

# RESEARCH NOTES

# НАУЧНЫЕ ЗАМЕТКИ

## ПРИМЕНЕНИЕ ПРОПИОНОВОГО АНГИДРИДА ПРИ ПОДГОТОВКЕ ПРОБ ДЛЯ СПОРОВО-ПЫЛЬЦЕВОГО АНАЛИЗА

Н. Г. Мазей<sup>1</sup> , Е. Ю. Новенко<sup>1,2,\*</sup> 

<sup>1</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия

<sup>2</sup>Институт географии РАН, Россия

\*e-mail: lenanov@mail.ru

Поступила: 01.03.2021. Исправлена: 04.06.2021. Принята к опубликованию: 06.06.2021.

Ацетолиз – важный этап подготовки проб для спорово-пыльцевого анализа. Однако, начиная с 1998 г., уксусный ангидрид  $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ , используемый для приготовления ацетолизной смеси, относится к прекурсорам, оборот которых в Российской Федерации ограничен и в отношении которых устанавливаются особые меры контроля. Мы предлагаем заменить уксусный ангидрид на пропионовый ангидрид  $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CO})_2\text{O}$ , в отношении которого нет подобных ограничений. Тестирование методики проведения ацетолиза с использованием пропионового ангидрида на примере образцов торфа, отобранных на территории заповедника «Калужские засеки», показало высокую эффективность этого реактива.

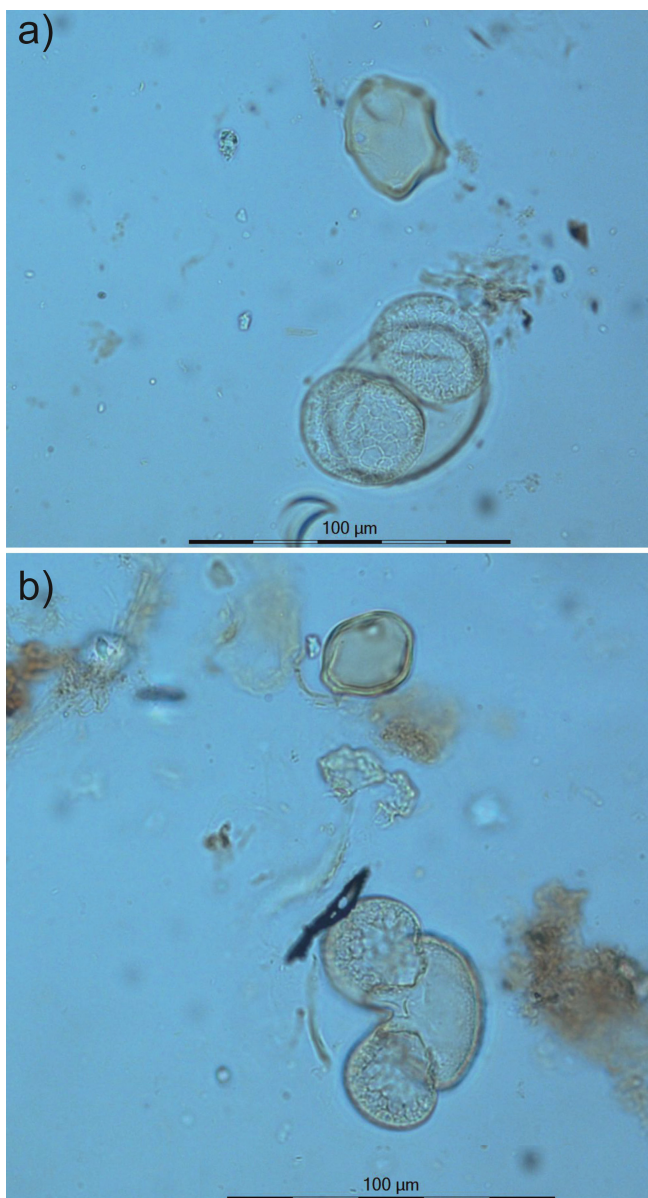
**Ключевые слова:** ацетолиз, уксусный ангидрид, палинологический анализ, пробоподготовка, заповедник «Калужские засеки»

Первые методики подготовки проб для спорово-пыльцевого анализа появились в начале XX в. В 1916 г. Леннарт фон Пост впервые описал щелочной метод подготовки образцов озерных и болотных отложений для палинологического анализа. Erdtman & Erdtman (1933) впервые предложили ацетолизный метод обработки проб, который заключается в обработке образца смесью ледяной уксусной кислоты и уксусного ангидрида. Erdtman (1943) применял эту смесь к слаборазложившимся торфам и для обработки рецентной пыльцы. Данный метод позволяет переводить целлюлозу, гемицеллюлозу и лигнин в растворенное состояние. В середине XX в. Fægri & Iversen (1950) опубликовали руководство по палинологическому анализу, в котором изложили методологические основы и модификацию метода обработки проб для анализа с использованием плавиковой кислоты и ацетолизной смеси.

В нашей стране большой вклад в разработку палинологического анализа внесли Гричук и За-клинская (1948). Предложенная ими методика для исследования минеральных отложений с небольшими усовершенствованиями активно используется до настоящего времени. На современном этапе развития метода спорово-пыльцевого анализа существуют различные модификации подготовки проб (Berglund & Ralska-Jasiewiczowa, 1986; Moore et al., 1991; Bennett & Willis, 2002), но общие принципы этих методик очень близки.

На заключительных этапах пробоподготовки часто используется процедура ацетолиза. Проведение этого этапа необходимо при изучении образцов торфа и почв. Как правило, несмотря на тщательность обработки, в полученном осадке кроме пыльцы и пелитовой части минералов, остаются и другие органические остатки. Собранный и обезвоженный осадок подвергается дополнительному воздействию ацетолизной смеси с целью разрушения целлюлозы и лигнина растительных клеток, а также протопласта пыльцы и спор. При этом пыльцевые зерна окрашиваются в желтый или светло-коричневый цвет (рис. а), что помогает при их идентификации.

Необходимый компонент ацетолизной смеси – уксусный ангидрид  $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ . Однако, согласно Постановлению Правительства Российской Федерации от 30.06.1998 г. №681 «Об утверждении перечня наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю», уксусный ангидрид отнесен к прекурсорам, оборот которых в Российской Федерации ограничен и в отношении которых устанавливаются особые меры контроля. В связи с этим приобретение, использование и хранение уксусного ангидрида в научных и учебных заведениях сопряжено с большими трудностями. Перед палинологами встала задача заменить уксусный ангидрид на другой реактив, в отношении которого нет подобных ограничений.



**Рис.** Фотографии ацетоллизированных пыльцевых препаратов под микроскопом с 400-кратным увеличением. Обозначения: а – обработка с применением уксусного ангидрида; б – обработка с применением пропионового ангидрида. Образцы торфа отобраны в заповеднике «Калужские засеки».

**Fig.** Photographs of pollen slides using microscope at 400× magnification. Designations: a – acetolysis using acetic anhydride, b – acetolysis using propionic anhydride. Peat samples were collected in the Kaluzhskie Zaseki State Nature Reserve.

При подборе реактива, который можно использовать при процедуре ацетолиза, мы принимали во внимание, что ацетоллиз – это частный случай ацидолиза. Ацидолиз является обменной реакцией между сложным эфиром или ацеталем и карбоновой кислотой в присутствии каталитического количества минеральной (серной) кислоты. При этом различают ацетоллиз (взаимодействие с уксусной кислотой и ее ангидридом), формолиз (с муравьиной кислотой) и т.д. (Кнунянц, 1988). Мы предлагаем заменить уксусный ангидрид при проведении ацидолиза пропионовым анги-

дридом ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CO}$ )<sub>2</sub>O. Процедура проводится следующим образом:

1. Отмытый в пробирке осадок заливают ледяной уксусной кислотой (1/2 пробирки). После откручивания в центрифуге кислоту сливают. Таким способом осадок освобождается от воды. Это необходимо, поскольку вода реагирует бурно (взрывоподобно) с ацетолизной смесью, и содержимое может выплеснуться из пробирки.

2. Готовится «ацетолизная смесь». В мерный стеклянный цилиндр к девяти частям пропионового ангидрида добавляют по каплям одну часть концентрированной серной кислоты. При этом полученная смесь сильно разогревается. «Ацетолизную смесь» необходимо использовать сразу после приготовления. Хранению она не подлежит.

3. «Ацетолизную смесь» добавляют к осадку (5 частей смеси на 1 часть осадка), размешивают и помещают в водяную баню при 80–90 °С на 3–5 мин.

4. После нагревания «ацетолизную смесь» удаляют из образца центрифугированием (скорость 1500 оборотов/мин), декантацией (сливанием) и последующей промывкой осадка сначала уксусной кислотой, а затем водой до исчезновения специфического запаха. Осадок подсушивают и заливают глицерином.

Для оценки качества обработки пропионовым ангидридом мы провели сравнение препаратов, обработанных с использованием уксусного и пропионового ангидридов. Тестирование было проведено на примере образцов среднеразложившегося торфа из пойменного болота, расположенного на территории заповедника «Калужские засеки». Серия из шести образцов была обработана по методике Moore et al. (1991). Образцы торфа подвергались кипячению в 10% растворе гидроксида калия в течение 10 мин. Затем образцы промывались дистиллированной водой через сито с размером ячеек 250 мкм для удаления крупных растительных остатков. После отстаивания в течение суток вода из стаканов аккуратно сливалась. Затем образцы были перелиты в пробирки, а остатки воды удалены центрифугированием (скорость 1500 оборотов/мин) и последующей декантацией. Затем проводилась процедура ацетолиза. Каждый образец был разделен на две части. Одна часть подверглась ацетоллизу с использованием уксусного ангидрида, а вторая – пропионового.

При тестировании препаратов под микроскопом образцы, обработанные пропионовым ангидридом, выглядели относительно чистыми, пыльцевые зерна хорошо окрашены (рис. б). Сравнение результатов исследования всей серии образцов

показало, что состав и соотношение компонентов спорово-пыльцевых спектров, таксономическое разнообразие пыльцы, спор и непольцевых палиноморф в пробах, подготовленных с использованием уксусного и пропионового ангидридов, близки. Результаты подсчетов микрофоссилий в пробах, обработанных разными реагентами, попарно сравнивали с помощью индекса Брея-Кертиса, значения которого варьируют от 0.93 до 0.97, что указывает на высокую степень сходства.

Для оценки различий в размерах пыльцевых зерен после применения уксусного ангидрида и пропионового ангидрида мы провели измерения длины пыльцевого зерна и высоты воздушных мешков *Pinus sylvestris* L. В обеих выборках длина пыльцевого зерна составила от 59.1 мкм до 62.5 мкм, высота воздушных мешков – от 30.8 мкм до 33.4 мкм. Достоверных различий по критерию Стьюдента между размерами пыльцевых зерен *Pinus sylvestris* после применения уксусного и пропионового ангидридов не выявлено ( $n = 30$ , длина пыльцевого зерна:  $t = 1.055$ ,  $p = 0.3$ ; высота воздушного мешка:  $t = 0.855$ ,  $p = 0.4$ ).

### Благодарности

Исследования выполнены по теме Государственного задания №0148-2019-0005, АААА-А19-119021990091-4.

### Литература

- Гричук В.П., Заклинская Е.Д. 1948. Анализ ископаемых пыльцы и спор и его применение в палеогеографии. М.: Географгиз. 224 с.
- Кнунянц И.Л. (ред.). 1988. Химическая энциклопедия. Т. 1. М.: Советская энциклопедия. 623 с.
- Bennett K.D., Willis K.J. 2002. **Pollen // Tracking Environmental Change Using Lake Sediments** / J.P.

- Smol, H.J.B. Birks, W.M. Last, R.S. Bradley, K. Alverson (Eds.). Dordrecht: Springer P. 5–32. DOI: 10.1007/0-306-47668-1\_2
- Berglund B.E., Ralska-Jasiewiczowa M. 1986. Pollen analysis and pollen diagrams // *Handbook of Holocene Palaeoecology and Palaeohydrology* / B.E. Berglund (Ed.). Wiley: Chichester. P. 455–484.
- Erdtman G. 1943. *An Introduction to Pollen Analysis*. Waltham: Chronica Botany Company. 239 p.
- Erdtman G., Erdtman H. 1933. The improvement of pollen-analysis technique // *Svensk Botanisk Tidskrift*. Vol. 27(3). P. 347–357.
- Fægri K., Iversen J. 1950. **Textbook of modern pollen analysis**. Copenhagen: Ejnar Munksgaard. 168 p.
- Moore P.D., Webb J.A., Collinson M.E. 1991. **Pollen Analysis**. Oxford: Blackwell. 216 p.

### References

- Bennett K.D., Willis K.J. 2002. Pollen. In: J.P. Smol, H.J.B. Birks, W.M. Last, R.S. Bradley, K. Alverson (Eds.): *Tracking Environmental Change Using Lake Sediments*. Dordrecht: Springer. P. 5–32. DOI: 10.1007/0-306-47668-1\_2
- Berglund B.E., Ralska-Jasiewiczowa M. 1986. Pollen analysis and pollen diagrams In: B.E. Berglund (Ed.): *Handbook of Holocene Palaeoecology and Palaeohydrology*. Wiley: Chichester. P. 455–484.
- Erdtman G. 1943. *An Introduction to Pollen Analysis*. Waltham: Chronica Botany Company. 239 p.
- Erdtman G., Erdtman H. 1933. The improvement of pollen-analysis technique. *Svensk Botanisk Tidskrift* 27(3): 347–357.
- Fægri K., Iversen J. 1950. *Textbook of modern pollen analysis*. Copenhagen: Ejnar Munksgaard. 168 p.
- Grichuk V.P., Zaklanskaya E.D. 1948. *Analysis of fossil pollen and spores and its application in paleogeography*. Moscow: Geografiz. 224 p. [In Russian]
- Knunyants I.L. (Ed.). 1988. *Chemical Encyclopedia*. Vol. 1. Moscow: Sovetskaya Entsiklopediya. 623 p. [In Russian]
- Moore P.D., Webb J.A., Collinson M.E. 1991. *Pollen Analysis*. Oxford: Blackwell. 216 p.

## THE USE OF PROPIONIC ANHYDRIDE IN THE SAMPLE PREPARATION FOR POLLEN ANALYSIS

Natalia G. Mazei<sup>1</sup>, Elena Yu. Novenko<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Lomonosov Moscow State University, Russia

<sup>2</sup>Institute of Geography of RAS, Russia

\*e-mail: lenanov@mail.ru

Acetolysis is an important stage in the sample treatment for pollen analysis. However, since 1998, acetic anhydride ( $\text{CH}_3\text{CO}$ )<sub>2</sub>O, used for the acetolysis solution preparation, refers to precursors which turnover is limited in Russia and its use needs measures for special control. We suggest replacing acetic anhydride with propionic anhydride ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CO}$ )<sub>2</sub>O, for which there are no such limitations. The procedure of sample treatment with propionic anhydride is the same as one with acetic anhydride. Testing an acetolysis procedure using propionic anhydride on peat samples collected in the Kaluzhskie Zaseki State Nature Reserve shows the high efficiency of this chemical agent.

**Key words:** acetic anhydride, acetolysis, Kaluzhskie Zaseki State Nature Reserve, palynological analysis, sample treatment