

УДК: 619.615.33.576.8

DOI: 10.15372/KhUR20160610

Синтез N-октил- и N-фенилзамещенных (co)полимеров полиалкилгуанидинового ряда и их антимикробная активность по отношению к условно-патогенным микроорганизмам

С. А. СТЕЛЬМАХ^{1,2}, Н. М. ГАРКУШЕВА¹, О. С. ОЧИРОВ¹, М. Н. ГРИГОРЬЕВА¹, А. Е. СТЕЛЬМАХ³, В. Б. БАТОВЕВ¹, Д. М. МОГНОНОВ^{1,2}¹Байкальский институт природопользования Сибирского отделения РАН,
Улан-Удэ, Россия

E-mail: s_stelmakh@bk.ru

²Бурятский государственный университет,
Улан-Удэ, Россия³Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления,
Улан-Удэ, Россия

(Поступила 13.01.16; после доработки 11.04.16)

Аннотация

Синтезированы N-алкил- и N-фенилзамещенные производные полигексаметиленгуанидин гидрохлорида и исследована их антимикробная активность по отношению к условно-патогенным микроорганизмам. Физико-химическими методами анализа исследовано строение и молекулярно-массовые характеристики полученных полимеров и сополимеров.

Определение антимикробной активности (co)полимеров проводилось на грамположительных и грамотрицательных бактериях (*B. cereus* и *E. coli* соответственно). В качестве полимерного тест-образца выбран полигексаметиленгуанидин гидрохлорид (ПГМГГх), который широко применяется в качестве действующего вещества во многих современных дезинфекционных средствах. Оценку антибактериальных свойств проводили на основе метода серийных разведений в агаре. Установлено, что *E. coli* обладает наибольшей чувствительностью к N-октилзамещенным продуктам с высокой степенью замещения. Эффективность алкилированных полигуанидинов обусловлена сорбцией макромолекулы на бактериальную клеточную стенку в результате гидрофобных взаимодействий за счет октильных заместителей, которые играют роль гидрофобных структурных элементов в данных соединениях. Как следствие, с увеличением гидрофобности растет антимикробная активность. Максимальной антимикробной активностью из N-фенилзамещенных образцов обладают (co)полимеры с низкой степенью замещения. С увеличением содержания заместителя в полимерной цепи их активность по отношению к исследуемым бактериям линейно снижается до уровня, сопоставимого с тест-образцом. В отличие от N-октилзамещенных сополимеров, большей чувствительностью к N-фенилзамещенным образцам обладают бактерии *B. cereus*.

Таким образом, N-октилзамещенные и N-фенилзамещенные (co)полимеры превосходят полигексаметиленгуанидин гидрохлорид по проценту редукции в 2–4 раза. Полученные (co)полимеры являются перспективными материалами для разработки высокоэффективных дезинфекционных средств на их основе.

Ключевые слова: поликонденсация, полигуанидины, дезинфекционные свойства, антибактериальные свойства

ВВЕДЕНИЕ

Развитие устойчивости патогенных микроорганизмов к неблагоприятным факторам, включая мероприятия по дезинфекции, в последние десятилетия приобрело глобаль-

ный характер. Так, отмечается повышение резистентности микроорганизмов к действию ультрафиолетового излучения [1] и известных дезинфекционных средств (ДС), включая препараты на основе третичных аминов, четвертичных аммонийных соединений (ЧАС) и по-

лигексаметиленгуанидин гидрохлорида (ПГМГгх) [2, 3]. Наиболее остро эта проблема стоит при борьбе с внутрибольничными инфекциями (ВБИ) из-за высокой вероятности осложнений течения болезни у пациентов, находящихся на стационарном лечении. Для подавления развития резистентности штаммов ВБИ традиционно применяется ротация ДС [4], однако, согласно данным мониторинга, этот подход недостаточно надежен, поскольку ко всем исследованным ДС имеются устойчивые штаммы ВБИ, причем частота их выявления в отношении препаратов на основе ЧАС и кислородсодержащих соединений растет [3].

Один из путей решения данной проблемы – разработка новых высокоэффективных дезинфектантов на основе полигуанидинов, обеспечивающих повышение чувствительности микроорганизмов к их действию [5]. Среди широко используемых соединений полигуанидинового ряда известны производные полигексаметиленгуанидина (ПГМГ), в частности гидрохлорид ПГМГ (ПГМГгх), на основе которого разработан ряд ДС [6], но эффективность их снижается. Тем не менее строение полигуанидинов открывает широкие возможности регулирования их биоцидной активности путем химической модификации макромолекул [7].

В настоящей работе синтезированы N-октил- и N-фенилзамещенные производные ПГМГгх и исследована их антимикробная активность по отношению к грамположительным

(Г+) и грамотрицательным (Г-) условно-патогенным микроорганизмам *Bacillus cereus* (*B. cereus*) и *Escherichia coli* (*E. coli*) соответственно.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исходные вещества

Гуанидин гидрохлорид (ГГХ) использован без предварительной очистки (фирма Acros Organics, чистота 99 %, $T_{пл} = 185-189$ °С). Гексаметилендиамин (ГМДА) очищали методом перегонки при температуре 205 °С, сбор фракции осуществляли в интервале 202–205 °С. *n*-Октиламин (фирма Acros Organics, 99+ %) применялся без предварительной очистки. N,N'-дифенилгуанидин (ДФГ) очищали перекристаллизацией из этилового спирта ($T_{пл} = 150-151$ °С). N,N'-дифенилгуанидин гидрохлорид (ДФГгх) получали путем растворения ДФГ в растворе 0.1 М HCl и последующего концентрирования и перекристаллизации. Полученный продукт представляет собой белые игольчатые кристаллы, хорошо растворимые в воде ($T_{пл} = 130-131$ °С).

Синтез (со)полимеров

Полигексаметиленгуанидин гидрохлорид и N-фенилзамещенный ПГМГгх получали ме-

ТАБЛИЦА 1

Состав, соотношение исходных веществ и молекулярно-массовые характеристики полученных (со)полимеров

Номер п/п	Молярное соотношение исходных веществ				M_n	[η], дл/г	Степень замещения, %
	ГГХ	ДФГгх	ГМДА	<i>n</i> -октиламин			
1	1	0	1	0	810	0.048	0
2	1	0	1	0.1	1020	–	10
3	1	0	1	0.2	800	–	20
4	1	0	1	0.3	790	–	30
5	1	0	1	0.5	660	–	50
6	0.9	0.1	1	0	1010	0.056	10
7	0.8	0.2	1	0	700	0.050	20
8	0.7	0.3	1	0	730	0.052	30
9	0.5	0.5	1	0	660	0.050	50
10	0.25	0.75	1	0	860	0.053	75
11	0	1	1	0	1040	0.058	100

тодом поликонденсации в расплаве соответствующих эквимольных количеств ГМДА и гуанидинсодержащих мономеров в две стадии в течение 6 ч. Первый этап синтеза при 165 °С проводили в течение 2,5 ч, затем температуру повышали до 185 °С. Синтез N-октил-замещенных полимеров осуществляли *in situ* путем добавления определенного количества алкилирующего агента (*n*-октиламин) к эквимольному количеству ГМДА и ГГХ в аналогичных условиях (табл. 1). Полученные полимерные продукты растворяли в дистиллированной воде, фильтровали через фильтр Шота № 1 и затем высушивали при 90–100 °С. После удаления воды полимеры сушили в вакуумном пистолете при 78 °С и давлении 3,7 МПа до постоянной массы. Исходя из соотношений исходных реагентов рассчитана степень замещения гуанидиновых групп в полученных (со)-полимерах для N-октилзамещенных

$$\%_{N-Alk} = \frac{V_{N-окт}}{V_{ГГХ}} \cdot 100 \% \quad (1)$$

и для N-фенилзамещенных сополимеров:

$$\%_{N-Ph} = \frac{V_{ДФГ}}{V_{ГГХ} + V_{ДФГ}} \cdot 100 \% \quad (2)$$

где v – количество соответствующих реагентов (см. табл. 1).

Методы исследования

Характеристическую вязкость $[\eta]$ ПГМГх и N-фенилзамещенных (со)полимеров определяли на вискозиметре Убеллоде с висязчим уровнем (диаметр капилляра 0,56 мм) при температуре 20 °С в водном растворе 0,3 М NaCl для подавления полиэлектролитного эффекта. Вязкость N-октилзамещенных продуктов не определяли, поскольку в растворе 0,3 М NaCl при концентрациях сополимеров, необходимых для определения вязкости, наблюдалось помутнение их растворов.

Среднечисловую молекулярную массу M_n находили методом определения концевых групп путем обратного титрования водных растворов полимеров [8] по формуле

$$M_n = \frac{m}{C_1 V_1 - C_2 V_2} \quad (3)$$

где m – навеска полимера, г; C_1 , C_2 – концентрация растворов HCl и NaOH соответ-

ственно, моль/л; V_1 – объем раствора HCl, добавленный к раствору полимера, л; V_2 – объем раствора NaOH, израсходованный на титрование, л.

ИК-спектроскопические исследования выполнены на ИК-Фурье спектрометре Alpha (Bruker, Германия) на приставке МНВПО с кристаллом ZnSe в диапазоне волновых чисел 550–4000 см^{-1} . Сравнение ИК-спектров проводилось с помощью программы Bio-Rad Laboratories IR Search Master™ 6.5.

Для определения биоцидной активности полученных сополимеров использовали тест-объекты *E. coli* и *B. cereus*. Оценку антибактериальных свойств проводили на основе метода серийных разведений в агаре. Для получения вегетативных клеток культуры *E. coli* и *B. cereus* инкубировали в жидкой питательной среде при аэробных условиях в шейкере-инкубаторе BIOSAN ES-20 (180 мин^{-1} , 37 °С) в течение 24 ч. Вегетативные клетки каждого тест-объекта готовили в стерильном буферном растворе из соответствующих односуточных культур методом предельных разведений [9]. Полученные бактериальные суспензии содержали от 10^2 до 10^3 КОЕ/мл. В асептических условиях тщательно смешивали 20 мл агаризованного мясopептонного бульона, разогретого до 50 °С, и 0,05, 0,025 мл 1 % раствора исследуемых (со)полимеров непосредственно в чашке Петри. Параллельно с чашками Петри, содержащими растворы (со)полимеров, для контроля роста тест-объектов готовили чашки без антимикробных препаратов. После застывания агаризованного бульона и подсушивания чашек производили инокуляцию по 0,1 мл суспензии *E. coli* и *B. cereus* на подготовленные твердые питательные среды в пяти повторностях и инкубировали в термостате при 37 °С в течение 24 ч для подсчета выживших КОЕ. Полученные данные сведены в табл. 2.

Биоцидные свойства образцов оценивали с помощью процента редукции $\%R$ микроорганизмов, определенного по формуле [10]

$$\%R = 100 - \frac{NT \cdot 100}{NK}$$

где NK – количество микробных клеток в контроле; NT – количество микробных клеток в опыте.

ТАБЛИЦА 2

Антибактериальное действие (со)полимеров на *E. coli* и *B. cereus*

Номер образца	Количество колоний на твердой питательной среде, ±SD			
	<i>E. coli</i>		<i>B. cereus</i>	
	Количество	(со)полимера, мл	Количество	(со)полимера, мл
	0.05	0.025	0.025	0.05
Контроль*	156±1.58	136±1.58	190±1.22	399±1.67
1	101±1.41	112±2.07	166±1.87	263±1.51
2	70±1.73	78±1.41	–	73±1.14
3	0	73±2.00	–	188±1.41
4	0	65±1.58	–	165±1.22
5	0	51±1.51	–	146±1.87
6	34±2.00	–	147±2.12	49±1.22
7	49±1.87	–	96±1.87	60±2.34
8	53±1.41	–	110±2.23	106±1.58
9	76±1.73	–	107±1.58	140±1.87
10	103±2.00	–	156±2.34	205±1.87
11	120±2.44	–	151±1.41	210±1.73

Примечание. Прочерк – не определяли.

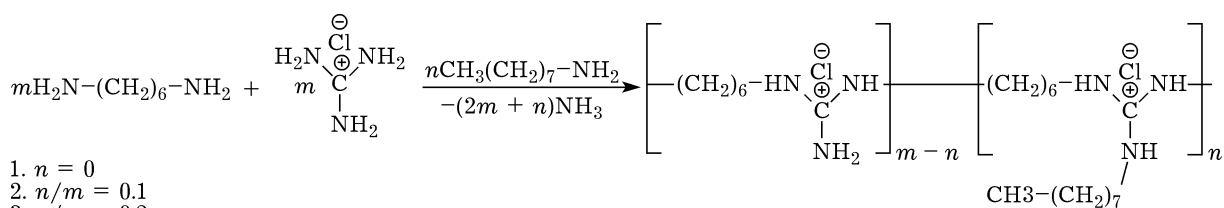
* Контроль – питательная среда без антимикробных препаратов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез N-октилзамещенных сополимеров проводили по схеме 1.

Согласно механизму реакции диаминов и солей гуанидинов [11], взаимодействие ГМДА и ГГХ приводит к формированию полимерной цепи, тогда как *n*-октиламин, реагируя по третьей аминогруппе гуанидина, образует алкилированный структурный фрагмент. Прототипом предложенного пути реакции является образование гелей ПГМГх, при котором избыток от эквимолярного соотношения ГМДА приводит к образованию центров ветвления [12]. Образец № 1 (см. табл. 1), синтезированный без использования алкилирующего агента, представляет собой незаме-

щенный ПГМГх, а образцы № 2–5 содержат различное количество N-октилзамещенных гуанидиновых групп, поэтому их можно рассматривать как сополимеры ГМДА/ГГХ/N-октилзамещенный ГГХ. Соплимер, содержащий более половины алкилированных гуанидиновых групп, при данных условиях синтеза получить не удастся, поскольку остается не прореагировавший *n*-октиламин вследствие равновесного характера поликонденсации аминов и солей гуанидинов [13]. Это подтверждается данными ИК-спектроскопии при анализе характеристических полос, соответствующих исходному амину (на спектре наблюдаются полосы, отвечающие строению только *n*-октиламина – слабая полоса при 955 см⁻¹ и широкая интенсивная полоса при 800 см⁻¹,



1. $n = 0$
2. $n/m = 0.1$
3. $n/m = 0.2$
4. $n/m = 0.3$
5. $n/m = 0.4$

Схема 1.

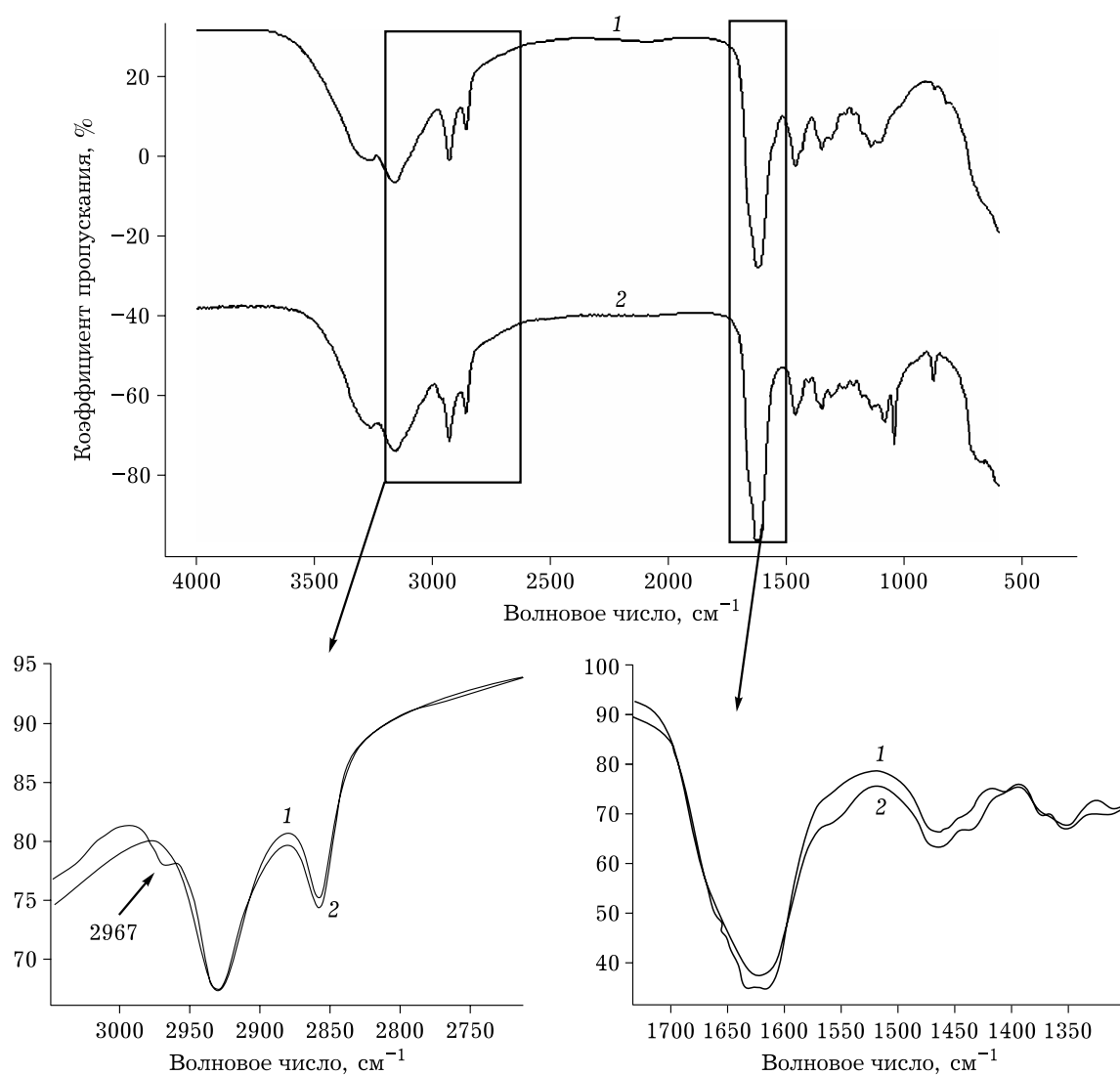


Рис. 1. ИК-спектры образцов № 1 (1) и 5 (2).

соответствующая скелетному колебанию молекулы).

На рис. 1 представлены ИК-спектры ПГМГтх (образец № 1) и N-октилзамещенного ПГМГтх (образец № 5).

На спектрах полосы в области 3270 и 3160 см^{-1} соответствуют валентным колебаниям аминогрупп; поглощение в области 2930 и 2855 см^{-1} – валентные ассиметричные и симметричные колебания группы CH_2 соответственно, область 1470 см^{-1} – деформационные колебания CH_2 , полоса в области 1630 см^{-1} – характеристическая для солей гуанидинов. Для образца № 5 наблюдается отчетливое плечо при 2967 см^{-1} , соответствующее валентным колебаниям CH_3 [14]. Расщепление гуаниди-

новой полосы связано с наличием в структуре полимерной цепи как N-октилзамещенных, так и незамещенных по третьей аминогруппе гуанидиновых звеньев. Кроме того, расщепление может быть вызвано формированием моно- и диоктилзамещенных концевых гуанидиновых группировок. Отнесение полос при 1050 и 880 см^{-1} до конца не ясно, однако подобные рефлекссы в области 1100 – 1000 см^{-1} наблюдались для ди- и триалкилзамещенных солей гуанидинов в работе [15]. Следует отметить, что ИК-спектры всех полученных N-октилзамещенных полимеров имеют схожий характер. Отличие заключается в интенсивности плеча при 2967 см^{-1} , и пиков при 1050 и 880 см^{-1} , причем их интен-

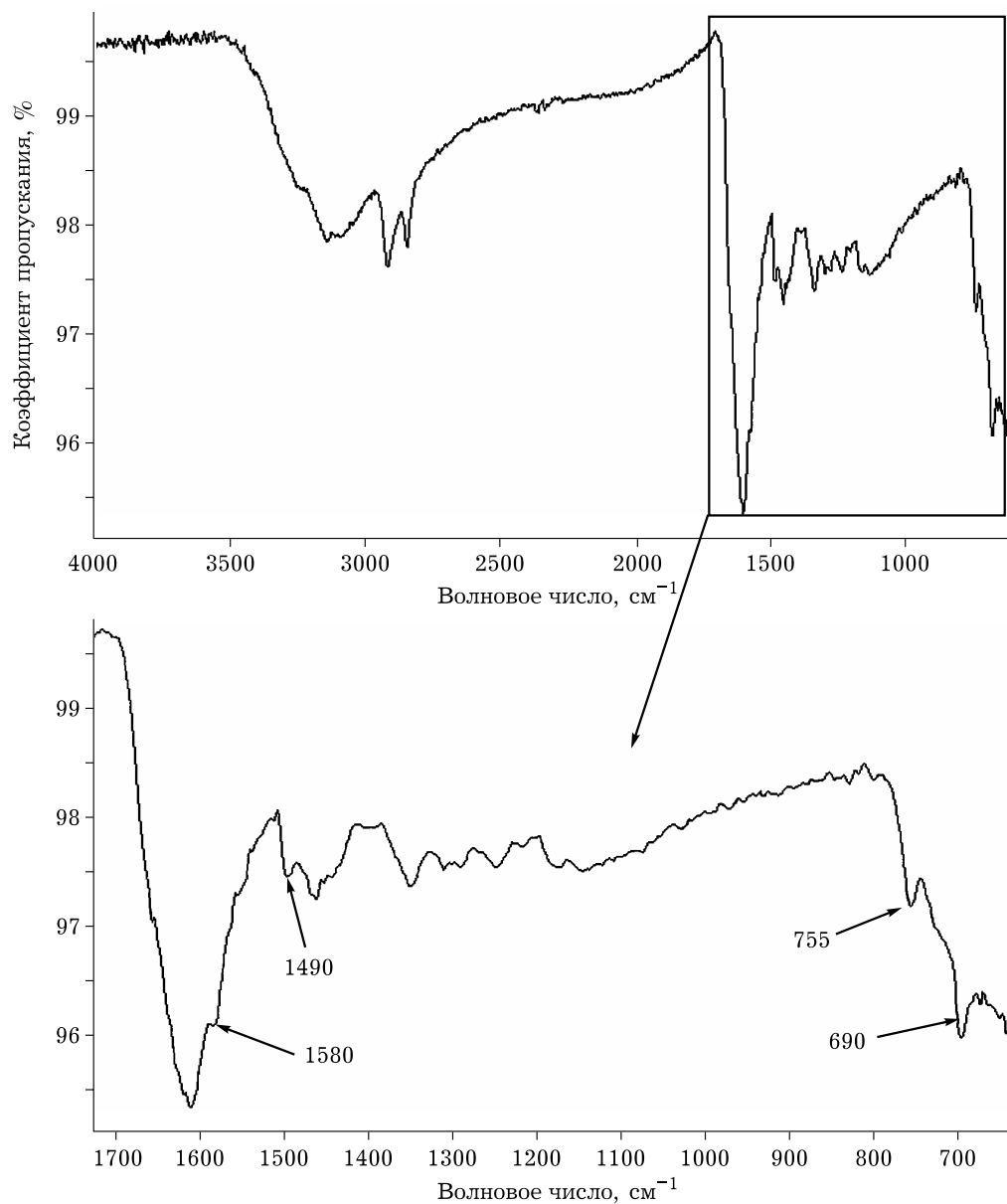
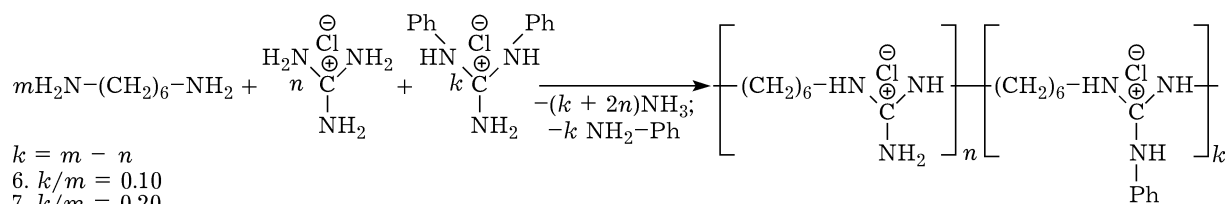


Рис. 2. ИК-спектры образца № 9.

сивность возрастает с увеличением содержания алкилированного фрагмента.

Синтез N-фенилзамещенных сополимеров проводили по схеме 2.



- $k = m - n$
 6. $k/m = 0.10$
 7. $k/m = 0.20$
 8. $k/m = 0.30$
 9. $k/m = 0.50$
 10. $k/m = 0.75$
 11. $k/m = 1.00$

Схема 2.

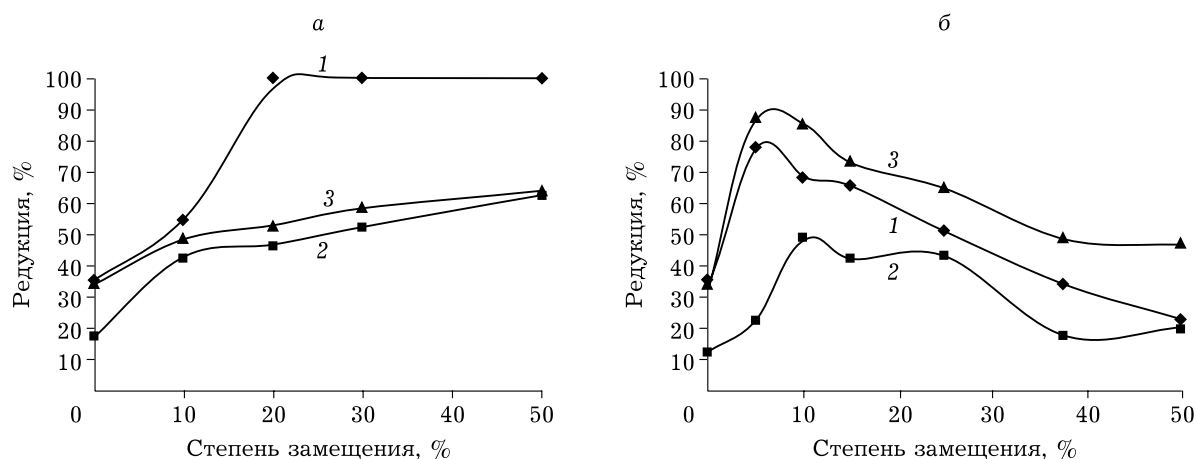


Рис. 3. Зависимость процента редукции микроорганизмов от степени замещения для N-октил- (а) и N-фенилзамещенных (б) сополимеров ПГМГтх (0 % – образец № 1) при различном содержании 1 % растворов *E. coli* (1, 2) и *V. cereus* (3) в питательной среде, мл: 0.05 (1, 3), 0.025 (2).

N-фенилзамещенный ПГМГтх (образец № 11) впервые был получен в работе [11]. Очевидно, что варьирование соотношения ГГХ/ДФГтх при сохранении эквимольности гуанидинсодержащих мономеров и ГМДА приведет к образованию сополимеров с различным числом N-фенилзамещенных фрагментов. На рис. 2 представлен ИК-спектр образца № 9, который содержит половину N-фенилзамещенных гуанидиновых групп относительно их общего числа.

Принципиальное отличие от ИК-спектра образца № 1 (см. рис. 1) заключается в сигналах, характерных для монозамещенного бензольного кольца: 755 и 690 см^{-1} – пять смежных атомов водорода бензольного кольца; 1580 (плечо) и 1490 см^{-1} – колебания бензольного кольца [14]. ИК-спектры образцов № 6–11 аналогичны, интенсивность полос кольца снижается с уменьшением его содержания в структуре полимера. Для образцов № 6 и 7 полоса при 1580 см^{-1} маскируется сильным сигналом гуанидиновой группы.

Значения M_n для всех полученных (со)полимеров хорошо коррелируют с молекулярно-массовыми характеристиками линейных (со)полимеров полиалкилгуанидинового ряда с различной длиной углеводородного радикала, полученными нами ранее в работе [5].

При исследовании антимикробных свойств полученных (со)полимеров в качестве тест-образца выступал ПГМГтх (см. табл. 2, образец № 1), что обусловлено его широким при-

менением в качестве действующего вещества многих современных ДС. На рис. 3 представлены зависимости процента редукции от степени замещения N-октилзамещенных образцов (№ 2–5) и тест-препарата.

Г-бактерия *E. coli* обладает наибольшей чувствительностью к N-октилзамещенным продуктам. Так, при содержании 0.05 мл 1 % раствора (со)полимера в агаре ($\sim 5 \cdot 10^{-4}\text{ г}$ (со)полимера) и степени замещения 20 % и выше наблюдается 100 % редукция, т. е. полное угнетение ее роста. В аналогичных условиях рост Г+ бактерии *V. cereus* угнетается не более чем на 65 %, причем зависимость от степени замещения носит практически линейный характер. При уменьшении содержания (со)полимеров в два раза данная зависимость для *E. coli* повторяет таковую для *V. cereus*. Для представленного ряда экспериментов тест-образец демонстрирует минимальную антимикробную активность, процент редукции находится в пределах 17–36 %. Ранее мы показали [5], что первой стадией взаимодействия полимеров алкилгуанидинового ряда является сорбция макромолекулы на бактериальную клеточную стенку в результате гидрофобных взаимодействий. С увеличением гидрофобности возрастает антимикробная активность, что не противоречит полученным данным, поскольку октильные заместители являются гидрофобными структурными элементами данных соединений.

На рис. 3, б представлены зависимости процента редукации от степени замещения N-фенилзамещенных образцов (№ 6–11) и тест-препарата.

Наибольшей антимикробной активностью из N-фенилзамещенных образцов обладают сополимеры с низкой степенью замещения (10–20 %). С увеличением содержания заместителя в полимерной цепи их активность для исследуемых бактерий линейно снижается до уровня, сопоставимого с тест-образцом. В отличие от N-октилзамещенных сополимеров, большей чувствительностью к N-фенилзамещенным образцам обладают Г+ бактерии *B. cereus*.

Поскольку ряд сополимеров (образцы № 2–5, 6–8) обладает более выраженным антимикробным эффектом по сравнению с ПГМГх, при разработке ДС на их основе действующие концентрации могут быть значительно уменьшены при сохранении сопоставимого с ПГМГх антимикробного действия. Это позволит снизить антропогенную нагрузку на экосистемы и связанные с ней риски [16, 17].

Различия в чувствительности грамположительных и грамотрицательных бактерий по отношению к N-октилзамещенному ПГМГх можно объяснить различным строением их клеточной стенки. Для обоих видов бактерий первая стадия взаимодействия с полимерным продуктом характеризуется сорбцией макромолекул на их клеточную стенку в результате гидрофобных взаимодействий, что косвенно подтверждается увеличением их чувствительности с ростом содержания алифатического фрагмента в составе макромолекулы. Повышенная чувствительность *E. coli*, по видимому, связана с тем, что в результате сорбции поликатион легко диффундирует через внешний липидный слой и замещает стабилизирующие цитоплазматическую мембрану катионы, в результате чего нарушается ее проницаемость, а это в конечном итоге приводит к нарушению целостности. Поскольку клеточная стенка *B. cereus* в основном состоит из жесткого слоя пептидогликана и не имеет внешней липидной оболочки, сорбция поликатиона на ее поверхности сопровождается ростом градиента осмотического давления на границе клеточной стенки в результате локального увеличения концентрации противоионов полимера. Вероятно, это вызывает плазмолиз клетки, что приводит к час-

тичной гибели микроорганизмов и замедляет их размножение. В свете этих предположений резко возрастающий антибактериальный эффект низкозамещенных фенилсодержащих производных ПГМГх объяснить не удастся, и необходимы дальнейшие исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезированы N-октил- и N-фенилзамещенные (со)полимеры ПГМГх с различной степенью замещения, обладающие антимикробной активностью по отношению к Г+ и Г– условно-патогенным микроорганизмам. Показана высокая антимикробная активность N-октилзамещенных (со)полимеров с высокими и N-фенилзамещенных – с низкими степенями замещения по сравнению с ПГМГх, что представляет практический интерес для разработки высокоэффективных ДС на их основе.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Республики Бурятия в рамках научного проекта № 15-43-04205.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Gayan E., Serrano M. J., Pagan R., Alvarez I., Condon S. // *Food Microbiol.* 2015. Vol. 46, April. P. 246–253.
- 2 Шкарин В. В., Благодирова А. С., Ковалишенина О. В. // *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы.* 2012. № 3. С. 48–53.
- 3 Шкарин В. В., Саперкин Н. В., Ковалишенина О. В., Благодирова А. С., Широкова И. Ю., Кулюкина А. А. // *Мед. альманах.* 2012. № 3 (22). С. 122–125.
- 4 Методические рекомендации по применению метода аэрозольной дезинфекции в медицинских организациях. Методические рекомендации. М.: Фед. служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2015.
- 5 Grigor'eva M. N., Stel'makh S. A., Astakhova S. A., Tsenter I. M., Bazaron L. U., Batoev V. B., Mogonov D. M. // *J. Appl. Polym. Sci.* 2014. DOI: 10.1002/app.40319.
- 6 Воинцева И. И., Гембицкий П. А. Полигуанидины – дезинфекционные средства и полифункциональные добавки в композиционные материалы. М.: ЛКМ-пресс, 2009.
- 7 Григорьева М. Н., Стельмах С. А., Астахова С. А., Центер И. М., Базарон Л. У., Батоев В. Б., Могнонов Д. М. // *Хим.-фарм. журн.* 2015. Т. 49, № 2. С. 29–33.
- 8 Очиров О. С., Могнонов Д. М., Стельмах С. А. // *Журн. прикл. химии.* 2015. Т. 88, Вып. 2. С. 332–335.
- 9 Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. 91 с.
- 10 Мамонова И. А. Влияние наночастиц переходной группы металлов на антибиотикорезистентные штаммы

- микроорганизмов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2013. 23 с.
- 11 Стельмах С. А., Базарон Л. У., Могнонов Д. М. // Журн. прикл. химии. 2010. Т. 83, Вып. 2. С. 344–346.
- 12 Григорьева М. Н., Стельмах С. А., Базарон Л. У., Могнонов Д. М. // ЖПХ. 2011. Т. 84, Вып. 4. С. 689–691.
- 13 Григорьева М. Н., Стельмах С. А., Базарон Л. У., Могнонов Д. М. // Высокомол. соед. Сер. Б. 2014. Т. 56, № 3. С. 245–249.
- 14 Наканиси К. Инфракрасные спектры и строение органических соединений. М.: Мир, 1965.
- 15 Goto T., Nakanishi K., Ohashi N. // Bull. Chem. Soc. Jpn. 1957. Vol. 30, No 7. P. 723–725.
- 16 Tsydenova O., Batoev V., Batoeva A. // Int. J. Environ. Res. Public Health. 2015. Vol. 12, Issue 8. P. 9542–9561.
- 17 Khankhasaeva S. Ts., Dambueva D. V., Dashinamzhilova E. Ts., Gil A., Miguel A. V., Timofeeva M. N. // J. Hazard. Mater. 2015. Vol. 293. P. 21–29.

