17) \text{ при осреднении по месяцам}. \quad (1г)$$

В пределах ГЛМВ изотопный состав осадков имеет характерные распределения. Изотопически тяжелые* осадки выпадают в районе экватора, в прибрежных и низменных областях материков (область «тепло, экватор, долины»; см. рис. 2). Легкие осадки формируются вблизи полюсов, в горах и ближе к центру материков (область «холодно, полюса, горы»; см. рис. 2).

Из ГЛМВ, а также как из лабораторных экспериментов по изучению фракционирования при фазовых переходах в равновесных условиях следует, что изотопный состав осадков является функцией температуры воздуха. Соответ-

* Термины «тяжелый», «утяжеление» означают накопление дейтерия и кислорода-18, а «легкий» и «облегчение» — их потерю.

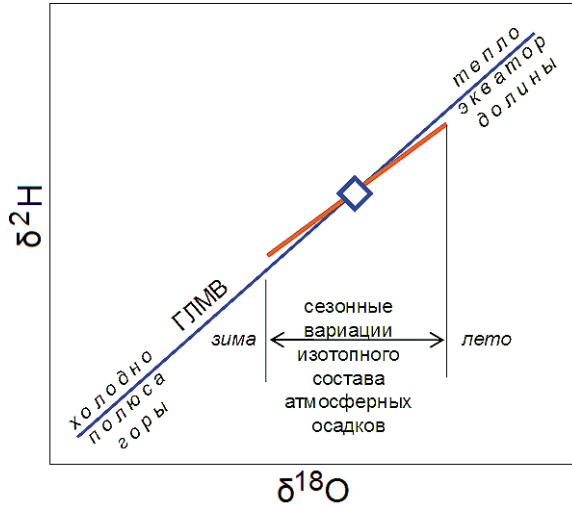


Рис. 2. Изотопный состав атмосферных осадков в различных обстановках: — ГЛМВ (глобальная линия метеорных вод); — сезонные вариации и \diamond — среднегодовой изотопный состав атмосферных осадков в точке наблюдений

ственно, изотопный состав осадков изменяется в пространстве (полюса — экватор) и во времени (по сезонам года; см. рис. 2.). Фактически для каждого исследуемого региона необходимо экспериментально устанавливать локальную линию метеорных вод (ЛЛМВ) вследствие региональных особенностей циркуляции воздушных масс и формирования осадков. Изотопный состав среднемесячных осадков над территорией России за 1969–2009 гг. описывается уравнением (рис. 3)

$$\delta^2\text{H} = 7,62 \times \delta^{18}\text{O} + 3,81 \quad (R^2 = 0,941).$$

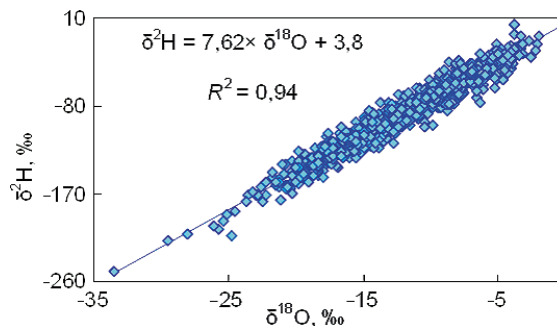


Рис. 3. Изотопный состав осадков над территорией северной Евразии в 1969–2009 гг. (база данных GNIP IAEA [электронный ресурс 2])

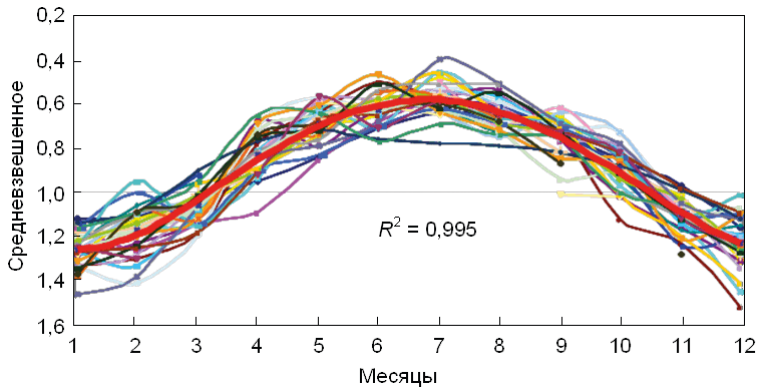


Рис. 4. Многолетние среднемесячные величины $\delta^{18}\text{O}$ в атмосферных осадках над территорией России в 1969–2009 гг. по 23 станциям наблюдений (база данных *GNIP IAEA* [электронный ресурс 2]). Тонкие цветные кривые — взвешенные на многолетнее среднегодовое по станциям на территории России, толстая красная кривая — среднее из всех данных, R^2 — точность аппроксимации

Сезонные вариации $\delta^2\text{H}$ и $\delta^{18}\text{O}$ во всех точках наблюдений носят однотипный характер (рис. 4), осредняющая кривая имеет $R^2 = 0,995$ (жирная красная кривая на рис. 4). Изменение во времени начальных концентраций дейтерия и кислорода-18 в атмосферных осадках, питающих водные объекты на континентах (входная функция), описываются квазисинусоидальной функцией.

Наиболее изотопически тяжелые осадки выпадают, как правило, в июле. Амплитуда сезонных вариаций достигает $\pm 40\%$ относительно арифметического среднегодового. На северных станциях и станциях с континентальным климатом амплитуда больше, чем на южных и приморских станциях, в соответствии с большей амплитудой температур.

В отдельных точках наблюдений возможно преобладание того или иного типа циклонической активности (или чередование типов от сезона к сезону), в результате чего формируется локальная линия метеорных вод (ЛЛМВ). Эта линия обычно не совпадает с ГЛМВ, однако среднегодовой взвешенный состав, как правило, лежит около ГЛМВ. Пример годового хода абсолютных значений изотопного состава осадков для континентальной и приморской станции приведен на рис. 5.

Для равнинных районов ЕТР уравнение ЛЛМВ может быть приближенно рассчитано по уравнению [Поляков, Колесникова, 1978]:

$$\delta^2\text{H} = 6 \times \delta^{18}\text{O} + (1,2 \times t - 24) \text{‰}, \quad (2)$$

где t — среднегодовая температура воздуха в точке наблюдения, $^\circ\text{C}$.

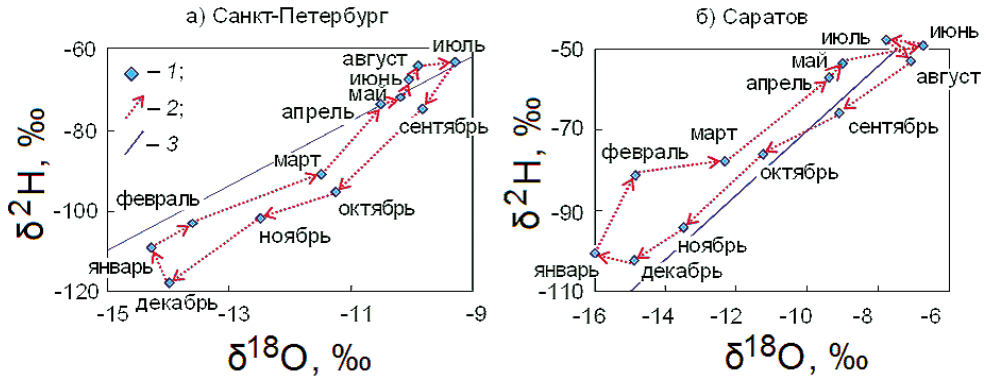


Рис. 5. Годовой ход изотопного состава атмосферных осадков на приморской (а — Санкт-Петербург) и континентальной (б — Саратов) станциях (база данных GNIP IAEA [электронный ресурс 2]): 1 — средний изотопный состав осадков по месяцам; 2 — межмесячные тренды изменения изотопного состава; 3 — ГЛМВ

Грубая оценка среднегодовых и среднемесячных изотопных составов осадков может быть также выполнена с помощью On-line Isotope in Precipitations Calculator (OIPC), руководитель проекта — проф. Габриэль Боуэн (Gabriel Bowen): http://wateriso.eas.purdue.edu/waterisotopes/pages/data_access/oipc.html.

На практике наиболее корректно ЛЛМВ определяется мониторингом осадков на промежутке времени минимум 3–5 лет.

Деутерий и кислород-18 в поверхностных и подземных водах

В регионах с гумидным климатом и наличием периода отрицательных температур резервуары поверхностных и подземных вод проявляют следующие характерные особенности.

1. При переходе влаги из атмосферных осадков в поверхностные и подземные воды происходит усечение синусоидального входного сигнала по $\delta^2\text{H}$ и $\delta^{18}\text{O}$ за счет частичной или полной потери осадков теплого сезона вследствие действия эвапотранспирации. Поскольку основное питание водных объектов осуществляется осенними дождями и в период снеготалого половодья, то они содержат, как правило, изотопически более легкую (относительно среднегодового в осадках) воду. Первоначальное осреднение изотопного состава осадков периода отрицательных температур начинается в снежном покрове.
2. В резервуарах поверхностных и подземных вод происходит дальнейшее осреднение изотопного состава осадков за счет перемешивания отдельных порций воды, поступившей в различные периоды времени.

В результате при интерпретации наблюдений за изотопным составом поверхностных и подземных вод в первом приближении можно принимать, что входные (начальные) концентрации дейтерия и кислорода-18 отвечают средневзвешенным их содержаниям в осадках холодного периода года. При этом под холодным периодом года понимают время, когда среднесуточная температура становится ниже $+5^{\circ}\text{C}$ и значимость эвапотранспирации становится пренебрежимо малой [Блютген, 1972, 1973; Гриневский, 2012].

При наличии испарения из водоемов и/или поверхности почвы изотопный состав воды утяжеляется относительно начального за счет неравновесного фракционирования [Dansgaard, 1964]. Точки, отвечающие остаточной (после испарения) воде смещаются на диаграмме $\delta^2\text{H}-\delta^{18}\text{O}$ вправо-вверх относительно начального положения на ЛЛМВ.

Измерение изотопного состава воды (содержаний дейтерия и кислорода-18) выполнены в РЦ РДМИ НП СПбГУ на лазерном изотопном спектрометре Picarro L2120-i с использованием стандартов USGS45, USGS46 и внутрилабораторных образцов, привязанных к стандартам МАГАТЭ V-SMOW-2, GISP, SLAP. Погрешность измерения составляла $\pm 0,1\text{‰}$ по $\delta^{18}\text{O}$ и $\pm 1\text{‰}$ по $\delta^2\text{H}$.

3. Характеристика участка работ и способа опробования

Полигон Ламмин-Суо (болото Озерное) находится в котловине на водоразделе р. Сестра и оз. Красавица (рис. 6), входящих в бассейн Финского залива, и представляет собой классическое олиготрофное болото (здесь и далее гидрологические характеристики болота даны по [Гидрометеорологический, 2018; Рождественская, 1973]).

Окружающая местность имеет холмисто-котловинный и камовый рельеф. Холмы высотой 10–15 м чередуются с замкнутыми впадинами, а озовые гряды — с заболоченными долинами ручьев. С северо-востока болотную котловину ограничивает вытянутая гряда с превышениями над поверхностью болота до 15 м. С востока суходол более пологий, а с юга и юго-запада окружающая местность ровная, со слабовыраженными повышениями. Гидрологическая схема болота представлена на рис. 7, а геологический разрез — на рис. 8.

Геологический разрез представлен тремя структурными этажами. Нижний этаж сложен докембрийскими и палеозойскими кристаллическими породами и осадками. Второй структурный этаж — толща четвертичных отложений (*Ig/IIIos, IV*) — представлен песками с прослоями и линзами глин. Венчают разрез современные торфяные отложения (*bIV*), средняя мощность которых около 1,9 м, при максимальных глубинах в генетическом центре — 4,3 м.

Климат района умеренно влажный, близкий к морскому, с характерной умеренно холодной зимой и прохладным дождливым летом [электронный ре-

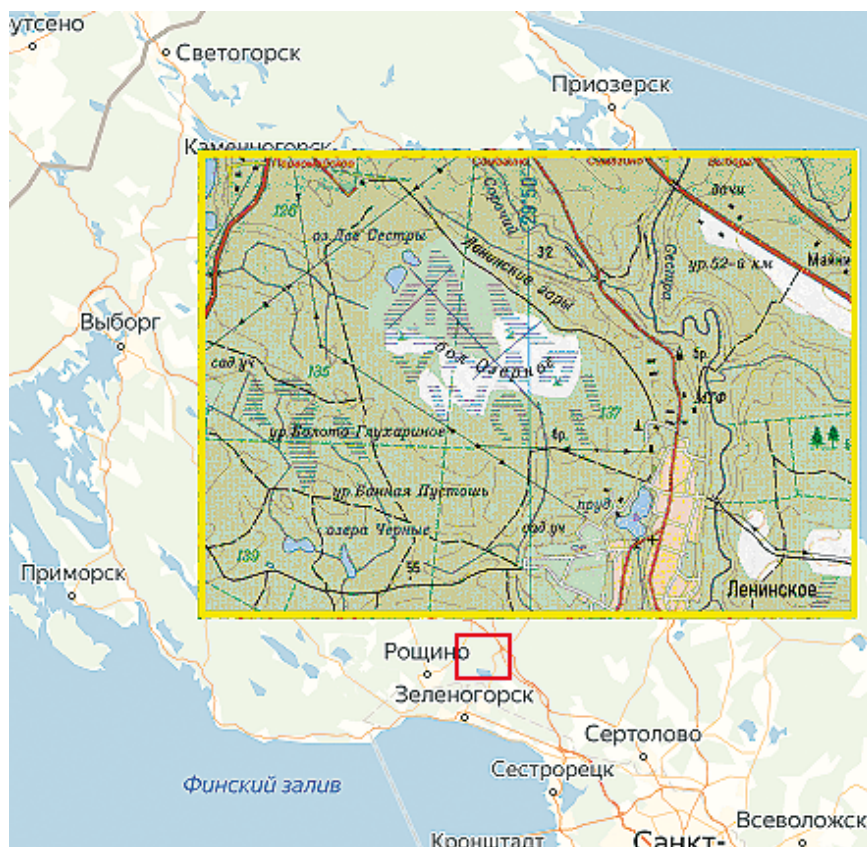


Рис. 6. Местоположение объекта исследований

курс 3]. Среднегодовая температура за многолетний период составляет $+4,7^{\circ}\text{C}$. Средняя температура самого теплого месяца июля составляет $+17,8^{\circ}\text{C}$, при абсолютном максимуме $+34^{\circ}\text{C}$. Средняя температура самого холодного месяца — февраля $-8,9^{\circ}\text{C}$ при абсолютном минимуме -35°C . Весенний переход через 0 градусов наблюдается обычно в конце марта — начале апреля, а осенний — в ноябре. Среднемноголетняя сумма осадков за год — $650\text{--}800$ мм, что примерно в два раза превышает величину испарения, большая часть осадков ($400\text{--}500$ мм), выпадает с апреля по октябрь. Наибольшее количество осадков в виде дождя приходится на август, наименьшее — на февраль-март.

Процедура опробования

Осадкомер ГГИ-3000 для отбора атмосферных осадков располагался на расчищенной площадке на северо-западном берегу болота. Наблюдательная сеть за

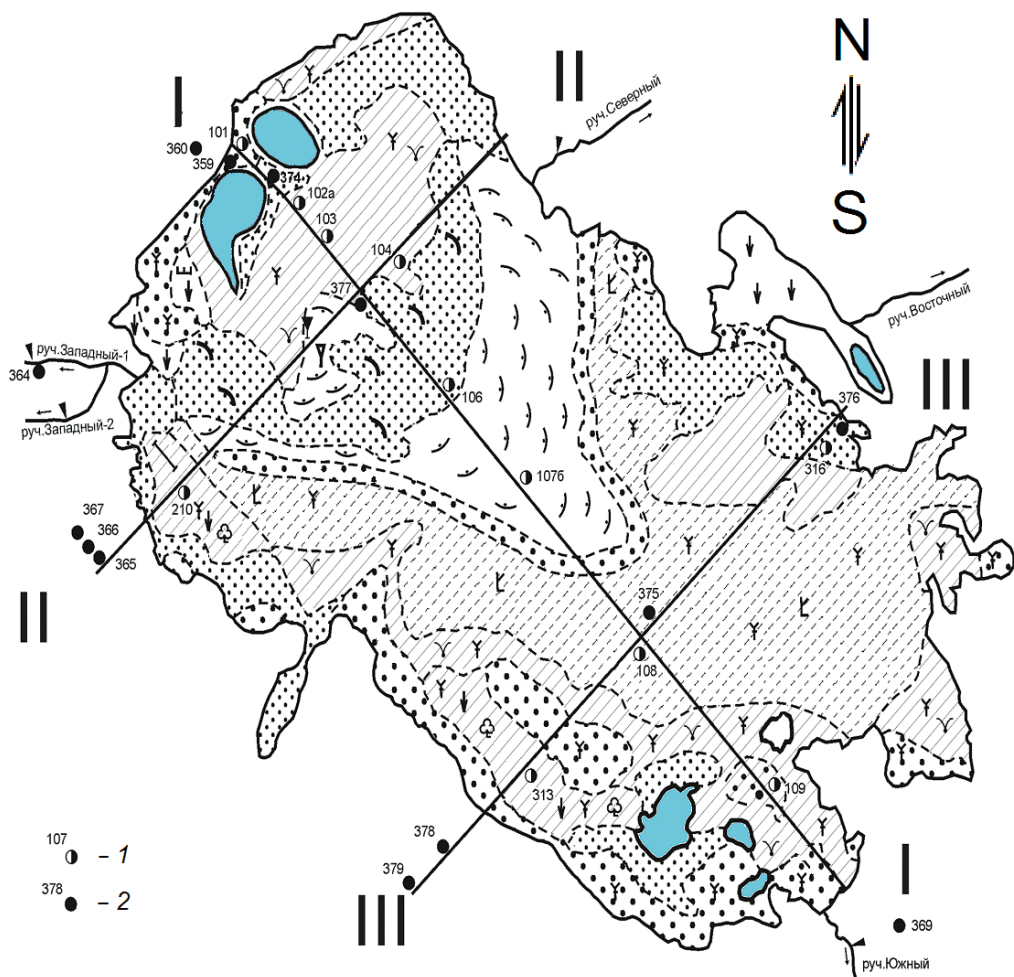


Рис. 7. Гидрологическая схема полигона Ламмин-Суо [Гидрометеорологический, 2018; Рождественская, 1973]. Треугольники — гидропосты на ручьях, кружки — скважины (полностью залитые кружки с номерами 3xx — скважины на грунтовый горизонт, остальные с номерами 1xx — на болотные отложения); квадраты — шурфы

поверхностными водами включает гидропосты на ручьях, вытекающих из болота. Подземные воды опробованы с помощью скважин на болотный и грунтовый горизонт. Фильтры скважин на болотный горизонт остановлены с глубины 0,5 м до подошвы торфяных отложений, фильтры скважин на грунтовый горизонт, как правило, расположены в супесях на глубинах от 4,26 до 9,44 м.

Пробы осадков отбирались на декадной основе (вода из осадкомера сливалась один раз в 10 дней). Водотоки и два озера у северо-западного берега болота (рис. 7) опробовались в зимнюю и летнюю межень на основных гидро-

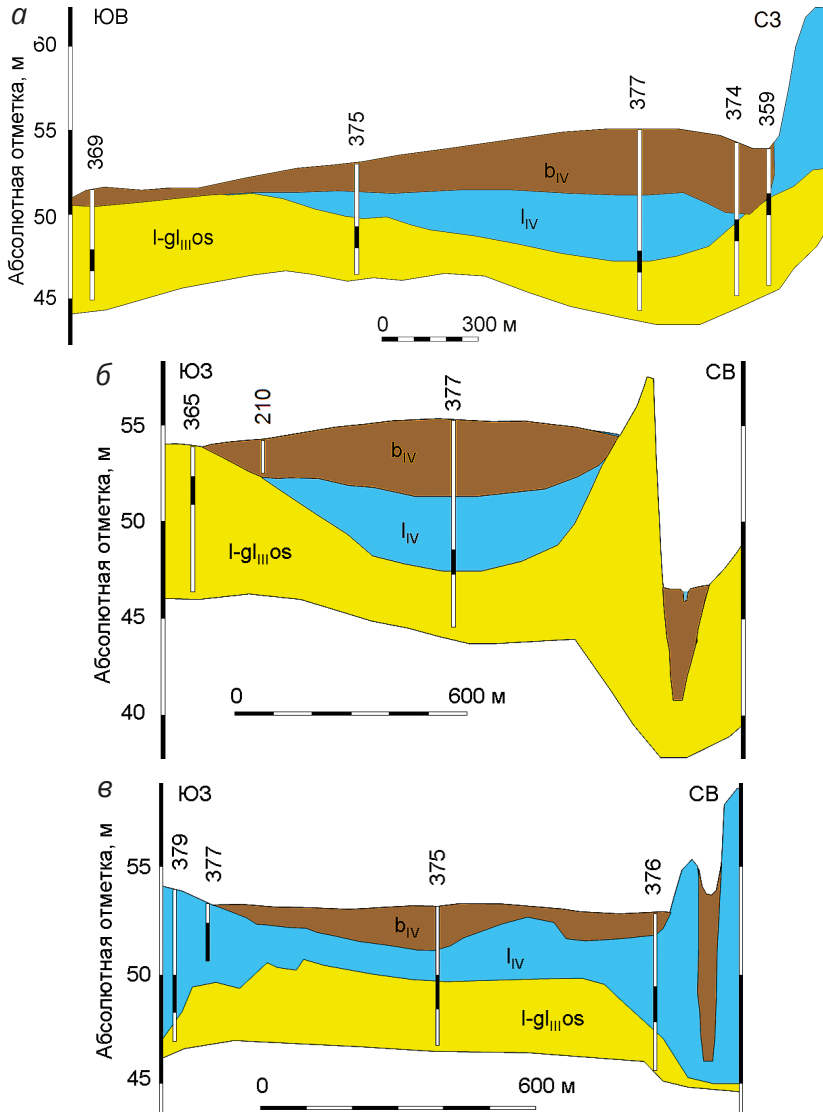


Рис. 8. Геологические разрезы (рис. 7): а — по линии I-I; б — по линии II-II; в — по линии III-III [Гидрометеорологический, 2018]

- l-gli_{IIIos} Глинистые озерно-ледниковые отложения ошашковской морены, представленные суглинками и глинами
- l_{IV} Морские отложения балтийского ледникового озера, представленные песками средне- и крупнозернистыми с включением гальки
- b_{IV} Торфяные отложения
- 377 Номер скважины
- Фильтр скважины

створах. Пробы подземных вод отбирались после прокачки скважин. Использовались 20 и 7 мл пластиковые и стеклянные виалы, которые герметически закрывались после отбора проб и хранились до анализа в холодильнике.

4. Гидрогеологические наблюдения и экспресс-опробование скважин

Центр растекания болотных вод расположен в районе скважин 103 и 104 (рис. 7 и 9).

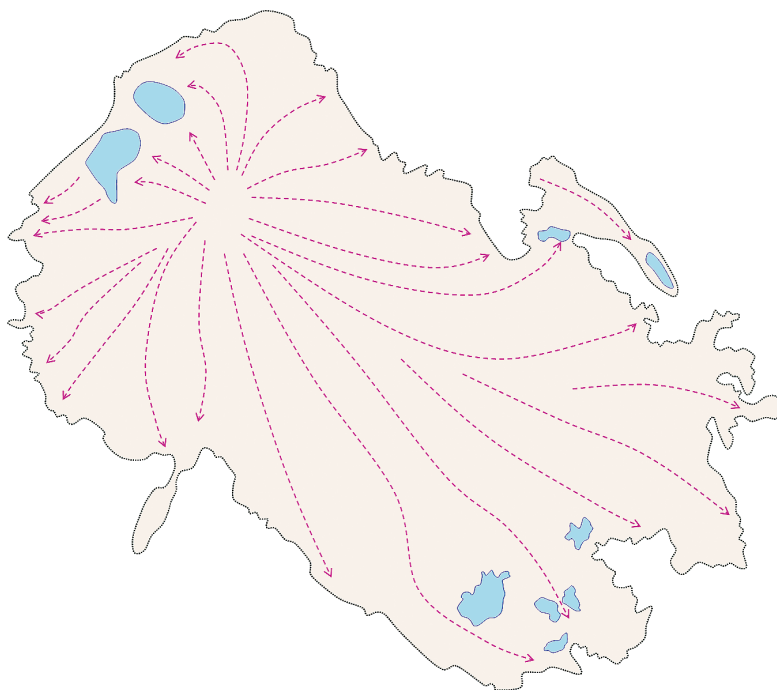


Рис. 9. Схема линий стока болотных вод [Гидрометеорологический, 2018; Рождественская, 1973]

Имеет место заметное отличие сетки течения в болотном и грунтовом горизонтах (рис. 9 и 10). Единовременные измерения в конце летней межени обнаружили отрыв урвонной поверхности грунтового водоносного горизонта от горизонта в болотных отложениях. Максимальной величины 7 м разрыв достигает в районе скважины 377, в которой отмечается наинизший уровень воды в грунтовом горизонте (рис. 7 и 10). Следовательно, должна иметь место вертикальная нисходящая фильтрация из болотного горизонта, по крайней мере в теплый сезон года.

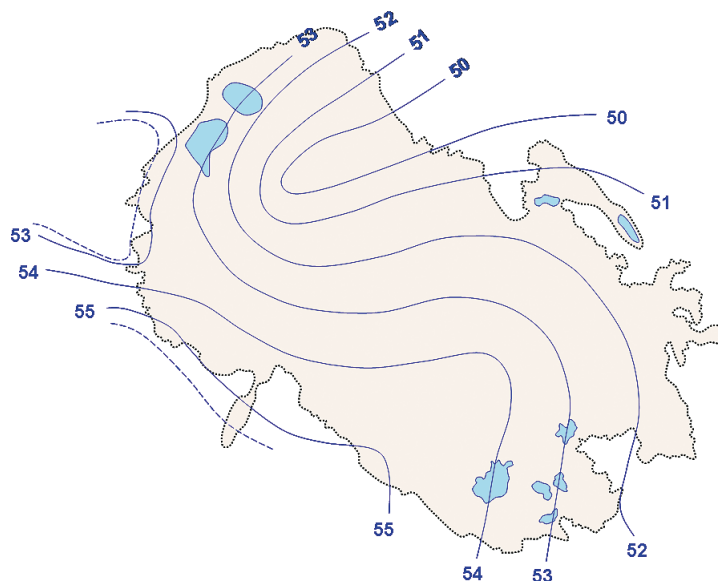


Рис. 10. Схема сетки напоров в грунтовом горизонте [Гидрометеорологический, 2018; Рождественская, 1973]

Таблица 1. Результаты обработки экспресс-опробования скважин грунтового горизонта. Для обработки использовано решение *Bouwer—Rice* [Bouwer, Rice, 1976]

Номер скважины	Вмещающие породы по паспорту скважины	Коэффициент фильтрации, м/сут.
359	Плотные супеси	0,12
360	Тонкозернистый песок	0,34
365	Мелко и среднезернистый песок	2,65
366	Мелкозернистый песок	1,92
367	Среднезернистый песок	2,82
369	Супесь	0,019
374	Супесь	0,37
375*	Тяжелые супеси	0,0035
376	Мелкозернистый песок	0,052
377	Супеси и пески	0,0348
378	Суглинок и песок	0,22
379	Разнозернистый песок	0,17

* — скважина, по-видимому, имеет закольматированный фильтр.

Наблюдательная сеть за подземными водами была организована Северо-западной гидрогеологической станцией в 1964–1965 г. Поэтому для оценки ее технического состояния и фильтрационных свойств вмещающих отложений выполнен промер глубин скважин и экспресс-откачки из грунтового горизонта с последующим наблюдением за восстановлением уровня. Для обработки использовано решение *Bouwer–Rice* [Bouwer, Rice, 1976] (результаты расчетов приведены в табл. 1):

$$k = \frac{r_0^2 \ln(R/r_\phi)}{2L_\phi} \times \frac{1}{t} \times \ln\left(\frac{H_0}{H}\right),$$

где: L_ϕ — длина фильтра, м; R — эффективный радиус влияния, м; r_ϕ — расстояние между центром скважины и ненарушенной частью водоносного горизонта, м; r_0 — радиус скважины, м; H_0 — величина мгновенного понижения, м; H — текущее положение уровня воды в скважине относительно уровня мгновенного понижения, м; t — время, сут.

Расчетные коэффициенты фильтрации в целом соответствуют наблюдаемым в регионе для встреченных разностей пород. В скважине 375 фильтр, по-видимому, закальматирован.

Обратим внимание, что выполненные экспресс-опробования не позволяют оценить вертикальные коэффициенты фильтрации, в том числе минерального слоя, подстилающего торфяную залежь, и определяющие перетекание из болотного горизонта в грунтовый.

5. Изотопный состав атмосферных осадков

Для болотного полигона Ламмин-Суо сотрудниками ГГИ и СПбГУ в 2012–2016 г. выполнены наблюдения за осадками и найдена ЛЛМВ:

$$\delta^2\text{H} = 7,2 \times \delta^{18}\text{O} + 0,2.$$

Таблица 2. Статистические характеристики изотопного состава атмосферных осадков (‰) на болотной станции Ламмин-Суо по сезонам для 2012–2016 г.*

	Зима(31)**		Весна(19)		Лето(22)		Осень(21)		Год(93)	
	$\delta^{18}\text{O}$	$\delta^2\text{H}$	$\delta^{18}\text{O}$	$\delta^2\text{H}$	$\delta^{18}\text{O}$	$\delta^2\text{H}$	$\delta^{18}\text{O}$	$\delta^2\text{H}$	$\delta^{18}\text{O}$	$\delta^2\text{H}$
Среднее	-16,2	-118	-10,1	-77	-8,7	-62	-11,8	-80	-12,2	-88
Минимум	-24,2	-181	-20,9	-152	-13,2	-95	-18,5	-133	-	-
Максимум	-9,9	-64	-5,5	-48	-5,4	-41	-6,5	-39	-	-

* — сезоны (по декадам): зима — 2.XII–2.III; весна — 3.III–3.V; лето — 1.VI–3.VIII; осень — 1.IX–1.XII.

** — в скобках количество измерений (отдельные декады были без осадков).

В летних, изотопически тяжелых осадках содержания дейтерия и кислорода-18 достигают величин $\delta^{18}\text{O} = -5,4 \text{ ‰}$ и $\delta^2\text{H} = -39 \text{ ‰}$, а в изотопически легких зимних — $\delta^{18}\text{O} = -24,2 \text{ ‰}$ и $\delta^2\text{H} = -181 \text{ ‰}$. Статистические характеристики осадков по сезонам приведены в табл. 2.

6. Изотопный состав подземных вод

Наблюдения за изотопным составом подземных вод выполнялись в ходе нескольких кампаний опробования — в декабре 2013 г., марте, июле и августе 2014 г. (рис. 11, табл. 3). Наиболее полным было опробование в августе 2014 г., когда одновременно были обследованы почти все скважины на болотный и грунтовый горизонты (в 2014 г. в работах по опробованию участвовала магистрант СПбГУ — Войлокова Т. А., включившая часть результатов измерений в выпускную квалификационную работу).

Вариации изотопного состава воды грунтового горизонта во времени невелики, что установлено статистически достоверно, и составляют (относительно среднего) $\pm 1,7 \text{ ‰}$ для кислорода-18 и $\pm 9 \text{ ‰}$ для дейтерия. Объем опробования болотного горизонта значительно меньше и не дает возможности достоверно определить характер изменения его изотопного состава во времени. Однако опробование в августе 2014 г. обнаруживает в нем небольшие пределы вариаций изотопного состава воды.

Устойчивый изотопный состав воды грунтового горизонта объясняется тем, что он, по-видимому, имеет относительно удаленную область питания, в результате чего его состав успевает гомогенизироваться за время фильтрации, вследствие действия дисперсионных механизмов и трехмерности сетки движения. Небольшие вариации изотопного состава воды болотного го-

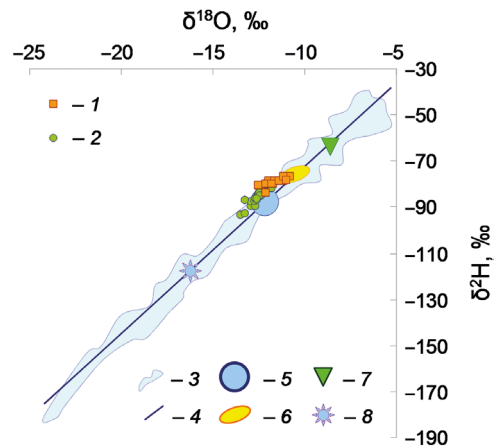


Рис. 11. Изотопный состав подземных вод: 1 — область составов атмосферных осадков; 2 — болотный и 3 — грунтовый горизонты; 4 — локальная линия метеорных вод; средние составы атмосферных осадков: 5 — средневзвешенное за период наблюдений; 6 — лето; 7 — весна и осень; 8 — зима

Таблица 3. Изотопный состав подземных вод

Дата	Горизонт				Параметр
	Болотный		Грунтовый		
	$\delta^{18}\text{O}$, ‰	$\delta^2\text{H}$, ‰	$\delta^{18}\text{O}$, ‰	$\delta^2\text{H}$, ‰	
декабрь 2013 г.	-11,7*	-80*	-12,6	-85	среднее
	-	-	-13,5	-92	минимум
	-	-	-11,9	-81	максимум
март 2014 г. *	-	-	-12,8	-86	
июль 2014 г.	-	-	-11,8	-83	среднее
	-	-	-13,1	-90	минимум
	-	-	-10,1	-74	максимум
август 2014 г.	-11,8	-78	-12,5	-84	среднее
	-12,5	-82	-13,2	-91	минимум
	-11,1	-77	-12	-78	максимум

* — опробована одна скважина.

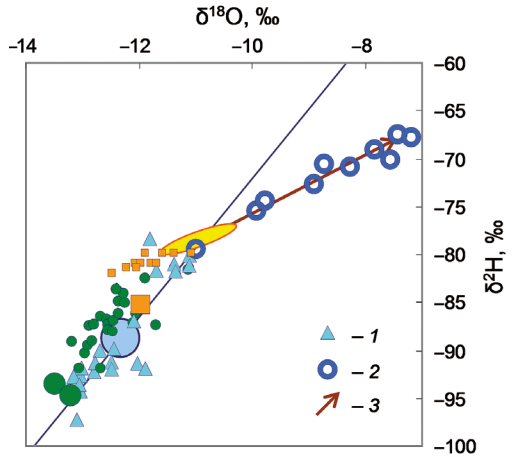
ризонта, имеющего, несомненно, местное питание, скорее всего, обусловлены значительной влагоемкостью торфа, в результате чего удельное инфильтрационное питание $\epsilon' = \epsilon/mn = 0,12/(2,3 \times 0,35) \approx 0,15$ этого горизонта оказывается невелико (где m — средняя мощность и n — пористость болотных отложений).

Следует отметить устойчивое различие средних изотопных составов грунтового и болотного горизонтов. А именно: состав вод грунтового горизонта $\delta^{18}\text{O} = -12,4$ ‰ и $\delta^2\text{H} = -87$ ‰ близок к взвешенному среднегодовому, а болотного — заметно тяжелее $\delta^{18}\text{O} = -11,8$ ‰ и $\delta^2\text{H} = -80$ ‰ и близок к составу осадков весны и осени.

В исследуемом районе питание подземных вод и наиболее существенный водообмен в озерах происходит, как правило, в период весеннего снеготаяния, а летние осадки в значительной степени поглощаются эвапотранспирацией. Поэтому можно ожидать, что изотопный состав вод грунтового горизонта должен быть близок к осадкам холодного периода года в целом. Тогда, исходя из данных в табл. 2, предполагаемый состав подземных вод грунтового горизонта должен составлять около $\delta^{18}\text{O} = -13,3$ ‰ и $\delta^2\text{H} = -96$ ‰, что заметно отличается от реально наблюдаемой величины.

В состав опробованных входит скважина № 360, находящаяся вне области влияния купола растекания болотных вод (рис. 7 и 9). Изотопный состав воды в ней достаточно устойчив и равен в среднем $\delta^{18}\text{O} = -13,3$ ‰ и $\delta^2\text{H} = -92$ ‰, то

Рис. 12. Сравнение изотопного состава подземных и поверхностных вод: 1 — ручьи; 2 — озера в северо-западной части болота; 3 — линия испарения (уравнение на диаграмме, остальные обозначения — на рисунке 10)



есть весьма близок к тому, который должен характеризовать расчетный региональный состав грунтовых вод. Вышеизложенные наблюдения за изотопным составом указывают на перетекание вод болотного горизонта в грунтовый и согласуются с данными об отрыве уровней грунтового горизонта от болотного. Из уравнения смешения доля болотных вод в составе грунтового горизонта под площадью болота оценивается величиной около 0,7.

Два наиболее крупных озера располагаются в северо-западной части болота, а их опробование обнаружило смещение фигуративных точек относительно ЛЛМВ. Это смещение увеличивается к концу теплого сезона и исчезает в весенний период. Такое поведение изотопного состава открытых водоемов характерно в случае вторичного изотопного фракционирования воды, возникающего при неравновесном испарении (рис. 12).

Линия, аппроксимирующая точки озерной воды, имеет уравнение $\delta^2\text{H} = 3,6 \times \delta^{18}\text{O} - 40$. Точка ее пересечения с ЛЛМВ (начальный состав воды до испарения) соответствует области изотопного состава весенних и осенних осадков. Вероятнее всего, питание озер осуществляется жидкими атмосферными осадками, выпадающими на акваторию озер или стекающих с ближайших окрестностей болота, а доля снегового питания невелика.

Малая доля снегового питания, скорее всего, связана с двумя факторами, действующими в последние годы а) резким уменьшением влагозапасов в снеге за счет глубоких зимних оттепелей; б) повышенной весенней абляции снега, залегающего на промерзшем торфе, вследствие увеличения суммарной радиации из-за относительной сухости весен.

Были поставлены натурные опыты с наблюдением изменения изотопного состава остаточной воды при испарении (использовались атмосферные осадки). Из экспериментальных данных следует, что доля испарившейся воды

в среднем, составляет около 12–15% и достигает 28% для точек, наиболее отклоняющихся от ЛЛМВ, что близко к оценкам, полученным ранее, исходя из балансовых наблюдений [Калужный, Романюк, 2009].

Отметим, что часть точек, характеризующих воды болотного горизонта, лежит существенно левее ЛЛМВ и практически на продолжении линии испарения, рассчитанной из состава воды в озерах. Такое расположение точек характеризует пар, уходящий с поверхности водоемов [Ferronsky, Polyakov, 2012]. Возможно, что болотный горизонт частично питается за счет конденсации влаги, испарившейся из озер на болоте и прилегающей территории.

7. Трансформация изотопного состава осадков при формировании инфильтрационного питания

Основываясь на данных долговременных наблюдений [Гидрометеорологический, 2018], условия формирования инфильтрационного питания для болотного массива Ламмин-Суо можно схематически представить в следующем виде (рис. 13).

1. Осенние дожди идут в основном на восполнение дефицита влаги, возникшей в летнюю межень.
2. На глубине 10–20 см лед подо мхом сохраняется до поздней весны, а влага, появившаяся за счет глубоких оттепелей и ранних дождей, обычно впитывается в снеговой покров и мох, не формируя инфильтрационного питания. Вследствие южной экспозиции поверхности болота и его защищенности от выхолаживающих ветров северных румбов, а также малой теплоемкости и теплопроводности мха, как подстилающего субстрата [Дюкарев, 2012], снеговой покров интенсивно деградирует за счет абляции, начиная с третьей декады марта. Поэтому зимней компонентой питания болотного горизонта можно пренебречь.
3. Судя по уровням воды в наблюдательных скважинах, основное питание болотный горизонт начинает получать поздней весной, когда в слое сезонного промерзания формируются гидрологические окна за счет протаивания льда.
4. В летний период доля осадков, идущих на инфильтрационное питание, резко снижается под действием эвапотранспирации, несмотря на возрастание объема атмосферных осадков.

Указанная схема хорошо согласуется с данными по изотопному составу воды в болотном горизонте, который заметно тяжелее взвешенного средне-

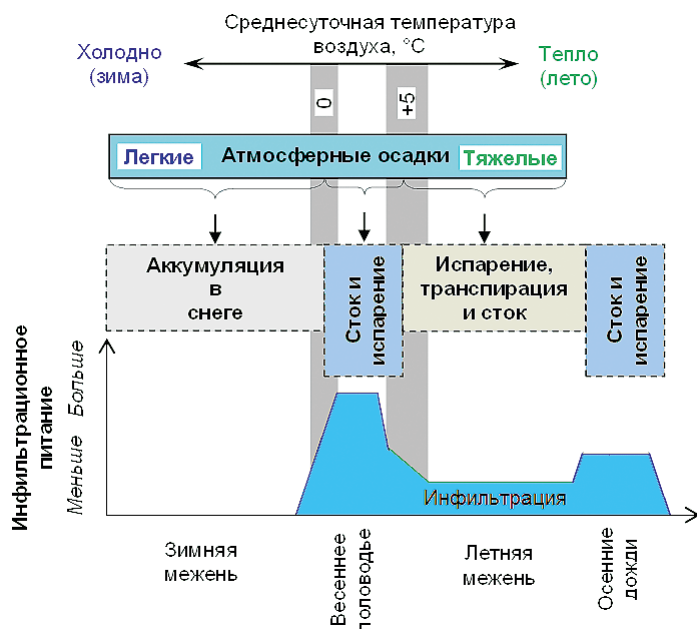


Рис. 13. Схема формирования изотопного состава инфильтрационного питания для болотного массива Ламмин-Суо

годового состава осадков и близок к составу осадков весны/осени (табл. 3, рис. 12).

8. Разработка фильтрационной модели

Для оценки фильтрационных потерь из болотного горизонта в грунтовый был использован метод математического моделирования (в разделе использованы материалы из выпускной квалификационной работы [Кошелева, 2017]). Модель разрабатывалась на базе программного кода MODFLOW, где используется метод конечных разностей. Задача решалась в трехмерной напорно-безнапорной постановке для условий установившейся (стационарной) фильтрации. Моделировалась система из трех гидравлически взаимосвязанных слоев (табл. 4):

- 1-й расчетный слой соответствовал торфяным отложениям (болотный горизонт);
- 2-й расчетный слой — верхняя часть отложений Балтийского ледникового озера, представленная песками средне- и крупнозернистыми с включением гальки (верхняя часть грунтового горизонта);

- 3-й расчетный слой — нижняя часть отложений Балтийского ледникового озера, представленная песками средне- и крупнозернистыми (нижняя часть грунтового горизонта).

Задача решалась на однородной сетке, размер расчетных блоков 25×25 м. Размер модельной области составил 3050×2350 м. Общее количество блоков — 11 346 шт.

Таблица 4. Модельная стратификация геологического разреза

№ модельного слоя	Геологическое описание	Индекс	Пространственная разбивка	Мощность (m), м	Коэффициент фильтрации (k_f), м/сут
1	Торфяные отложения	bIV	болотный горизонт	0,5–6,0	2–15
2	Пески средне- и крупнозернистые с включением гальки	IV	верхняя часть грунтового горизонта	4,5	0,0016–0,18
3	Пески средне- и крупнозернистые с включением гальки; увеличение глинистой составляющей в нижней части слоя	IV	нижняя часть грунтового горизонта	9	0,0016–0,18

Матрицы кровли первого и второго слоев, а также подошвы второго и третьего слоев (рис. 14, 15) вычислены на основе наземной съемки рельефа и по данным бурения скважин.

Внешние гидродинамические границы

Плановые границы для первого расчетного слоя (1) полностью повторяют конфигурацию болота с граничным условием ГУ II рода (с нулевым расходом $Q = 0$) по внешнему контуру (рис. 16).

Границы грунтового водоносного горизонта (2-й и 3-й расчетные слои) задавались исходя из положения водоразделов с ГУ II рода (с нулевым расходом $Q = 0$) на северо-западе, юго-западе и юго-востоке. На юге и севере контур модели ограничен крайними линиями тока грунтового водоносного горизонта (рис. 10) с ГУ II рода (с нулевым расходом $Q = 0$, см. рис. 17).

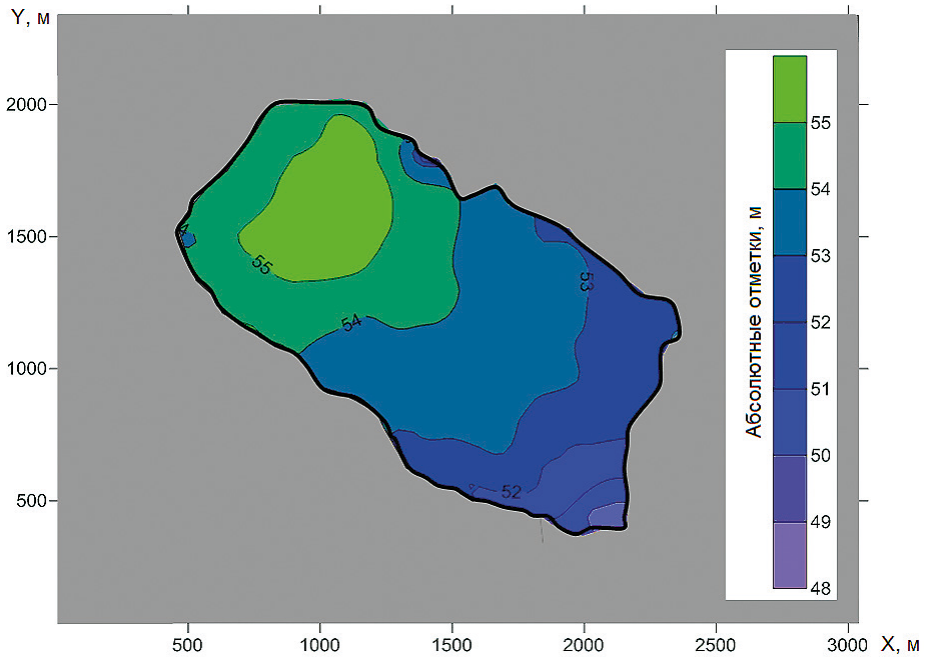


Рис. 14. Карта абсолютных отметок кровли болотных отложений (1-й слой)

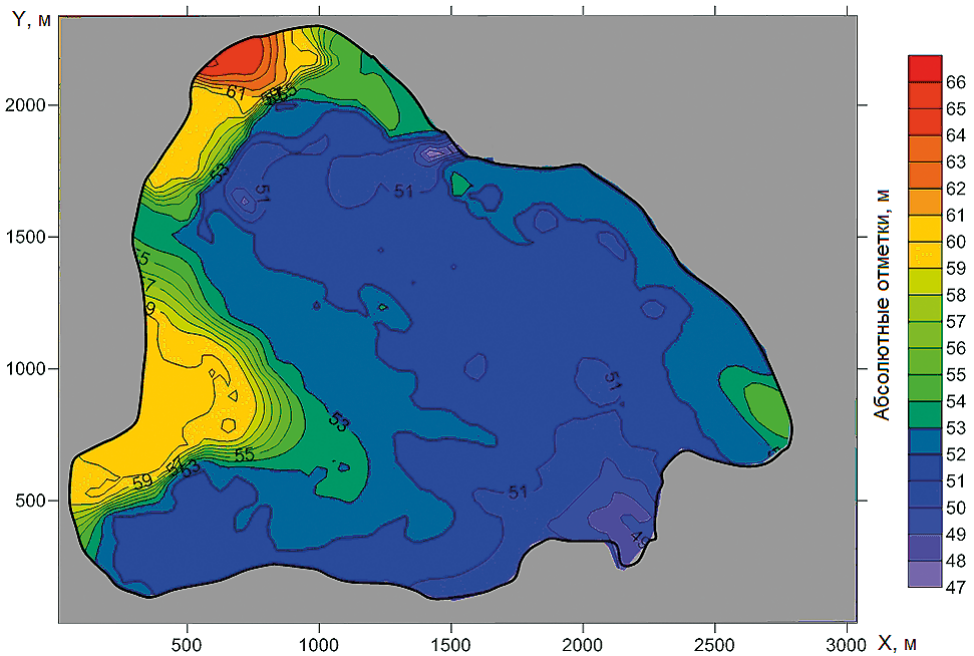


Рис. 15. Карта абсолютных отметок кровли отложений Балтийского ледникового озера (2-й слой)

Внутренние гидродинамические границы

На ручье Южный и озере Копейка задавались ГУ III рода, на озерах Две Сестры, ручьях Западном и Северном — ГУ I рода (постоянный напор). Ручей Северный и озеро Копейка задавались только во втором расчетном слое, а остальные — в первом и втором расчетных слоях (см. рис. 16, 17). Уровни воды в вышеназванных водных объектах заданы, исходя из их реальных значений.

Инфильтрационное питание

Инфильтрация на площади развития торфяного массива происходит за счет поглощения части атмосферных осадков болотным горизонтом и последующего перетекания из него через разделяющий слой в грунтовый с изначально неизвестными фильтрационными свойствами. Общее инфильтрационное питание на площади болотного массива было оценено исходя из данных по расходам стекающих ручьев за вычетом расхода воды на эвапотранспирацию.

Исходя из региональных данных, на этом этапе была принята следующая неоднородность по инфильтрационному питанию:

- а) на возвышенностях, окружающих болотный массив, $\varepsilon = 1 \times 10^{-4}$ м/сут.,
- б) для болотных отложений — $\varepsilon = 1 \times 10^{-3}$ м/сут.

Уточнение значений инфильтрации проводилось в процессе калибровки.

Фильтрационные параметры

Для задания фильтрационных параметров (см. табл. 4) использовались результаты наливов в шурфы (2016 г.) и экспресс-опробований скважин (2012 г.; см. табл. 1), а также литературные данные [Гидрометеорологический, 2018; Рождественская, 1973; Лукнер, Шестаков, 1986].

Вертикальный коэффициент фильтрации для болотных отложений (1-й расчетный слой) и озерных отложений (2–3-й расчетные слои) изначально был принят 0,01 м/сут. и 0,1 м/сут. соответственно. Затем величина коэффициента вертикальной фильтрации уточнялась при калибровке модели таким образом, чтобы обеспечить наблюдаемый отрыв уровня грунтовых вод от болотных.

Калибровка фильтрационной модели

На этапе калибровки численной фильтрационной модели уточнялось пространственное распределение параметров. В качестве критериев подобия использовалось распределение напоров в болотном и грунтовом горизонтах,

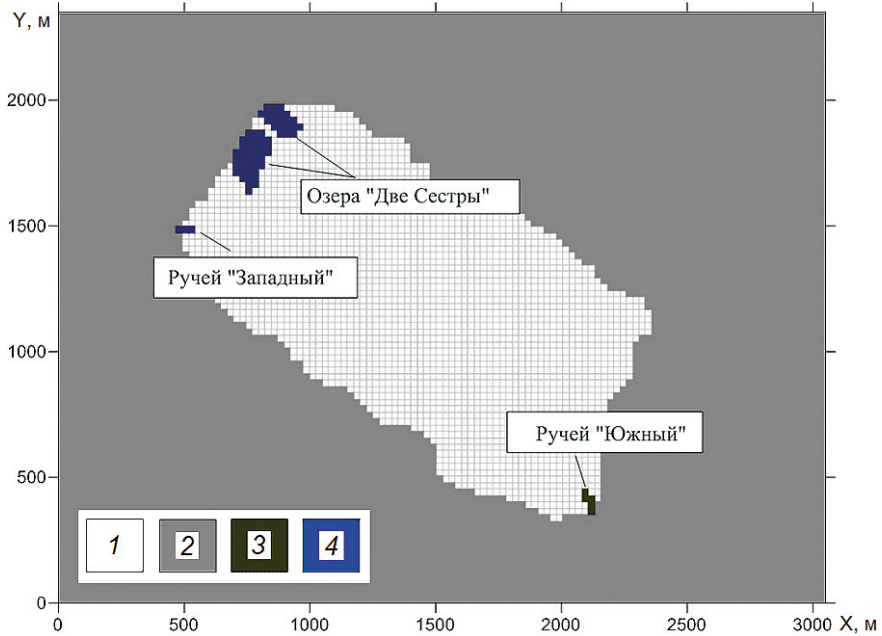


Рис. 16. Граничные условия в первом расчетном слое (болотный горизонт): 1 — активные блоки, 2 — II род ($Q = 0$), 3 — III род, 4 — I род ($H = \text{const}$)

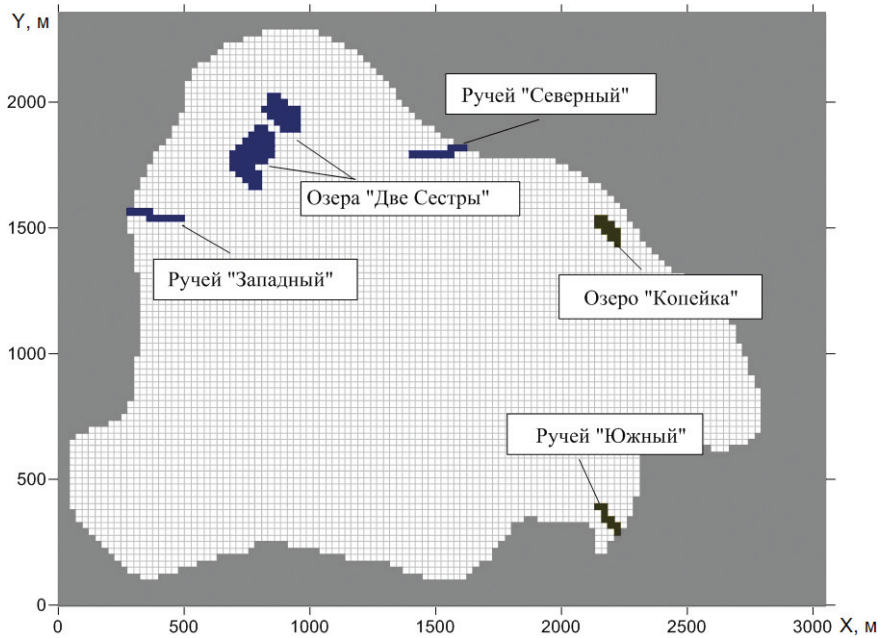


Рис. 17. Граничные условия во втором расчетном слое (верхняя часть грунтового горизонта): 1 — активные блоки, 2 — II род ($Q = 0$), 3 — III род, 4 — I род ($H = \text{const}$)

а также объемов стока по ручьям. Подборочными параметрами служили горизонтальный и вертикальный коэффициенты фильтрации и величина инфильтрационного питания.

Отрыв уровней грунтовых вод от болотных определяется в первую очередь коэффициентом вертикальной фильтрации (рис. 18). В ходе калибровки выяснено, что наблюдается корреляция этого параметра с абсолютными отметками рельефа болотного массива. Для болотного горизонта (1-й расчетный слой) на участках, где мощность болотных отложений достигает 6 м, величина вертикального коэффициента фильтрации составила 0,00001 м/сут., а в пределах долины ручья Южный — 0,00007 м/сут. Значительное уменьшение проницаемости объясняется увеличением степени разложения торфа с увеличением мощности залежи.

Вертикальный коэффициент фильтрации 2-го расчетного слоя варьирует от 0,00001 м/сут. до 0,008 м/сут. вне болотного массива и составляет около 0,9 м/сут. в пределах контура распространения болотных отложений (рис. 19).

Калибровка коэффициента горизонтальной фильтрации выполнялась на основании данных о разгрузке болотных вод в ручьи (рис. 20). Найдено, что для 1-го расчетного слоя коэффициент фильтрации также коррелирует с мощностью (абсолютными отметками кровли) торфяной залежи. На возвышенных участках коэффициент горизонтальной фильтрации составил 1–1,1 м/сут., в долине ручья Южный — повышается до 14 м/сут., а на остальной территории варьирует от 5 до 10 м/сут.

Наибольшей фильтрационной неоднородностью характеризуются долины временных водотоков (рис. 21). В пределах долины ручья Северный коэффициент фильтрации меняется от 0,05 до 10 м/сут. В пределах долин ручьев Южный и Западный, а также озера Копейка коэффициенты фильтрации варьируют от 0,06 до 5 м/сут. На водораздельных участках коэффициенты горизонтальной фильтрации снижаются до 0,03–0,1 м/сут. Дополнительное фильтрационное сопротивление для ГУ III рода в русле ручья Южный составляет 200 м²/сут. и в ложе озера Копейка — 360 м²/сут.

Результаты расчета потоков на фильтрационной модели представлены на рисунках 22–24, а численное сравнение напоров — на рис. 25 и в табл. 5, и демонстрируют удовлетворительное совпадение модельных и натуральных напоров, а также общего вида расчетных сеток движения в болотном и грунтовом горизонтах с фактическими.

В ходе калибровки по фильтрационным параметрам было выяснено, что оптимальным являлось задание величины инфильтрации 0,00001–0,00005 м/сут. на водоразделах и склонах, окружающих болотный массив, и 0,000012–0,000093 м/сут. — в пределах самого болотного массива, с постепенным уменьшением значений в сторону долины ручья Южный (рис. 25).

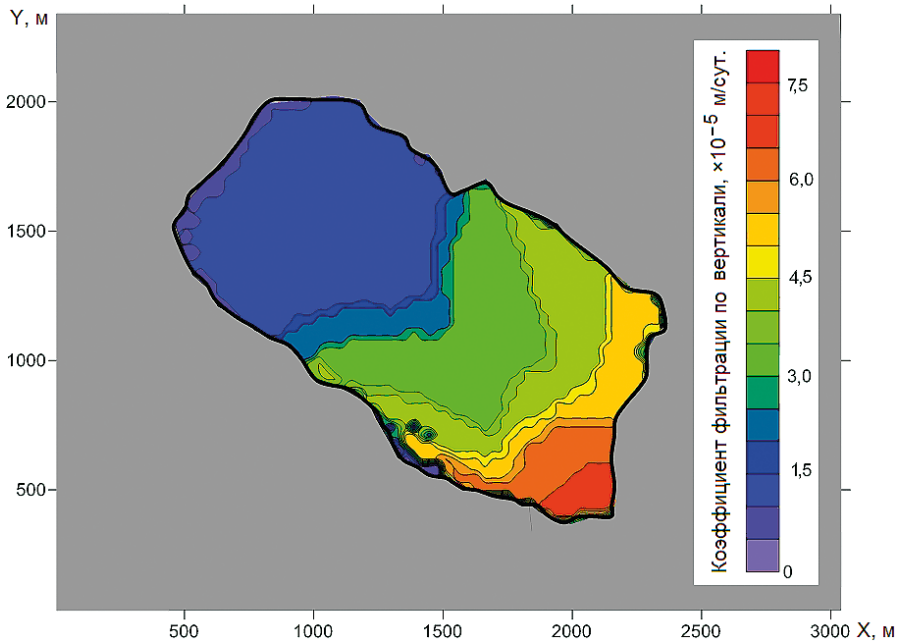


Рис. 18. Матрица распределения коэффициента вертикальной фильтрации 1-го расчетного слоя

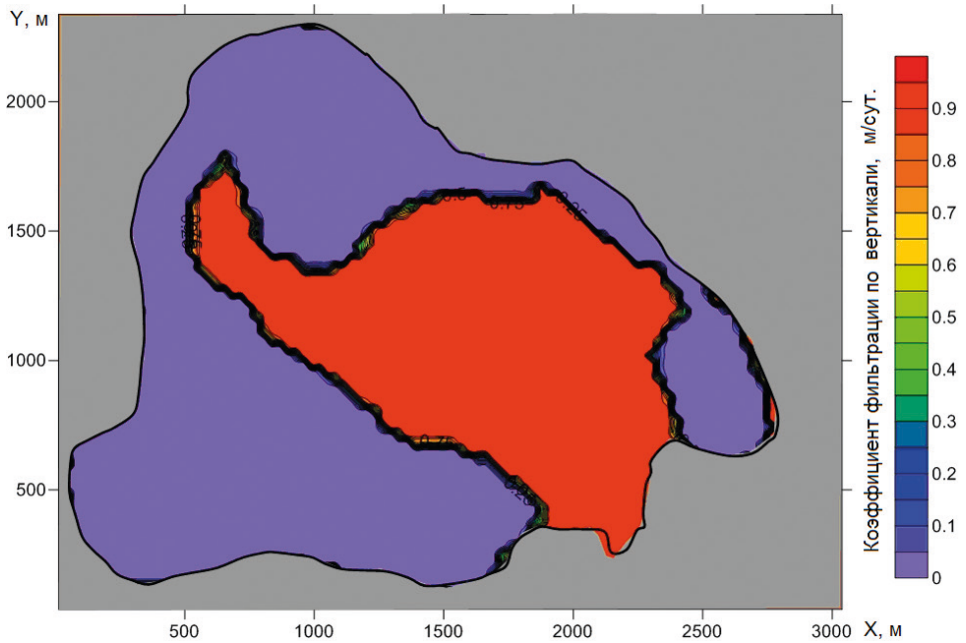


Рис. 19. Матрица распределения вертикального коэффициента фильтрации 2-го расчетного слоя

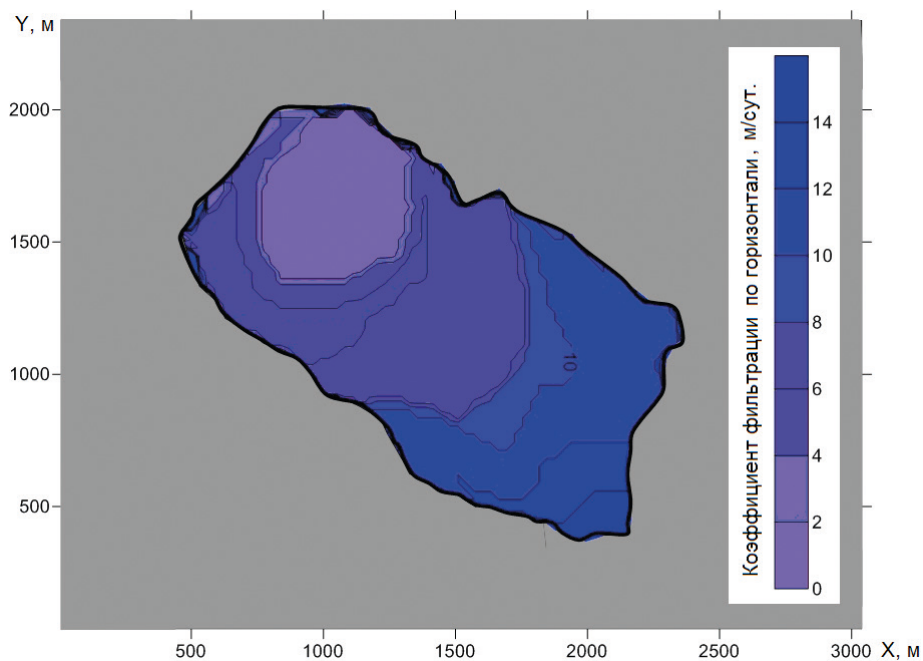


Рис. 20. Матрица распределения горизонтального коэффициента фильтрации 1-го расчетного слоя

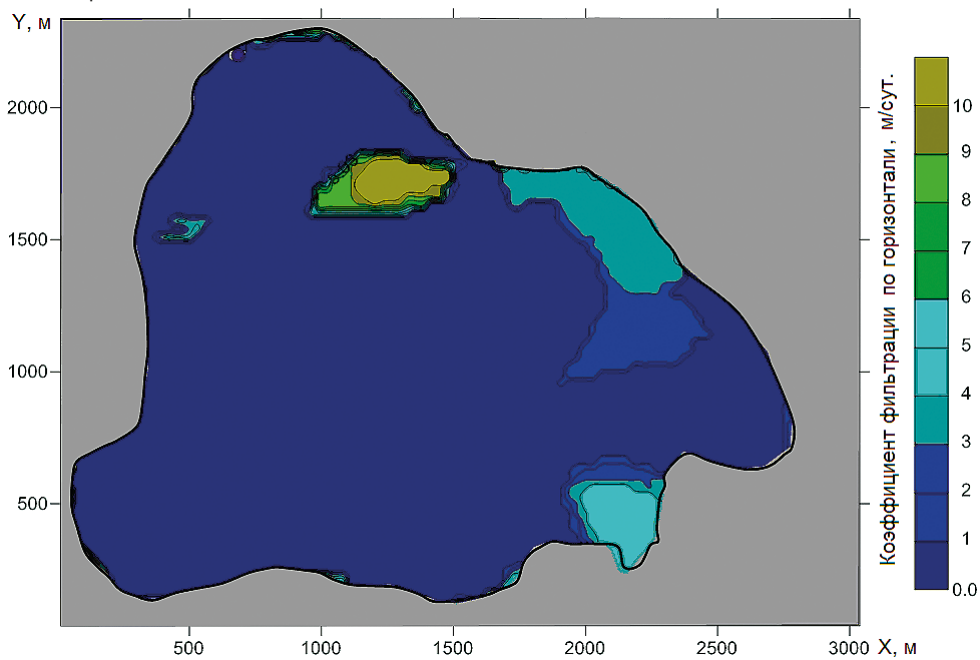


Рис. 21. Матрица распределения горизонтального коэффициента фильтрации 1-го расчетного слоя

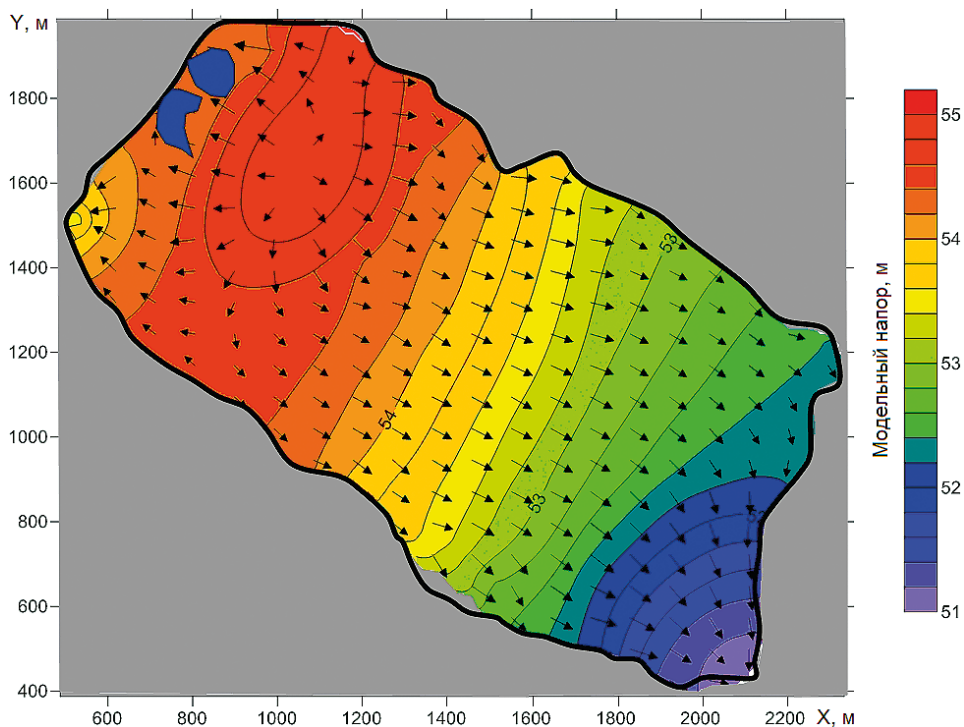


Рис. 22. Модельная схема растекания болотных вод (для сравнения см. рис. 9)

Таблиц 5. Сопоставление наблюдаемых и модельных напоров

№ скважины	Болотный горизонт (1-й модельный слой)		№ скважины	Грунтовый горизонт (2 и 3-й модельные слои)	
	Факт	Модель		Факт	Модель
101	54,23	54,20	359	51,07	51,04
102a	54,56	54,58	360	52,11	52,19
103	55,14	54,87	374	49,63	49,57
104	55,11	54,89	377	48,09	48,08
210	54,36	54,39	367	54,66	54,58
106	54,52	54,50	366	54,69	54,62
1076	53,72	53,73	365	54,66	54,66
108	52,82	52,95	375	52,68	52,75
313	52,59	53,09	376	49,66	49,74
316	52,62	52,70	378	53,11	53,58
109	51,90	51,92	379	53,23	53,66
			369	49,36	49,47

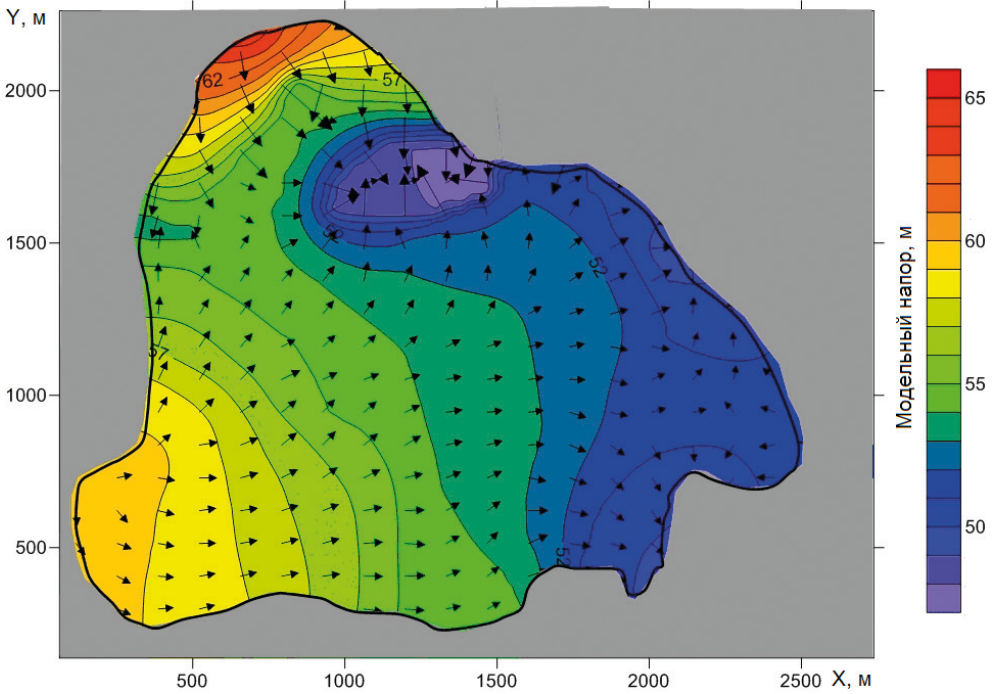


Рис. 23. Модельная схема движения грунтовых вод (для сравнения см. рис. 10)

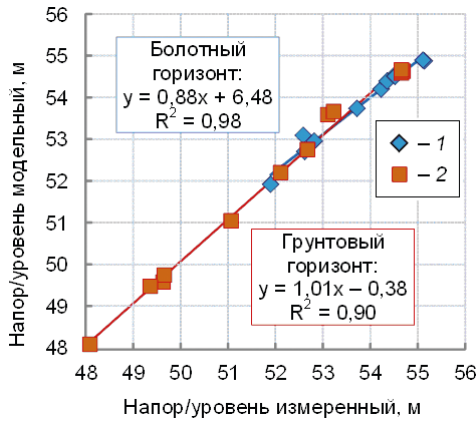


Рис. 24. Сравнение расчетных напоров/уровней подземных вод в грунтовом и болотном горизонтах с наблюдаемыми (1 — болотный, 2 — грунтовый горизонт; уравнения аппроксимации для каждого горизонта даны на диаграмме)

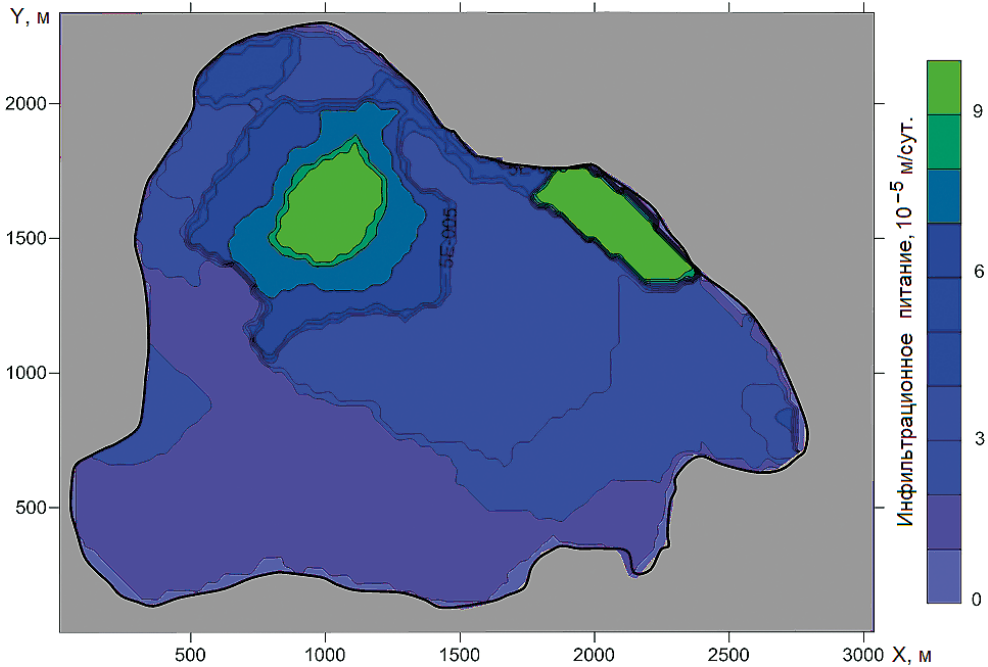


Рис. 25. Матрица распределения инфильтрации, полученная по результатам фильтрационной калибровки модели

9. Модельная оценка перетекания через разделяющий слой на базе данных об изотопном составе воды

Известно, что распределение расчетных напоров, удовлетворительно описывающее наблюдаемую сетку движения, можно получить при не вполне корректных (и даже ошибочных) фильтрационных параметрах, особенно если статьи водного баланса моделируемого объекта плохо известны [Лукнер, Шестаков, 1986]. С другой стороны, известно, что натурная оценка структуры водного баланса наиболее трудоемкая, длительная и одновременно наименее точная процедура. Для болотных массивов трудность таких оценок усугубляется значительным вкладом эвапотранспирации в водный баланс [Иванов, 1975; электронный ресурс 1].

Для болотного массива Ламмин-Суо распределение статей водного баланса и напоров/уровней в водоносных горизонтах установлены с максимально возможной точностью на основании многолетних стандартных наблюдений и опытных работ, выполненных перекрестными методами. Это позволяет продемонстрировать возможность использования изотопных данных в качестве дополнительного достаточно легко определяемого критерия, с по-

мощью которого возможна количественная оценка инфильтрационного питания и/или перетекания при построении численных моделей.

Использование данных об изотопном составе воды для калибровки инфильтрационного питания и перетекания предусматривало создание миграционной (транспортной) модели участка работ, которое проводилось в два этапа.

1 этап заключался в расчете времени водообмена в болотном горизонте, что необходимо для оценки временного масштаба моделирования и понимания способов задания входной функции по дейтерию и кислороду-18.

2 этап заключался в воспроизведении на модели, за счет варьирования объемом перетекания из болотного горизонта, распределения концентраций кислорода-18 в грунтовом горизонте с наибольшим приближением к наблюдаемым.

Первый этап миграционного моделирования

Целью первого этапа миграционного моделирования являлось вычисление времени полного водообмена в болотном массиве, которое определяет изменение формы входного сигнала, а также концентраций дейтерия и кислорода-18 во времени.

Грубая оценка времени водообмена для болотного горизонта, с учетом объема торфяной залежи, ее пористости, инфильтрационного питания и эвапотранспирации, исходя из данных [Гидрометеорологический, 2018; Рождественская, 1973], дает величину около 50–70 лет.

Наличие модели позволяет выполнить оценку времени водообмена не только для болотного, но и для грунтового горизонтов. Для этого была принята схема, согласно которой начальная концентрация кислорода-18 в болотных и грунтовых водах равна нулю, а в атмосферных осадках — постоянна и равна единице. Оценка времени водообмена в данном случае производится по моменту выхода концентраций изотопа в водах грунтового горизонта на квазистационарный уровень.

Задавалась следующая эффективная пористость расчетных слоев [Гидрометеорологический, 2018]:

$n = 0,5$ для первого модельного слоя (торфяных отложений),

$n = 0,3$ для второго и третьего расчетных слоев (озерных отложений).

Константы гидродисперсии для расчетных слоев:

— 1,5 м для первого расчетного слоя,

— 1 м для второго и третьего расчетных слоев.

Отношение продольной гидродисперсии к поперечной и отношение вертикальной гидродисперсии к продольной были приняты равным 0,1 [Лукнер, Шестаков, 1986].

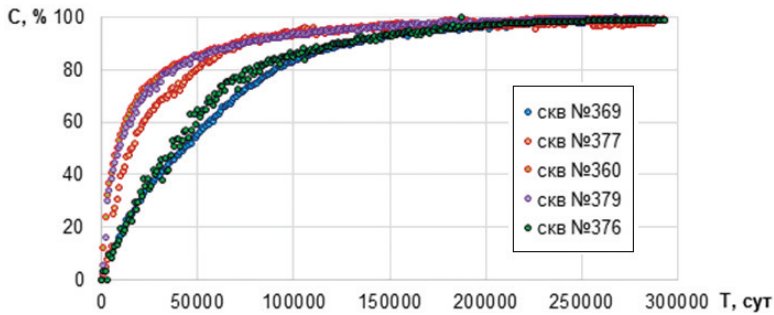


Рис. 26. Расчетное изменение относительных концентраций кислорода-18 в гидрогеологических скважинах болотного полигона Ламмин-Суо во времени (начальная концентрация кислорода-18 в болотном и грунтовом горизонте $C = 0$, а в атмосферных осадках постоянна и равна $C = 1$)

Результаты расчета времени водообмена представлены на рис. 26, из которого видно, что время 90 % замещения начальной воды атмосферным питанием составляет около 270–300 лет, а полного — около 450–550 лет.

Выполненная оценка согласуется с натурными наблюдениями, которые обнаруживают, что по сравнению с вариациями в атмосферных осадках, значимые изменения концентраций дейтерия и кислорода-18 в водах грунтового и болотного горизонтов во времени отсутствуют. Следовательно, при задании входной функции можно пренебречь сезонными вариациями содержаний дейтерия и кислорода-18 в осадках, а задавать их концентрации в инфильтрационном питании по среднесезонным данным:

- для болотного горизонта — равными весенним и осенним осадкам;
- для грунтового горизонта — равными среднему составу осадков за холодный период года.

Второй этап миграционного моделирования

Исходя из оценки времени водообмена в болотной системе, для инфильтрационного питания и расчета перетекания из болотного горизонта в грунтовый были использованы следующие данные об изотопном составе природных вод.

1. В качестве начальной концентрации для болотного горизонта (1-й модельный слой) — натурно зафиксированное распределение содержаний кислорода-18 в болотных водах (источнике питания грунтового горизонта в пределах распространения торфяной залежи; рис. 27) и такое же постоянное во времени распределение для его инфильтрационного питания.

2. Изотопный состав воды в грунтовом горизонте вне области влияния перетекания из болотного горизонта — в качестве начальных содержаний

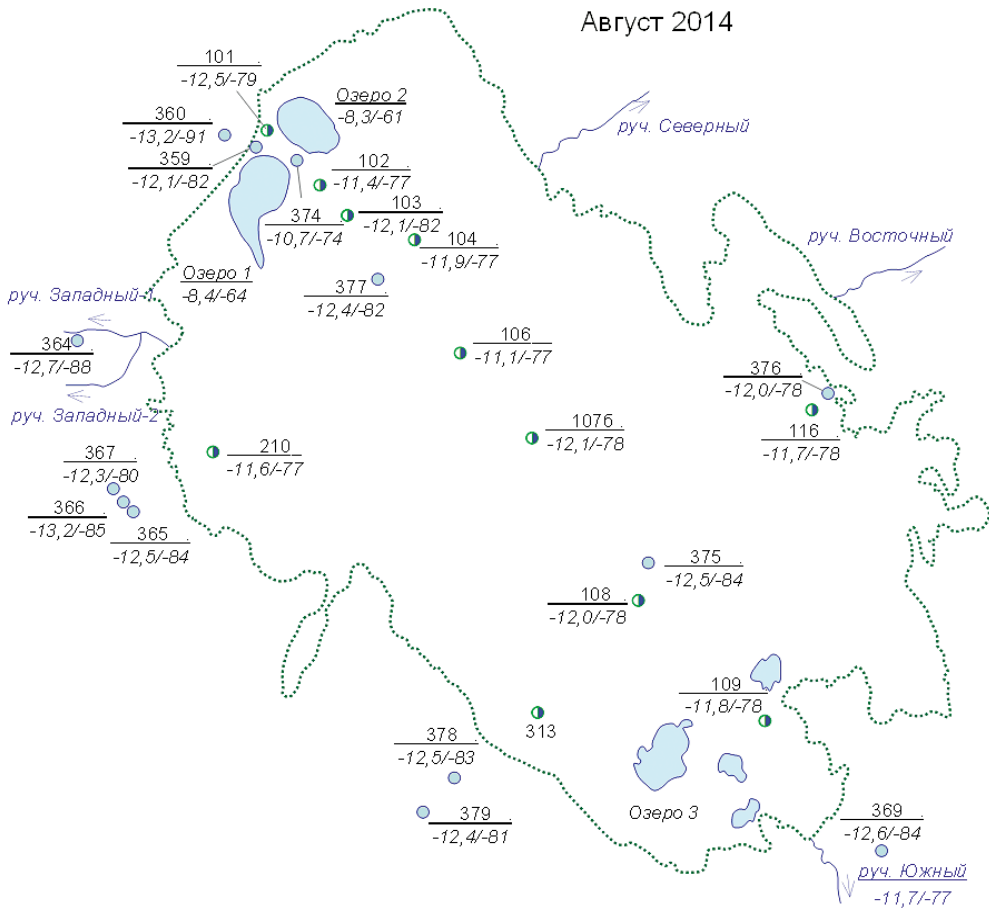


Рис. 27. Распределение изотопного состава вод болотного и грунтового горизонтов полигона Ламмин-Суо: ● — скважины на грунтовой горизонт с номерами 3xx; ○ — скважины на болотный горизонт с номерами 1xx

кислорода-18 во 2-м и 3-м модельных слоях, а также в их инфильтрационном питании вне площади развития торфяной залежи. Оценка выполнена по многолетним данным опробования грунтового горизонта скважиной № 360, находящейся вне области влияния купола растекания болотных вод, в которой изотопный состав воды $\delta^{18}\text{O} = -13,3 \text{ ‰}$ и $\delta^2\text{H} = -92 \text{ ‰}$.

На этом этапе миграционного моделирования уточнялись коэффициенты вертикальной фильтрации, определяющие условия перетекания. Критерием подобия было соответствие модельного распределения концентраций кислорода-18 в грунтовой горизонте наблюдаемым в натуральных условиях (табл. 6, рис. 28). Пространственное распределение величин вертикальной составля-

Таблица 6. Сравнение расчетного и наблюдаемого распределения концентраций кислорода-18 в грунтовом горизонте по окончании процедуры калибровки перетекания из болотного в грунтовый горизонт

№ скважины	$\delta^{18}\text{O}$, ‰ (модельное)	$\delta^{18}\text{O}$, ‰ (наблюденное)
359	-12,1	-12,5
360	-13,2	-13,1
374	-10,7	-10,8
377	-12,4	-12,3
375	-12,5	-12,4
376	-12	-12,2
378	-12,5	-12,7
379	-12,4	-12,7
369	-12,6	-12,5
365	-12,5	-12,8
366	-13,2	-13,1
367	-12,3	-12,5

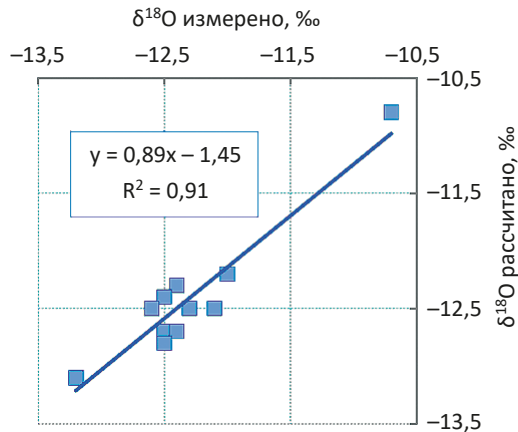


Рис. 28. Сравнение расчетного и наблюдаемого распределения концентраций кислорода-18 в грунтовом горизонте

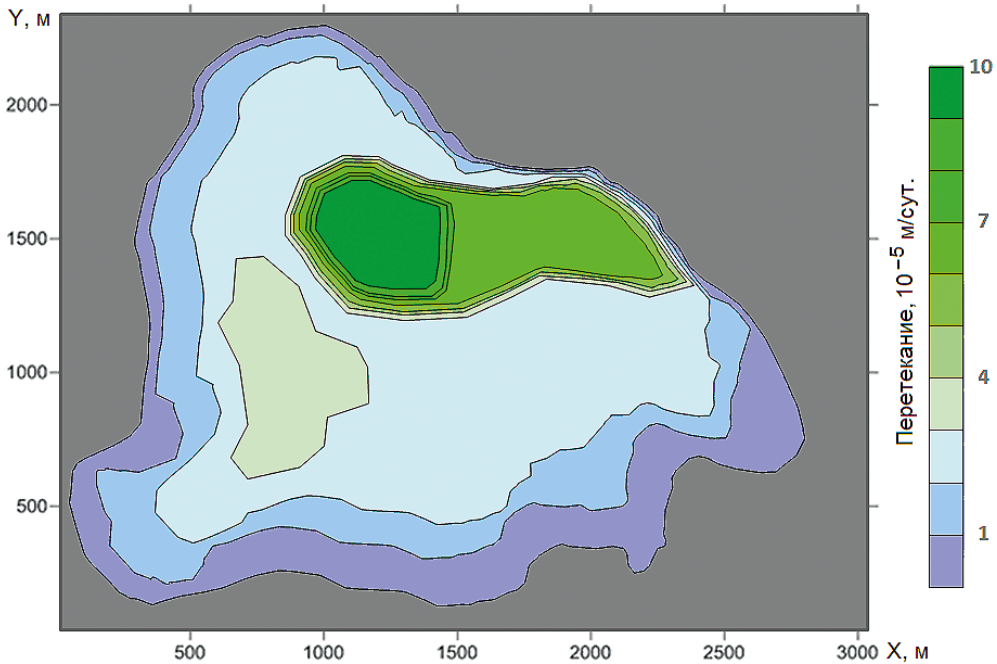


Рис. 29. Модельное распределение величины вертикальной составляющей фильтрационного потока (перетекания в области развития торфяной залежи и инфильтрационного питания вне ее) для второго модельного слоя, полученное по окончании процедуры калибровки коэффициентов вертикальной фильтрации при использовании в качестве критерия подобия концентраций кислорода-18 в грунтовом горизонте

ющей фильтрационного потока (перетекания в области развития торфяной залежи и инфильтрации вне ее) по результатам подбора коэффициентов вертикальной фильтрации представлены на рис. 29.

Сравнение оценок инфильтрационного питания грунтового горизонта полученных на стационарной фильтрационной и миграционной моделях обнаруживает, что по абсолютной величине они оказываются схожи. Суммарный объем перетекания из болотного в грунтовой горизонт, полученный при калибровке на миграционной модели, превышает таковой, полученный на фильтрационной модели, примерно на 7 %.

Пространственное распределение перетекания, оцененное по миграционной модели, заметно отличается от такового на фильтрационной модели. В частности, существенно расширилась область повышенных коэффициентов вертикальной фильтрации в северной и северо-восточной части болотного массива.

Последнее, как это следует из изотопных данных, обусловлено местной конденсацией пара, происходящего за счет потерь воды из озер Две Сестры

(дополнительный источник питания). Конденсация в указанной зоне происходит более интенсивно, по-видимому, вследствие того, что эта часть болотного массива менее залесена, а лес, произрастающий на этом участке, имеет меньший возраст, чем в южной и юго-западной частях болота. Поэтому суточные перепады температур оказываются значительно больше, чем на остальной части массива.

Заключение

Выполнены многолетние (2012–2016 гг.) наблюдения за изотопным составом атмосферных осадков, речных болотных и грунтовых вод на полигоне ГПИ Ламмин-Суо. Проведено опытно-фильтрационное опробование сети наблюдательных скважин для определения параметров болотного и грунтового горизонтов. Проанализированы многолетние наблюдения за режимом выпадения осадков и поверхностным стоком с болотного массива.

Наблюдениями над уровнями воды в скважинах на болотный и грунтовый горизонты обнаружено наличие разрыва давлений, указывающего на перетекание из первого во второй. Выявлено, что на основании стандартных гидрометрических наблюдений и гидрогеологического опробования оценка перетекания из болотного горизонта в грунтовый не может быть выполнена, поскольку:

- отсутствуют данные по коэффициентам вертикальной (в крест напластования) фильтрации;
- фильтрационный поток имеет трехмерную структуру;
- величина потерь на эвапотранспирацию оценивается по аналитическим зависимостям (расчетным путем) весьма приблизительно.

Наблюдениями зафиксировано стабильное отличие изотопного состава болотных вод от грунтовых, что позволяет использовать эти данные для расчета перетекания. Расчет объема сосредоточенного питания грунтового горизонта, обусловленного перетеканием болотных вод, проведен на математической (численной) модели объекта.

Приближенная оценка инфильтрационного питания и перетекания выполнена на стационарной фильтрационной модели. В качестве критерия подобия использовались данные по распределению напоров в болотном и грунтовом горизонтах, а также данные по стоку.

Уточнение величины перетекания выполнено на миграционной (транспортной) модели. Время полного водообмена в болотной системе оценено величиной около 500 лет, что существенно превышает характерные времена сезонных вариаций $\delta^{18}\text{O}$ и $\delta^2\text{H}$ в осадках. Это позволяет использовать для рас-

чета потерь воды из болотного горизонта за счет перетекания в грунтовый следующие данные.

1. Натурно зафиксированные распределения содержаний кислорода-18 и дейтерия в болотных водах (источнике питания грунтового горизонта) в качестве постоянной начальной концентрации в торфяной залежи (первом модельном слое) и инфильтрационном питании в пределах болотного массива. Изотопный состав этой составляющей питания близок к составу весенних и осенних осадков.
2. Региональную оценку изотопного состава воды в грунтовом горизонте в качестве начальной (до разбавления болотными водами) величины и состава инфильтрационного питания вне площади развития торфяной залежи. Изотопный состав инфильтрационного питания в этой области близок к средневзвешенному составу осадков за холодный период года.

Сравнение расчетных оценок инфильтрационного питания грунтового горизонта и перетекания из болотного горизонта, полученных на фильтрационной и миграционной моделях, обнаруживает их сходимость по абсолютной величине (разница не превышает 7%). Однако на миграционной модели обнаружено заметное пространственное перераспределение коэффициентов вертикальной фильтрации в пределах торфяной залежи, по сравнению с фильтрационной моделью.

Таким образом, показано, что для расчетов величины инфильтрационного питания грунтовых вод и сосредоточенного питания за счет перетекания из торфяной залежи (болото верхового типа) могут быть использованы данные по изотопному составу воды. Применение изотопных данных в качестве критерия подобия существенно сокращает затраты времени на выполнение оценочных работ и повышает надежность расчетов.

Литература

- Araguás-Araguás L., Frohlich K., Rozansky K. 2000. Deuterium and oxygen-18 isotope composition of precipitation and atmospheric moisture. *Hydrological processes* 14: 1341–1355.
- Arnoux M., Barbecot F., Gibert-Brunet E., Gibson J., Noret A. 2017. Impacts of changes in groundwater recharge on the isotopic composition and geochemistry of seasonally ice-covered lakes: insights for sustainable management. *Hydrology and Earth System Sciences. Discussions*. doi:10.5194/hess-2017-184, 2017.
- Bouwer H., Rice R. C. 1976. A slug test method for determining hydraulic conductivity of unconfined aquifers with completely or partially penetrating wells. *Water Resources Research* 12(3): 423–428.

- Bowen G.J., Kennedy C.D., Liu Z., Stalker J. 2011. Water balance model for mean annual hydrogen and oxygen isotope distributions in surface waters of the contiguous United States. *Journal of geophysical research* 116: G04011, doi:10.1029/2010JG001581.
- Branfireun B. A., Roulet N. T. 1998. The baseflow and storm flow hydrology of a precambrian shield headwater peatland. *Hydrological processes* 12: 57–72.
- Craig H. 1961. Isotopic variations in meteoric waters. *Science* 133(3464): 1702–1703.
- Dam J.C.van, Feddes R.A. 2000. Numerical simulation of infiltration, evaporation and shallow groundwater levels with the Richards equation. *Journal of Hydrology* 233: 72–85.
- Dansgaard W. 1964. Stable isotopes in precipitation. *Tellus* 16(4): 436–463.
- Mook W.G. (ed.). 2001. *Environmental isotopes in the hydrological cycle Principles and applications. International Hydrological Programme (IHP-V)*. No. 39, Vol. I: Introduction. Theory, methods, review; Vol. II: Atmospheric water; Vol. III: Surface water; Vol. IV: Groundwater, saturated and unsaturated zone; Vol. V: Man's impact on groundwater systems acrobaticon; Vol. VI: Modelling. Paris, UNESCO.
- Ferronsky V.I., Polyakov V.A. 2012. *Isotopes of the Earth's Hydrosphere*. Springer, Netherlands.
- Gibson J.J., Edwards T.W.D., Prowse T.D. 1996. Development and validation of an isotopic method for estimating lake evaporation. *Hydrological processes* 10: 1369–1382.
- Gosselin J.-S., Rivard C., Martel R., Lefebvre R. 2016. Application limits of the interpretation of near-surface temperature time series to assess groundwater recharge. *Journal of Hydrology* 538: 96–108. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2016.03.055>.
- Hagemann R., Niff G., Roth E. 1970. Absolute isotopic scale for deuterium analysis of natural waters. Absolute D/H ratio for SMOW. *Tellus* 22(6): 712–715.
- Kite G.W., Droogers P. 2000. Comparing evapotranspiration estimates from satellites, hydrological models and field data. *Journal of Hydrology* 229: 3–18.
- Ladouche B., Probst A., Viville O., Idir S., Baque O., Loubet M., Probst J.-L., Bariac T. 2001. Hydrograph separation using isotopic, chemical and hydrological approaches (Strengbach catchment, France). *Journal of Hydrology* 242(3–4): 255–274.
- Levy Z.F., Siegel D.I., Dasgupta S.S., Glaser P.H. and Welker J.M. 2014. Stable isotopes of water show deep seasonal recharge in northern bogs and fens. *Hydrological Processes* 228: 4938–4952. DOI: 10.1002/hyp.9983.
- Perras E.L. 2016. *Hydrological and Geochemical Implications of Aquifer Depressurization on Expansive Peatland Systems in the Hudson/James Bay Lowlands*. A thesis Presented to the University of Waterloo in fulfilment of the thesis requirement for the degree of Master of Science in Geography. Waterloo, Ontario, Canada.
- Price J.S., Edwards T.W.D., Yi Y., Whittington P.N. 2009. Physical and isotopic characterization of evaporation from Sphagnum moss. *Journal of Hydrology* 369: 175–182. doi:10.1016/j.jhydrol.2009.02.044.
- Richey D.G., McDonnell J.J., Erbe M.W., Hurd T.M. 1998. Hydrograph separations based on chemical and isotopic concentrations: a critical appraisal of published studies from New Zealand, North America and Europe. *Journal of Hydrology (NZ)* 37(2): 95–111.
- Ruhoff A.L., Paz A.R., Aragao L.E.O.C., Mu Q., Malhi Y., Collischonn W., Rocha H.R., Running S.W. 2013. Assessment of the MODIS global evapotranspiration algorithm using

- eddy covariance measurements and hydrological modeling in the Rio Grande basin. *Hydrological Sciences Journal* 58(8): 1–19.
- Wells C., Ketcheson S., Price J. 2017. Hydrology of a wetland-dominated headwater basin in the Boreal Plain, Alberta, Canada. *Journal of Hydrology* 547: 168–183. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhydrol.2017.01.052>
- Yurtsever Y. and Gat J. Atmospheric waters. Gat J. R., Gonantini R. (Eds.) 1981. Stable Isotope Hydrology: Deuterium and Oxygen-18 in the Water Cycle. *IAEA Tech. Rep. Series* 210: 103–142.
- Блютген И. 1972–1973. *География климатов*: в 2 т. Сокр. пер. с нем. А. С. Чаплыгиной; предисл. и ред. С. П. Хромова. Москва, Прогресс.
- Батуева В. И., Новикова С. М. (ред.). 2018. *Гидрометеорологический режим и водный баланс верховых болот Северо-Запада России (на примере болота Ламмин-Суо)*. С.-Петербург, Нестор-История (в печати).
- Гриневский С. О. 2012. *Оценка инфильтрационного питания и ресурсов подземных вод на основе геогидрологических моделей*. Диссертация доктора геолого-минералогических наук: 25.00.07 — Гидрогеология. Москва, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова. 382 с. OD 71 13-4/21.
- Дюкарев Е. А. 2012. Амплитуда суточного хода температуры торфяной почвы. *Вестник Томского государственного университета. Сер. Биология* 365: 201–205.
- Иванов К. Е. 1975. *Водообмен в болотных ландшафтах*. Ленинград, Гидрометеоздат.
- Калюжный И. Л., Романюк К. Д. 2009. Испарение с болотных массивов зоны олиготрофных болот. *Вестник Томского ГПУ* 3 (81).
- Кошелева О. Н. 2017. *Гидрогеологические исследования на болотном полигоне Ламмин-Суо*. Выпускная квалификационная работа на звание магистра (специальность 05.04.01 «Геология»). Научный руководитель Коносовский П. К. Кафедра гидрогеологии. Институт наук о Земле. СПбГУ, 87 с.
- Лукнер Л., Шестаков В. М. 1986. *Моделирование миграции подземных вод*. Москва, Недра.
- Манштейн А. К. 2002. *Малоглубинная геофизика*. Пособие по спецкурсу. Министерство образования Российской Федерации. Новосибирский государственный университет, геолого-геофизический факультет. Новосибирск.
- Новиков С. М. 2010. Зеленогорская полевая экспериментальная база Государственного гидрологического института (к 60-летию со дня основания) *Метеорология и гидрология* 6: 125–128.
- Поляков В. А., Колесникова Л. Н. 1978. Некоторые региональные аспекты формирования изотопного состава атмосферных осадков. *Тезисы VII Всесоюзного симпозиума по стабильным изотопам в геохимии*. Москва, ГЕОХИ: 148–149.
- Рождественская В. Г. 1973. *Водный баланс болота Ламмин-Суо*. Сб. работ по гидрологии. № 11. Под ред. Л. И. Чеботарева и др. Ленинград, Гидрометеоздат: 129–139.
- Ферронский В. И., Поляков В. А. 2009. *Изотопия гидросферы Земли*. Москва, Научный мир.

Электронные ресурсы

<http://abratsev.ru/hydrosphere/bogs.html>, 15.09.2017.

http://www-naweb.iaea.org/napc/ih/IHS_resources_gnip.html, 15.09.2017.

<http://www.infoeco.ru/index.php?id=1091>, 12.02.2018.

Научное издание

НАУЧНЫЙ ПАРК СПбГУ
БИОМЕДИЦИНА, ЭКОЛОГИЯ, ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЕ

Корректор *Е. В. Величкина*
Компьютерная верстка *Ю. Ю. Тауриной*
Обложка *Е. Р. Куныгина*

Подписано в печать 25.12.2019. Формат 70×100¹/₁₆.
Печ. л. 10,25. Тираж 500 экз. Print-on-Demand. Заказ № .

Издательство Санкт-Петербургского университета.
199004, С.-Петербург, В. О., 6-я линия, 11.
Тел./факс +7(812)328-44-22
publishing@spbu.ru



publishing.spbu.ru

Типография Издательства СПбГУ. 199034, С.-Петербург, Менделеевская линия, д. 5.



ИЗДАТЕЛЬСТВО
САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКОГО
УНИВЕРСИТЕТА
publishing.spbu.ru

В сборнике представлены статьи, подготовленные по результатам исследований, проведенных на базе ресурсных центров Научного парка Санкт-Петербургского государственного университета.

Научный парк СПбГУ — это 26 ресурсных центров, оснащенных новейшим оборудованием; это система, формирующая вектор развития Санкт-Петербургского государственного университета как уникального центра исследований и разработок, в котором созданы условия для инновационного развития, модернизации и диверсификации экономики и научной среды.



9 785288 060267