

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Н. Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра микробиологии
и физиологии растений

**ОЦЕНКА АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ
ПОЛИАЗОЛИДИНАММОНИЯ, МОДИФИЦИРОВАННОГО
ГИДРАТ-ИОНАМИ ЙОДА**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 422 группы

Направление подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология
Биологического факультета
Лепшеевой Алены Олеговны

Научный руководитель

Доцент кафедры микробиологии

и физиологии растений, к.б.н., _____ Н. Ф. Шуршалова

Зав. кафедрой

Зав. кафедрой микробиологии и

физиологии растений, д.б.н., профессор _____ С. А. Степанов

Саратов 2016

Введение

Актуальность темы. Устойчивость к антибиотикам – это растущая нерешенная медицинская проблема. Устойчивость к новым лекарственным препаратам у микроорганизмов возникает быстрее, чем ученые успевают изменить арсенал антимикробных агентов.

В настоящее время основной формой существования (более 99%) бактерий является не свободно двигающиеся клетки, а специфически организованные и связанные с поверхностью субстрата сообщества, получившие название биопленок, образование которых является сложным биологическим процессом, регулируется этот процесс не только сигналами из внешней среды, но и межклеточными связями.

Поэтому одной из главных проблем является лечение инфекций, ассоциированных с биопленками, и она представляет значительные трудности [1]. Наиболее актуальными видами бактерий, образующих биопленки при инфекциях, являются стафилококки, представители семейства *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, представители рода *Candida* и др.

Одним из перспективных путей преодоления лекарственной устойчивости микроорганизмов, образующих биопленки, является поиск и внедрение в практику новых антибактериальных веществ, в том числе с отличным от широко применяемых антибиотиков строением и механизмом действия. В связи с этим особое внимание проявляется в отношении новых полимерных соединений с различными модификациями. Поэтому, поиск веществ с антибактериальной активностью среди новых модифицированных полимерных соединений и изучение их биологического действия на различные микроорганизмы является актуальной задачей, определившей необходимость проведения настоящего исследования и позволившей сформулировать его цель и задачи.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы явилось изучение антимикробной активности нового полимерного соединения

полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода в отношении тест-штаммов стандартных и клинических микроорганизмов.

Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

1. Определить антимикробную активность биополимера ПААГ-М с гидрат-ионами йода на стандартные тест-штаммы грамположительных и грамотрицательных бактерий, и низших грибов рода *Candida*.

2. Оценить антимикробное действие модифицированного полимера по отношению к клиническим тест-штаммам грибов рода *Candida*.

3. Изучить влияние полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, на адгезивные свойства стандартного и клинических штаммов *Candida albicans*.

Материалы и методы. В работе в качестве экспериментальных моделей по изучению антимикробной активности новых полимерных соединений были использованы стандартные и клинические грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы.

Объектом исследования явился биосовместимый полимер полиазолидинаммоний, модифицированный гидрат-ионами йода (ПААГ-М), синтезированный сотрудниками кафедры информационной безопасности автоматизированных систем Саратовского государственного технического университета имени Ю. А. Гагарина. Данное исходное соединение представляет собой неограниченно растворимый в воде биополимер с молекулярной массой 100-200 кДа и содержанием гидрат-ионов йода 100 мкг/мл [2]. По результатам комплексных токсикологических испытаний он был отнесен к IV классу токсичности [3]. По структуре ПААГ-М является полиэлектролитом, относящимся к классу поликатионов с высокой плотностью заряда, неограниченно растворим в воде. Полимер является хорошим пленкообразователем, при этом его поверхность имеет четкую ячеистую структуру с размером ячейки порядка 500×500 нм. В работе были

использованы модификации данного полимера с различным содержанием гидрат-ионов йода (250, 500, 1000, 1500 мкг/мл).

Определение чувствительности ко всем исследуемым вариантам полимера проводили методом двукратных серийных разведений в бульоне Мюллера-Хинтона, содержащих различные концентрации изучаемых соединений [4].

Адгезивную активность изучали экспресс-методом на свежих эритроцитах 0(I) Rh(+), которую оценивали с помощью иммерсионной микроскопии по индексу адгезии микроорганизма (ИАМ). Опытные образцы предварительно инкубировали с добавлением сублетальных концентраций ПААГ-М в течение 6 часов [5].

Структура и объем работы. Диплом изложен на 53 страницах, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы, список использованных источников. Работа включает 5 таблиц и 2 рисунка. Список использованных источников включает в себя 51 наименований.

Основное содержание работы

На первом этапе работы нами была изучена антимикробная активность биосовместимого полимера полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода (ПААГ-М) на модели стандартных тест-штаммов бактерий и грибов рода *Candida*.

В ходе проведенных исследований было установлено, что полимерное соединение проявляло различную антибактериальную активность по отношению ко всем стандартным тест-штаммам микроорганизмов.

Полимер ПААГ-М характеризовался самым эффективным антибактериальным действием в отношении грамположительных бактерий – *S. aureus* 209 P и *B. cereus* 8035. МПК для каждого из этих микроорганизмов составила 32 мкг/мл и 250 мкг/мл соответственно, причем при данных концентрациях проявлялось бактерицидное действие вещества.

В отношении *E. coli* 113-13 ПААГ-М обладал бактерицидным действием в концентрации 500 мкг/мл.

Концентрация ПААГ-М 1000 мкг/мл для *P. aeruginosa* ATCC 27853 оказывала бактериостатическое действие, однако при воздействии соединения в концентрации 500 мкг/мл синегнойная палочка утрачивала способность к пигментообразованию.

В отношении *Candida* 16 изучаемый полимер ПААГ-М проявлял фунгиостатическое действие в концентрации 1000 мкг/мл.

В ходе работы была проведена оценка чувствительности исследуемых штаммов микроскопических грибов к широко используемым противогрибковым препаратам флуконазолу и к амфотерицину В, согласно общепринятой методике [6].

Установлено, что 60% штаммов (*C. albicans* №1, 3, 5, 6, 7, 9) чувствительно как к флуконазолу, так и к амфотерицину В. Остальные штаммы (*C. albicans* №2, 4, 8, 10) были устойчивы к обоим препаратам.

Поскольку предварительно наименьшая чувствительность к ПААГ-М была отмечена в отношении клеток микроскопических грибов, представляло интерес подобрать оптимальный вариант модификации полимера, характеризующегося противогрибковой активностью в отношении клинических тест-штаммов *C. albicans*.

Для повышения эффективности препарата было проведено насыщение исходного полимерного соединения гидрат-ионами йода и определена их антимикробная активность.

Установлено, что через сутки культивирования, независимо от отношения к противогрибковым препаратам, во всех опытных разведениях образцов полимера отсутствовал видимый рост исследуемых штаммов микроскопических грибов, в отличие от контрольных образцов. Через сутки культивирования значения МПК ПААГ-М_{0,25} для клинических изолятов *C. albicans* №1,2,3 составляли 1,6 мг/мл, для № 5,7,9,10 – 3,1 мг/мл, №4,6,8 – 6,2 мг/мл. Показатели МПК ПААГ-М_{0,5} для изолятов № 2 и 3 по сравнению с

показателями для ПААГ-М_{0,25} были в 4 раза выше (6,2 мг/мл), а изоляты № 4 и 6, наоборот, проявили большую чувствительность к ПААГ-М_{0,5}.

Для остальных клинических изолятов *C. albicans* значения МПК данных образцов были сопоставимы и не зависели от концентрации гидрат-ионов йода в составе полимера. МПК ПААГ-М₁ и ПААГ-М_{0,25} также практически не отличались между собой для всех изолятов. Вариант полимера с максимальным содержанием гидрат-ионов йода ПААГ-М_{1,5} (1500 мкг/мл) по сравнению с остальными образцами согласно значениям МПК проявил меньшую активность в отношении подавляющего большинства штаммов. Следует отметить, что среди 4 устойчивых к амфотерицину и флуконазолу тест-штаммов кандидат только один (№ 8) проявил низкую чувствительность к ПААГ-М (МПК ПААГ-М₁–6,2; ПААГ-М_{1,5} –12,4 мг/мл). Согласно значениям МПК для каждого из образцов полимера отмечено преобладание антимикотической активности первых трех образцов над ПААГ-М_{1,5} с максимальной концентрацией гидрат-ионов йода.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что варианты полимера с повышенным содержанием гидрат-ионов йода обладают противогрибковой активностью в отношении клинических тест-штаммов *C. albicans*. Отсутствующая взаимосвязь между отношением к флуконазолу и амфотерицину и чувствительность к исследуемому полимеру доказывают различные механизмы их действия.

По сравнению с другими образцами препарата, ПААГ-М с максимальным содержанием гидрат-ионов йода обладает меньшей активностью в отношении исследуемых клинических штаммов *C. albicans*, что может быть связано с экранирующим эффектом молекул полимера. Очевидно, что молекулы полимера при взаимодействии с клетками микроскопических грибов претерпевают конформационные изменения, частично ослабляя окислительную активность части гидрат-ионов йода. Эти предположения, безусловно, требуют дальнейшего изучения. Необходимо

отметить, что полученные значения МПК различных образцов ПААГ-М достаточно высоки по сравнению с МПК противогрибковых препаратов для энтерального и парэнтерального применения. Однако эти значения не превышают концентрации рабочих растворов широко применяемых антисептиков и дезинфектантов. Благодаря отсутствию раздражающего эффекта, препараты ПААГ-М с содержанием гидрат-ионов йода 0,25, 0,5 и 1,0 мг/мл могут рассматриваться в качестве перспективных антисептических и дезинфицирующих средств с противогрибковой активностью [7].

Также изучали влияние сублетальной концентрации (250 мкг/мл) исходного полимерного соединения ПААГ-М, на адгезивные свойства стандартного и клинических штаммов *Candida albicans*. Используя рабочую сублетальную концентрацию полимера (это 1/4 от МПК=1000 мкг/мл), мы исключили отрицательное действие этого соединения на клетки тест-штаммов кандид.

Оценку адгезивных свойств микроскопических грибов проводили по показателю индекса адгезии микроорганизма (ИАМ).

Было установлено, что исходно по показателям ИАМ стандартный штамм *C. albicans* 16 характеризовался как среднеадгезивный, а все клинические штаммы – как высокоадгезивные. Обработка клеток ПААГ-М приводила к снижению адгезивных свойств стандартного и клинических штаммов *C. albicans* до неадгезивного уровня. Вероятно, это связано с влиянием ПААГ-М на их клеточную стенку и блокировкой гликопротеиновых фибрилл, обеспечивающих процесс неспецифической адгезии.

Таким образом, полученные результаты открывают перспективы использования полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, для обработки изделий медицинского назначения с целью снижения адгезивных свойств микроорганизмов, нарушая тем самым процесс формирования микробных биопленок.

Заключение

Устойчивость к антибиотикам – это растущая нерешенная медицинская проблема. Устойчивость к новым лекарственным препаратам у микроорганизмов возникает быстрее, чем ученые успевают изменить арсенал антимикробных агентов.

В настоящее время основной формой существования (более 99%) бактерий является не свободно двигающиеся клетки, а специфически организованные и связанные с поверхностью субстрата сообщества, получившие название биопленок, образование которых является сложным биологическим процессом, регулируется этот процесс не только сигналами из внешней среды, но и межклеточными связями.

Поэтому одной из главных проблем является лечение инфекций, ассоциированных с биопленками, и она представляет значительные трудности [2].

Формирование биопленок в очаге воспаления ведет к хронизации инфекционного процесса и сопровождается неудовлетворительными результатами антибиотикотерапии. Наиболее актуальными видами бактерий, образующих биопленки при инфекциях, являются стафилококки, представители семейства *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, представители рода *Candida* и др. Непатогенные бактерии, комменсалы человека, существуют также в виде сложных мультивидовых сообществах, образуя микроценозы кожи, кишечника, слизистых.

Проблема взаимодействия биопленок нормальной микрофлоры человека с иммунной системой интенсивно изучается и дискутируется [8]. Все вышесказанное обуславливает необходимость глубоких и разносторонних исследований биопленок микроорганизмов, механизмов регуляции и генетического контроля их образования, методов борьбы с биопленками патогенных бактерий, обладающих множественной лекарственной устойчивостью [9].

Одним из перспективных путей преодоления лекарственной устойчивости микроорганизмов, образующих биопленки, является поиск и внедрение в практику новых антибактериальных веществ, в том числе с отличным от широко применяемых антибиотиков строением и механизмом действия. В связи с этим особое внимание проявляется в отношении новых биосовместимых полимерных соединений, или биополимеров, значение которых в химии живого ничуть не меньше, а разнообразие проявлений даже заметно шире, чем у белков, жиров и углеводов.

Поэтому, поиск веществ с антибактериальной активностью среди новых модифицированных биополимерных соединений и изучение их антибактериального действия на различные микроорганизмы является актуальной задачей, определившей необходимость проведения настоящего исследования и позволившей сформулировать его цель и задачи.

В связи с вышеизложенным, целью данной работы явилось изучение антимикробной активности нового полимерного соединения полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода в отношении тест-штаммов стандартных и клинических микроорганизмов.

На первом этапе работы была изучена антимикробная активность биосовместимого полимера полиазолидиламмония, модифицированного гидрат-ионами йода (ПААГ-М) на модели стандартных тест-штаммов бактерий и грибов рода *Candida*.

В ходе проведенных исследований было установлено, что полимерное соединение проявляло различную антибактериальную активность по отношению ко всем стандартным тест-штаммам микроорганизмов.

Полимер ПААГ-М характеризовался самым эффективным антибактериальным действием в отношении грамположительных бактерий – *S. aureus* 209 P и *B. cereus* 8035. МПК для каждого из этих микроорганизмов составила 32 мкг/мл и 250 мкг/мл соответственно, причем при данных концентрациях проявлялось бактерицидное действие вещества.

В отношении *E. coli* 113-13 ПААГ-М обладал бактерицидным действием в концентрации 500 мкг/мл.

Концентрация ПААГ-М 1000 мкг/мл для *P. aeruginosa* ATCC 27853 оказывала бактериостатическое действие, однако при воздействии соединения в концентрации 500 мкг/мл синегнойная палочка утрачивала способность к пигментообразованию.

В отношении *Candida* 16 изучаемый полимер ПААГ-М проявлял фунгиостатическое действие в концентрации 1000 мкг/мл.

Таким образом, на первом этапе работы была установлена антимикробная активность биосовместимого полимера ПААГ-М по отношению к стандартным тест-штаммам грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также дрожжеподобных грибов рода *Candida*.

На втором этапе работы была проведена оценка чувствительности исследуемых штаммов микроскопических грибов к широко используемым противогрибковым препаратам флуконазолу и к амфотерицину В, согласно общепринятой методике.

Установлено, что 60% штаммов (*C. albicans* №1, 3, 5, 6, 7, 9) чувствительно как к флуконазолу, так и к амфотерицину В. Остальные штаммы (*C. albicans* №2, 4, 8, 10) были устойчивы к обоим препаратам.

Поскольку предварительно наименьшая чувствительность к ПААГ-М была отмечена в отношении клеток микроскопических грибов, представляло интерес подобрать оптимальный вариант модификации полимера, характеризующегося противогрибковой активностью в отношении клинических тест-штаммов *C. albicans*.

Для повышения эффективности препарата было проведено насыщение исходного полимерного соединения гидрат-ионами йода и определена их антимикробная активность.

Установлено, что через сутки культивирования, независимо от отношения к противогрибковым препаратам, во всех опытных разведениях

образцов полимера отсутствовал видимый рост исследуемых штаммов микроскопических грибов, в отличие от контрольных образцов. Через сутки культивирования значения МПК ПААГ-М_{0,25} для клинических изолятов *S. albicans* №1,2,3 составляли 1,6 мг/мл, для № 5,7,9,10 – 3,1 мг/мл, №4,6,8 – 6,2 мг/мл. Показатели МПК ПААГ-М_{0,5} для изолятов № 2 и 3 по сравнению с показателями для ПААГ-М_{0,25} были в 4 раза выше (6,2 мг/мл), а изоляты № 4 и 6, наоборот, проявили большую чувствительность к ПААГ-М_{0,5}.

Для остальных клинических изолятов *S. albicans* значения МПК данных образцов были сопоставимы и не зависели от концентрации гидрат-ионов йода в составе полимера. МПК ПААГ-М₁ и ПААГ-М_{0,25} также практически не отличались между собой для всех изолятов. Вариант полимера с максимальным содержанием гидрат-ионов йода ПААГ-М_{1,5} (1500 мкг/мл) по сравнению с остальными образцами согласно значениям МПК проявил меньшую активность в отношении подавляющего большинства штаммов. Следует отметить, что среди 4 устойчивых к амфотерицину и флуконазолу тест-штаммов кандидат только один (№ 8) проявил низкую чувствительность к ПААГ-М (МПК ПААГ-М₁–6,2; ПААГ-М_{1,5} –12,4 мг/мл). Согласно значениям МПК для каждого из образцов полимера отмечено преобладание антимикотической активности первых трех образцов над ПААГ-М_{1,5} с максимальной концентрацией гидрат-ионов йода.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что варианты полимера с повышенным содержанием гидрат-ионов йода обладают противогрибковой активностью в отношении клинических тест-штаммов *S. albicans*. Отсутствующая взаимосвязь между отношением к флуконазолу и амфотерицину и чувствительность к исследуемому полимеру доказывают различные механизмы их действия.

Принимая во внимание, что в составе полимера присутствует йод, не исключено, что вследствие окисления основных компонентов, оказывается

повреждающее действие на мембрану микроскопических грибов. По сравнению с другими образцами препарата, ПААГ-М с максимальным содержанием гидрат-ионов йода обладает меньшей активностью в отношении исследуемых клинических штаммов *C. albicans*, что может быть связано с экранирующим эффектом молекул полимера. Очевидно, что молекулы полимера при взаимодействии с клетками микроскопических грибов претерпевают конформационные изменения, частично ослабляя окислительную активность части гидрат-ионов йода. Эти предположения, безусловно, требуют дальнейшего изучения. Необходимо отметить, что полученные значения МПК различных образцов ПААГ-М достаточно высоки по сравнению с МПК противогрибковых препаратов для энтерального и парэнтерального применения. Однако эти значения не превышают концентрации рабочих растворов широко применяемых антисептиков и дезинфектантов. Благодаря отсутствию раздражающего эффекта, препараты ПААГ-М с содержанием гидрат-ионов йода 0,25, 0,5 и 1,0 мг/мл могут рассматриваться в качестве перспективных антисептических и дезинфицирующих средств с противогрибковой активностью.

Далее было изучено влияние полиазилидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, на адгезивные свойства стандартных и клинических тест-штаммов *Candida albicans*.

Адгезия микроорганизмов является первым этапом взаимодействия как с клетками макроорганизма, так и с инертными поверхностями изделий медицинского назначения, что обеспечивает начальные этапы формирования биопленок и способствует развитию тяжелых осложнений различных инфекций.

Поэтому представляло интерес изучить влияние сублетальной концентрации (250 мкг/мл) исходного полимерного соединения ПААГ-М, на адгезивные свойства стандартного и клинических штаммов *Candida albicans*. Используя рабочую сублетальную концентрацию полимера (это 1/4 от

МПК=1000 мкг/мл), мы исключили отрицательное действие этого соединения на клетки тест-штаммов кандид.

Оценку адгезивных свойств микроскопических грибов проводили по показателю индекса адгезии микроорганизма (ИАМ).

Было установлено, что исходно по показателям ИАМ стандартный штамм *C. albicans* 16 характеризовался как среднеадгезивный, а все клинические штаммы – как высокоадгезивные. Обработка клеток ПААГ-М приводила к снижению адгезивных свойств стандартного и клинических штаммов *C. albicans* до неадгезивного уровня.

Вероятно, это связано с влиянием ПААГ-М на их клеточную стенку и блокировкой гликопротеиновых фибрилл, обеспечивающих процесс неспецифической адгезии.

Таким образом, полученные результаты открывают перспективы использования полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, для обработки изделий медицинского назначения с целью снижения адгезивных свойств микроорганизмов, нарушая тем самым процесс формирования микробных биопленок.

Выводы:

1. Минимальные подавляющие концентрации (МПК) полиазолидинаммония (ПААГ-М), модифицированного гидрат-ионами йода для *Staphylococcus aureus* 209 P и *Bacillus cereus* 8035 составляют 32 мкг/мл. В отношении *Escherichia coli* 113-13 данный полимер обладает бактерицидной активностью в концентрации 250 мкг/мл.

2. Полимер ПААГ-М в концентрации 1000 мкг/мл оказывает бактериостатическое действие на тест-штамм *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, и фунгиостатическую активность в отношении *Candida albicans* 16.

3. Установлено, что модификации полимера с повышенным содержанием гидрат-ионов йода (250, 500, 1000, 1500 мкг/мл) обладают противогрибковой активностью в отношении клинических тест-штаммов *Candida albicans*.

4. Полимер ПААГ-М с максимальным содержанием гидрат-ионов йода (1500 мкг/мл) обладает меньшей активностью в отношении исследуемых клинических штаммов *Candida albicans*, что может быть связано с экранирующим эффектом молекул полимера. Наиболее эффективное действие проявил вариант полимера с содержанием ионов йода 1000 мкг/мл.

5. Обработка клеток стандартных и клинических штаммов *Candida albicans* полимером ПААГ-М в сублетальной концентрации 250 мкг/мл приводит к снижению адгезивных свойств тест-штаммов до неадгезивного уровня.

Список использованных источников:

1. Ильина, Т. С. Биопленки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и система регуляции их развития / Т. С. Ильина, Ю. М. Романова, А. Л. Гинцбург // Генетика. 2004. Т. 40, №11. С. 1–12.
2. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания МУК 4.2.1890.04 // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2004. Т. 6, №4. С. 306–359.
3. Меншиков, В. В. Лабораторные методы исследования в клинике / В. В. Меншиков. М.: Медицина, 1987. 365 с.
4. Ашмарин, И. П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И. П. Ашмарин, А. А. Воробьев. Л.: Изд-во мед. лит., 1986. 184 с.
5. Брилис, В. И. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов / В. И. Брилис, Т. А. Брилене, Х. П. Ленцнер, А. А. Ленцнер // Лабораторное дело. 1986. №4. С. 210–212.
6. Саттон, Д. Определитель патогенных и условно-патогенных грибов / Д. Саттон, А. Фотергилл, М. Ринальди. М.: Мир, 2001. 486 с.
7. Пхакадзе, Т. Я. Антисептические и дезинфицирующие средства в профилактике нозокомиальных инфекций / Т. Я. Пхакадзе // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2002. Т. 4, №1. С. 42–48.
8. Гостев, В. В. Бактериальные биопленки и инфекции / В. В. Гостев, С. В. Сидоренко // Журнал инфектологии. 2010. Т. 2, №3. С. 5–9.
9. Плакунов, В. К. Микробные биопленки: перспективы использования при очистке сточных вод / В. К. Плакунов, Ю. А. Николаев // Вода: химия и экология. 2008. №2. С. 11–13.