

**ВЕСТНИК БИОТЕХНОЛОГИИ
И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ
ИМЕНИ Ю.А. ОВЧИННИКОВА**

Научно-практический журнал

Основан в 2005 году

Главный редактор

Р.Г. Василов

Редакционная коллегия

В.С. Воробьев, Т.Н. Гаева, С.И. Матаев, А.А. Назаренко

Редакционный совет

В.Г. Дебабов (Москва), В.Т. Иванов (Москва), М.П. Кирпичников (Москва),
Э.И. Коломиец (Минск, Республика Беларусь), А.И. Мирошников (Москва),
Т.В. Овчинникова (Москва), В.О. Попов (Москва),
Э.М. Раманкулов (Астана, Республика Казахстан), А.Н. Решетилов (Пушино),
К.Г. Скрыбин (Москва), Э.К. Хуснутдинова (Уфа), Н.К. Янковский (Москва)

Журнал зарегистрирован в Россохранкультуре
Рег. ПИ № ФС77-19745 от 11 апреля 2005 г.

Зав. редакцией О.В. Воробьева

Адрес: 119071 Москва, Ленинский пр-т, 33

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: obr@biorosinfo.ru, ptashka095@rambler.ru

Учредитель и издатель:

АНО «Информационно-аналитический центр
медико-социальных проблем»

Адрес: 127581 Москва, Керамический проезд, 53, кор. 1

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: raifvasilov@mail.ru

Издается при поддержке

Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова

СОДЕРЖАНИЕ

Колонка главного редактора

К читателям. *Р.Г. Василов* 4

Оригинальные статьи

Влияние нефтезагрязнения почв на всхожесть и вегетативный рост сосудистых растений.
Х. Баутиста, Т.В. Багаева, Ш.Э. Валидов 5

Сезонная динамика содержания пигментов, полисахаридов, антиоксидантов, липидов вечнозеленого кустарничка *Ephedra distachya* L.
Е.С. Богданова, О.А. Розенцвет, Г.Н. Табаленкова, И.Г. Захожий 10

Морфологический анализ активного ила в совместной биологической и реагентной очистке сточных вод.
Й.В. Кобелева, А.С. Сироткин, Т.В. Вдовина, Е.В. Петрова, Э.Ф. Вознесенский, И.С. Мифтахов 17

Анаэробное разложение пищевых азокрасителей микробными сообществами, выделенными из кишечника млекопитающих.
Ю.В. Тактарова, И.Б. Котова, А.И. Нетрусов 24

Влияние арахидоновой кислоты на рост и синтез микотоксинов фитопатогенных грибов, поражающих люцерну.
Ж.Н. Шемшеева, О.Н. Шемшюра, А.К. Саданов, Н.Е. Бекмаханова, Г.А. Момбекова, С.В. Камзолова, И.Г. Моргунов 31

Создание культур бородатых корней *Withania somnifera* и оценка параметров их роста при выращивании на твердых и жидких питательных средах.
Е.В. Михайлова, Б.Р. Кулуев, Г.Р. Ясыбаева, А.В. Чемерис 40

Особенности роста культур генетически трансформированных (бородатых) корней табака и витании при изменении объема питательной среды.
Х.Г. Мусин, А.Б. Якупова, Е.В. Михайлова, Б.Р. Кулуев 46

Страницы истории

К 100-летию выхода в свет основополагающей работы Ф. д'Эрелля о бактериофагии.
В.С. Воробьев, О.В. Воробьева 51

Хроника

События первой половины 2017 года 75

Правила для авторов 78

CONTENTS

Column of the editor-in-chief

To readers. *R.G. Vasilov* 4

Original articles

Influence of oil pollution of soils on germination and vegetative growth of vascular plants.

H. Bautista, T.B. Bagaeva, Sh.Z. Validov 5

Seasonal dynamics of the content of pigments, polysaccharides, antioxidants, lipides of the evergreen *Ephedra distachya* L.

E.S. Bogdanova, O.A. Rozentsvet, G.N. Tabalenkova, I.G. Zakhochiy..... 10

Morphological analysis of active sludge in the simultaneous biological and reagent waste water treatment.

Y.V. Kobleva, A.S. Sirotkin, T.V. Vdovina, E.V. Petrova,

E.F. Voznesensky, I.S. Miftakhov 17

Anaerobic degradation of food azo dyes by microbial communities isolated from gastrointestinal tract of mammals.

Yu.V. Taktarova, I.B. Kotova, A.I. Netrusov..... 24

The effect of arachidonic acid for the growth and synthesis of mycotoxins of phytopathogenic fungi, attacked the alfalfa.

Zh.N. Shemsheeva, O.N. Shemshura, A.K. Sadanov, N.E. Bekmakhanova,

G.A. Mombekova, S.V. Kamzolova, I.G. Morgunov..... 31

Creation of *Withania somnifera* hairy root cultures and estimation of their growth parameters on solid and liquid medium.

E.V. Mikhaylova, B.R. Kuluev, G.R. Yasybaeva, A.V. Chemeris 40

Growth characteristics of tobacco and *Withania somnifera* hairy root cultures in different volume of flasks and nutrient media.

Kh.G. Musin, A.B. Yakupova, E.V. Mikhaylova, B.R. Kuluev 46

Pages of history

To the 100th anniversary of the publication of the fundamental work of F. d'Herelle about bacteriophagy.

V.S. Vorobyev, O.V. Vorobyeva 51

The chronicle

Events of the first half-year 2017 75

Rules for authors 78

К читателям

Во втором номере журнала за 2017 год собран ряд статей, объединенных общей тематикой. Конкретно речь идет об экологической биотехнологии. Так, в статье Баутисты Х. с коллегами (Казанский приволжский федеральный университет) приводятся данные о перспективных растениях, пригодных для фитобиоремедиации при нефтезагрязнениях почв.

В статье «Морфологический анализ активного ила в совместной биологической и реагентной очистке сточных вод» авторов Кобелевой И.В. и др. из Казанского национального исследовательского технологического университета была исследована зависимость оптимальных параметров агрегатов активного ила от размеров частиц компонентов наноструктурированных реагентных препаратов.

Коллектив ученых (Шемшеева Ж.Н. и др.) из Республики Казахстан и Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН из Пушкино провел исследование влияния арахидоновой кислоты на рост и синтез микотоксинов фитопатогенных грибов, поражающих люцерну. Высказано предположение, что арахидоновая кислота может быть использована как основа для создания экологически безопасного средства защиты кормовых культур от поражения токсинообразующими грибами.

Группа сотрудников из МГУ им. М.В. Ломоносова (Тактарова Ю.В., Котова И.Б., Нетрусов А.И.) провела скрининг восьми видов анаэробных сообществ, выделенных из желудочно-кишечного тракта различных млекопитающих, на способность разрушать пищевые азокрасители путем их метаногенной конверсии в биогаз. Авторы полагают, что вызванная пищевыми азокрасителями и их производными сукцессия микробных сообществ кишечника может негативно сказаться на здоровье человека и животных.

В статье Е.В. Михайловой с коллегами из Института биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН описываются создание культур бородатых корней *Withania somnifera* и оценка параметров их роста при выращивании на твердых и жидких питательных средах. Группа исследователей из Уфы (Мусин Х.Г. и др.) продолжила изучение особенностей роста культур генетически трансформированных (бородатых) корней табака и витании при изменении объема питательной среды.

Номер содержит также работу фундаментального плана: в публикации Богдановой Е.С. с коллегами проанализирован химический состав (углеводы, липиды, пигменты и др.) такого важного лекарственного растения, как *Ephedra dystachya*.

Наконец, в разделе «Страницы истории» помещен исторический материал, приуроченный к 100-летию выхода в свет основополагающей статьи Феликса д'Эреля об открытии феномена бактериофагии.

Главный редактор,
президент Общества биотехнологов России,
профессор Р.Г. ВАСИЛОВ

ВЛИЯНИЕ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕНИЯ ПОЧВ НА ВСХОЖЕСТЬ И ВЕГЕТАТИВНЫЙ РОСТ СОСУДИСТЫХ РАСТЕНИЙ

Х. БАУТИСТА*, Т.В. БАГАЕВА, Ш.З. ВАЛИДОВ

Казанский приволжский федеральный университет

Восстановление растительного покрова почв, загрязненных нефтью, требует выбора растений с определенными свойствами. В настоящем исследовании изучены пять видов растений, включая рожь (*Secale cereale*), ячмень (*Hordeum vulgare*), рапс (*Brassica napus*), люцерна посевная (*Medicago sativa*), травосмесь (овсяница красная — 70%, райграс многолетний — 20%, мятлик луговой — 10%). Данные растения были проверены на почве трех уровней загрязнения вязкой нефтью: 2, 3 и 4%. Результаты экспериментов показали, что наибольшей устойчивостью к нефтяным загрязнениям обладали семена люцерны, поскольку они сохраняли всхожесть и энергию прорастания в диапазоне загрязнения 2–3% и незначительно снижали эти показатели при 4% нефтезагрязнении. На втором месте по устойчивости к нефтяным загрязнениям стоят семена ячменя и травосмеси. Развитие надземной и подземной частей указанных растений также изменялось незначительно относительно контроля (водопроводная вода), что позволяет рекомендовать их в качестве растений для фитобиоремедиации.

Ключевые слова: фиторемедиация, нефть, всхожесть, энергия прорастания.

Введение

В настоящее время нефть и ее производные признаны главными загрязнителями окружающей среды. Это связано с тем, что нефть — наиболее используемый источник энергии [6, 7]. Она относительно легко добывается, транспортируется и перерабатывается в широкую гамму продуктов различного назначения. Все технологические процессы в нефтяной промышленности (разведка, бурение, добыча, сбор, транспорт, хранение и переработка) нарушают естественную экологическую обстановку [6, 16]. Аварийные и хронические разливы нефти приводят к быстрой потере продуктивности земель или полной деградациии ландшафтов; при этом частично или полностью уничтожается растительный покров, что повышает актуальность выбора устойчивых к нефтяным загрязнениям растений.

Растения для восстановления растительного покрова должны соответствовать определенным требованиям. Прежде всего, они должны обладать устойчивостью к повышенным концентрациям нефтяных загрязнений, расти в данной конкретной географо-климатической

зоне, обеспечивать максимальное развитие поверхности корня, быстро расти и не требовать значительных затрат на удобрение [8, 15]. Однако многие растения теряют свою способность к развитию на нефтезагрязненных почвах уже на первых этапах всхожести семян.

В исследованиях ряда авторов было сделано предположение, что нефтяные углеводороды могут создавать пленку вокруг семени и работать как физический барьер, предотвращая или уменьшая попадание воды и кислорода на семена, что приводит к потере их всхожести [4, 11].

Целью настоящего исследования были скрининг растений по устойчивости к нефтяному загрязнению и изучение влияния различных концентраций нефти на развитие растений.

Материалы и методы

Объектом исследований служили пять видов растений, включая рожь (*Secale cereale*), ячмень (*Hordeum vulgare*), рапс (*Brassica napus*), люцерна посевная (*Medicago sativa*) и травосмесь (овсяница красная — 70%, райграс многолетний — 20%, мятлик луговой — 10%).

В работе использовали вязкую нефть (кинематическая вязкость при 20 °C — 72,9 мм²/с) ОАО «Татнефть» Нурлатского месторождения Республики Татарстан. Содержание фракций по температуре кипения представлено в таблице 1.

© 2017 г. Баутиста Х., Багаева Т.В., Валидов Ш.З.

* **Автор для переписки:**

Баутиста Эспиноза Хьюго
кафедра биохимии и биотехнологии Казанского приволжского
федерального университета
E-mail: hbautistae@yahoo.com

Таблица 1
Характеристика нефти по содержанию фракций
с различной температурой кипения

№	Фракция °С	Масса (г)	%
1	53–75	2,26	1,25
2	75–100	1,39	0,77
3	100–125	1,92	1,06
4	125–150	3,64	2,01
5	150–175	2,99	1,66
6	175–200	4,31	2,39
7	200–225	5,63	3,12
8	225–250	6,12	3,39
9	250–300	12,61	6,98
10	300–350	10,2	5,65
11	350–400	18,98	10,51
12	Остаток	108,87	60,26
13	Итого	178,92	99,05
14	Потери	1,74	0,95

Для оценки растений на устойчивость к нефтяному загрязнению исследовали следующие параметры: всхожесть и энергию прорастания семян [10].

С этой целью на диски фильтровальной бумаги наносили нефть в концентрации 0,2, 0,3 и 0,4 г и помещали в чашки Петри. Для получения необходимой влажности в чашки вносили по 10 мл стерильной воды и раскладывали семена (25 штук) на расстоянии 0,5–1 см между ними. Культивирование семян растений проводили при комнатной температуре, при поддержке соответствующей влажности (70%). Всхожесть регистрировали по появлению проростков растений. Количество проросших семян (С) рассчитывали по формуле:

$$C = \frac{B}{A \times 100},$$

где А — число семян, В — всхожесть семян, %.

Энергию прорастания семян регистрировали на 3,5-е сутки выращивания растений в почве, искусственно загрязненной вязкой нефтью в концентрации 2, 3 и 4%. Влажность почвы составляла 70%.

Для определения влияния различных концентраций нефти на развитие растений проросшие семена высаживали в почву с нефтяным загрязнением (концентрация нефти 2, 3 и 4%, влажность — 70%). Растения выращивали в фитотроне при 23 ± 2 °С, 12-часовом све-

топериоде с освещенностью 100 Вт/м², в течение двух недель. Контролем служили образцы почв без нефтяного загрязнения.

Развитие растений регистрировали по изменению длины надземной и подземной частей проростка.

Эксперименты проводили в трех-пяти повторностях. Математическую обработку результатов осуществляли с помощью пакета компьютерных программ Minitab 17.10. При оценке статистической достоверности средних значений полученных данных использовали парный и непарный критерий t-Стьюдента. Группу данных считали однородной, если среднее квадратичное отклонение (Q) в группе не превышало 13%. Различие между группами считали достоверным при критерии вероятности ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Растения играют важную роль в детоксикации почв от различных поллютантов, включая нефтяные загрязнения. Они способны трансформировать токсические соединения, активировать деятельность микробного сообщества почв, интенсифицировать биохимические процессы [3, 14]. Тем не менее большинство растений, как сельскохозяйственных, так и представителей дикорастущей флоры, чувствительно к загрязнению почв нефтью, однако эта чувствительность значительно отличается у различных видов.

В наших экспериментах было показано, что среди изучаемых растений наибольшей устойчивостью к нефтяному загрязнению обладали семена люцерны, активность прорастания семян которой, при наиболее высокой концентрации нефти (4%), сохранялась на уровне 69–70% по сравнению с контролем (рис. 1). Не менее активны по всхожести были и семена ячменя и травосмеси, их всхожесть при данной концентрации нефти составляла (57–60%). Особенно чувствительными к нефтяному загрязнению оказались семена ржи, всхожесть семян которых даже при концентрации нефти 2% снижалась в 2 раза, а при концентрации 4% — в 5–6 раз. Семена рапса также были менее устойчивы к нефтяному загрязнению по сравнению с люцерной, ячменем и травосмесью.

Такие различия наблюдались и при определении энергии прорастания семян, то есть через 3,5 суток культивирования (рис. 2). Наибольшей энергией прорастания семян при всех вариантах нефтяного загрязнения обладали семена люцерны, затем ячменя и травосмеси. Самой слабой энергией прорастания обладали семена ржи и рапса.

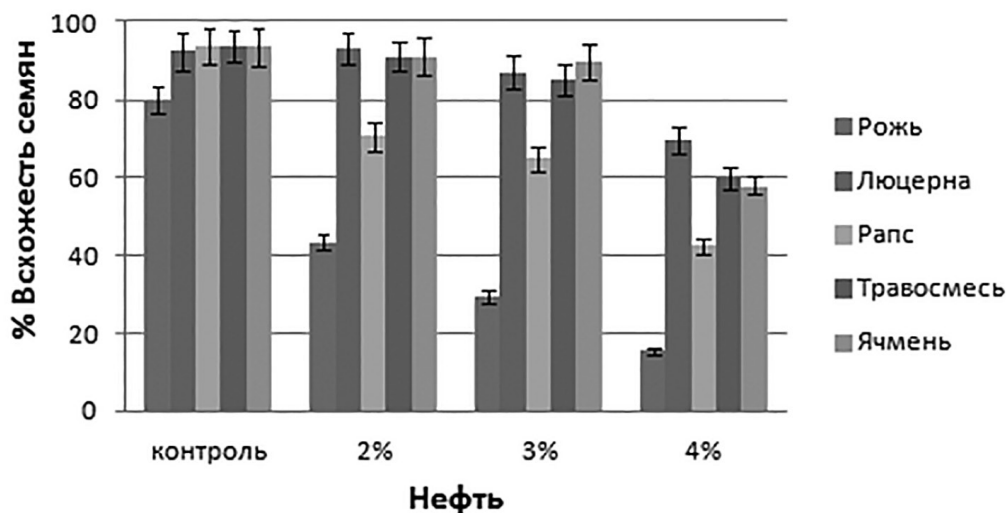


Рис. 1. Всхожесть семян растений (%) при воздействии нефти в различной концентрации (столбцы диаграммы слева направо: рожь, люцерна, рапс, травосмесь, ячмень)

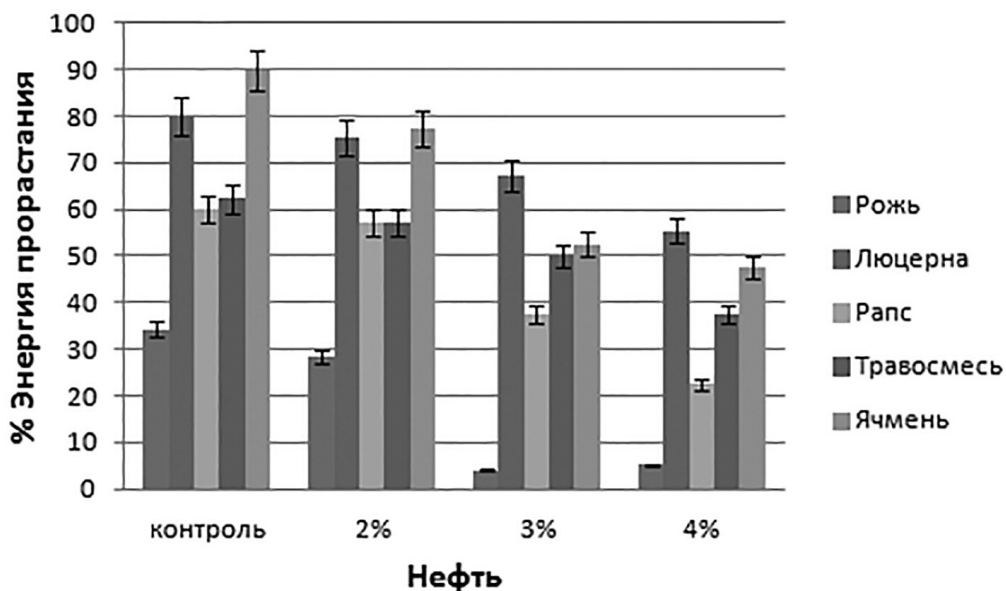


Рис. 2. Энергия прорастания (%) семян при воздействии нефти в различной концентрации — через 84 часа (столбцы диаграммы слева направо: рожь, люцерна, рапс, травосмесь, ячмень)

Во всех вариантах опытов всхожесть и энергия прорастания семян зависели от концентрации нефти, внесенной в опыт. Чем выше была концентрация нефти, тем меньше были всхожесть и энергия прорастания семян. Такая же закономерность была установлена и для других растений, чувствительность которых располагалась в следующем порядке: подсолнечник > бобы > пшеница > клевер > кукуруза > ячмень > салат [13]. Однако в нашем варианте опытов устойчивость ячменя была значительно выше, что может быть объяснено разными сортовыми различиями семян, либо фракционным со-

держанием углеводов используемой нефти. Различия по влиянию химической природы поллютанта и времени его воздействия на всхожесть семян были отмечены в ряде работ, где было найдено, что, например, семена моркови чувствительны к маслам с низкой молекулярной массой, а семена яровой пшеницы, сорго, вики, клевера и донника по-разному реагируют на токсический эффект углеводов [2, 9].

Растения являются чутким индикатором состояния почвы. Реакцию высших растений часто используют для определения ее состояния, в том числе почвы,

загрязненной нефтью. Среди основных показателей — размер надземной части растений и их корней, накопление биомассы и ряд других физиолого-биохимических показателей [1].

Выращивание пророщенных семян растений в почве, загрязненной вязкой нефтью в концентрации 2, 3 и 4%, в течение 14 суток показало, что изучаемые растения реагируют на нефтяное загрязнение. Так, люцерна и ячмень по мере увеличения концентрации нефтяного загрязнения не снижали длину своей надземной части, а при концентрации 2% достоверно увеличивали длину в 1,5–1,7 раз (табл. 2).

Можно предположить, что при низких концентрациях нефтяного загрязнения часть углеводов поднимается по сосудам растений, что приводит к возрастанию интенсивности дыхания, увеличению эпидермальных стенок и формированию каллуса, как отмечалось для растений агератума (*Ageratum conyzoides*) и леуцены (*Leucaena leucoccephala*) [5, 12, 17]. Незначительные изменения надземной части были отмечены и для рапса (в 1,0–1,1 раз). Однако надземная часть травосмеси и ржи достоверно снижалась по мере увеличения концентрации нефти в почве, а при концентрации 4% была ниже в 2 раза по сравнению с контролем.

Таблица 2

Влияние различных концентраций нефти на рост надземной части растений

	Длина (мм) надземной части растений			
	Контроль	2%	3%	4%
Рожь	12,6±0,19	10,0±0,14	7,3±0,11	6,6±0,07
Люцерна	19,5±0,11	29,3±0,25	18,7±0,28	18,3±0,11
Рапс	47,30±0,14	43,4±0,47	41,6±0,39	47,4±0,18
Травосмесь	16,3±0,09	15,5±0,14	11,2±0,14	8,7±0,11
Ячмень	14,6±0,14	24,2±0,28	19,3±0,32	14,5±0,43

Корни растений также по-разному реагировали на нефтяное загрязнение (табл. 3). Наименьшее снижение длины корней на 3–4 мм наблюдалось у люцерны, ячменя и травосмеси при концентрации нефти 4%. Значительное изменение длины корней при концентрации нефти 4% отмечалось у рапса (на 20 мм) и ржи (на 10 мм).

Таблица 3

Влияние различных концентраций нефти на рост подземной части растений

	Длина (мм) подземной части растений			
	Контроль	2%	3%	4%
Рожь	16,3±0,12	12,7±0,09	8,2±0,05	6,6±0,05
Люцерна	15,6±0,31	13,8±0,25	12,2±0,25	11,6±0,21
Рапс	67,6±0,50	65,3±0,09	56,7±0,41	47,70±0,36
Травосмесь	14,5±0,27	13,7±0,27	12,9±0,25	11,3±0,14
Ячмень	13,6±0,07	13,2±0,07	11,4±0,05	10,3±0,03

Заключение

Скрининг исследуемых растений показал, что наибольшей устойчивостью к загрязнениям почвы вязкой нефтью обладает люцерна, поскольку ее семена сохраняли всхожесть и энергию прорастания в диапазоне нефтезагрязнений 2–3%, а проростки лишь незначительно снижали показатели прироста надземной и подземной частей при концентрации нефти 4%. Среди зерновых культур по устойчивости к нефтяным загрязнениям можно отметить семена ячменя; они также имели достаточно высокую всхожесть и энергию прорастания семян, но наблюдалось незначительное снижение прироста корневой системы проростков растений по мере увеличения концентрации нефтезагрязнения. Данные растения можно рекомендовать в качестве фитообъектов для очистки почв, загрязненных вязкой нефтью.

Литература

1. Киреева Н.А., Кузьяхметов Г.Г., Мифтахова А.М., Водопьянов В.В. Фитотоксичность антропогенно-загрязненных почв. — Уфа: Издательство «Гилем», 2003. — 266 с.
2. Кулагин Н.В., Архипова Н.С., Бреус И.П. Оценка фитотоксичности УВ разной химической природы при их прямом контакте с семенами и опосредованно через почву // Вестник ТГПИУ. — 2011. — № 4. — С. 70–75.
3. Синдирева А.В., Ловинецкая С.Б., Гейс В.В. Использование газонных трав для фиторемедиации почв, загрязненных нефтепродуктами // Вестник Омского государственного аграрного университета. — 2016. — № 1(21). — С. 92–97.

4. Adam A. and Duncan H. Influence of diesel fuel on seed germination // *Environmental Pollution* // 2002. — Vol. 120. — No. 2. — P. 363–370.
5. Ayeni M.J., Kayode J. Laboratory studies on the effects of aqueous extracts from sorghum bicolor stem and zea mays (roots and tassel) on the germination and seedling growth of okra (*Abelmoschus esculentus* L.) // *Advances in Agriculture*. — 2014. — Vol. 1. — P. 1–6.
6. Bautista H., Gallyamova S., Bagaeva T.V., Validov S.Z. Hydrocarbon oxidizing microorganisms: their isolation and study of colonization capacity for the use in rhizoremediation processes of contaminated soils // *International Journal of Pharmacy & Technology*. — 2016. — Vol. 8. — P. 24615–24621.
7. Bautista H. and Rahman K.M.M. Review on the Sundarbans delta oil spill: Effects on wildlife and habitats // *International Research Journal*. — 2016. — Vol. 1(43). — Part 2. — P. 93–96.
8. Cao L., and Mu X.N. Research on ecological restoration of Wetland landscape in reclamation land environment // *Applied Mechanics and Materials*. — 2014. — Vols. 608–609. — P. 1056–1060.
9. Gawrit C. and Cabanne F. Oils for weed control: Uses and mode of action // *Pesticide Science*. — 1993. — Vol. 37(2). — P. 147–153.
10. Giannelos P.N., Zannikos F., Stournas S., Lois E. and Anastopoulos G. Tobacco seed oil as an alternative diesel fuel: Physical and chemical properties // *Industrial Crops and Products*. — 2002. — Vol. 16. — No. 1. — P. 1–9.
11. Heipieper H.J. (Ed.). Bioremediation of soils contaminated with aromatic compounds / NATO Science Series IV. Earth and Environmental Sciences. — Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2007. — Vol. 76. — 130 p.
12. Kulshrestha K., Srivastha K., Ahmad K.J. Effect of diesel exhaust emission on lean surface traits of *Ageratum conyzoides* Linn and *Leucaena leucocephala* (Larn. De wit) / *Abstr. II Internat. Conf. of Plant Anatomy and Morphology*. — Saint-Petersburg, 2002. — P. 325–326.
13. Maila M.P., Randima P., Cloete T. Multispecies and monoculture rhizoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from the soil // *International Journal of Phytoremediation*. — 2005. — Vol. 7(2). — P. 87–98.
14. Meagher R.B. Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants // *Current Opinion in Plant Biology*. — 2000. — Vol. 3. — P. 153–162.
15. Owabor C.N. and Obahiagbon K.O. Assessing the rate of remediation of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated soil using redox parameters // *Advanced Materials Research*. — 2009. — Vols. 62–64. — P. 439–444.
16. Parrish Z.D., Banks M.K., and Schwab A.P. Effect of root death and decay on dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of yellow sweet clover and tall fescue // *Journal of Environment Quality*. — 2005. — Vol. 34(1). — P. 207–216.
17. Somtrakoon K., Chouychai W. Phytotoxicity of single and combined polycyclic aromatic hydrocarbons toward economic crops // *Russian Journal of Plant Physiology*. — 2013. — Vol. 60(1). — P. 139–148.

INFLUENCE OF OIL POLLUTION OF SOILS ON GERMINATION AND VEGETATIVE GROWTH OF VASCULAR PLANTS

H. BAUTISTA, T.B. BAGAEVA, Sh.Z. VALIDOV

Kazan Federal University

Restoring the vegetation cover of soil contaminated with oil requires the selection of plants with certain properties. Five species of plants have been studied in the present study, including rye (*Secale cereale*), barley (*Hordeum vulgare*), rape (*Brassica napus*), alfalfa (*Medicago sativa*), grass mix (red fescue — 70%, perennial grass — 20%, bluegrass meadow — 10%). These plants were tested on the basis of three levels of soil contamination with viscous oil: 2, 3 and 4%. The results of the experiments showed that the alfalfa seeds possessed the greatest resistance to oil contamination, as they retained the germination and germination energy in the contamination range of 2–3% and slightly reduced these values at 4% oil pollution. On the second place in terms of resistance to oil pollution are the seeds of barley and grass mixtures. The development of aboveground and underground parts of these plants also changed insignificantly with respect to control (tap water), which allows them to be recommended as plants for phyto bioremediation.

Keywords: phytoremediation, oil, germination, energy of germination.

СЕЗОННАЯ ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ ПИГМЕНТОВ, ПОЛИСАХАРИДОВ, АНТИОКСИДАНТОВ, ЛИПИДОВ ВЕЧНОЗЕЛЕННОГО КУСТАРНИЧКА *EPHEDRA DISTACHYA* L.

Е.С. БОГДАНОВА^{1*}, О.А. РОЗЕНЦВЕТ¹, Г.Н. ТАБАЛЕНКОВА², И.Г. ЗАХОЖИЙ²

¹ Институт экологии Волжского бассейна РАН, Тольятти;

² Институт биологии Коми УроРАН, Сыктывкар

Исследован химический состав (содержание пигментов, углеводов, липидов, фенольных соединений) в надземной части вечнозеленого кустарничка *Ephedra distachya* L. в течение одного года вегетации. Растения произрастали в условиях ксерофитной каменистой степи (П-1) и мезофитной луговой степи с выходом скальной породы (П-2). В растениях П-2 концентрация фенолов и флавоноидов была в 1,7 и в 2,0 раза выше по сравнению с растениями П-1, и наиболее высокие значения этих компонентов получены в апреле и декабре. Содержание наиболее изменчивого компонента гемицеллюлозы ГЦБ составляло 8,1–18,0%. Для липидного комплекса растений П-1 характерно увеличение как суммарных, так и отдельных групп липидов, в то время как для растений П-2 такая тенденция обнаружена только в отношении нейтральных липидов НЛ. В составе жирных кислот (ЖК) отмечена тенденция к увеличению содержания полиненасыщенных ЖК (ПНЖК) в более холодный осенне-зимний период.

Ключевые слова: липиды, жирные кислоты, пигменты, полисахариды, фенольные соединения, *Ephedra distachya* L.

Введение

Ephedra distachya L. (эфедра двухколосковая) — представитель семейства *Ephedraceae*, в состав которого входит единственный род *Ephedra*. Высокий таксономический ранг, присвоенный монотипному семейству *Ephedraceae*, свидетельствует о весьма древнем возрасте рода *Ephedra* (Пешкова, 2005) [10].

Растения *E. distachya*, так же, как и другие представители рода, прочно вошли в официальную медицину и используются при лечении гипотонии, тяжелых травм, бронхиальной астмы и т.д. (Barnes et al., 2007) [18]. Особенностью химического состава растений данного рода является наличие алкалоидов — эфедрина и псевдоэфедрина, а также метилэфедрина и бензойной кислоты (Hong et al., 2011) [21]. Следует отметить, что до недавнего времени эфедрин широко применялся и в спортивной медицине в качестве симпатомиметика (Фармакология, 2008) [15].

В научной литературе существует большое количество работ, посвященных выделению и идентификации основных биологически активных соединений — эфедрина и псевдоэфедрина (Caveney, 2001 [20]; Ibragic, Sofić, 2015 [22]). Помимо алкалоидов в растениях *E. distachya* образуются и другие соединения, обладающие биологической активностью, такие как пигменты, фенольные соединения, полисахариды, вещества липидной природы.

Спектр фенольных соединений, как правило, отличается широким разнообразием даже в пределах одного вида растения. Основная роль фенольных соединений — антиоксидантная: поглощая ультрафиолетовые лучи, они способны предохранять хлорофилл и цитоплазму клеток от разрушения, влияют на изменения в фотохимической активности, регулируя концентрацию пигментов в фотосинтетических мембранах, а также способствуют изменению интенсивности ростовых процессов в зависимости от времени суток, сезона года, действия стрессовых факторов (Богдан, 1981) [11].

Немаловажное значение при исследовании растений имеет пигментный состав как один из интегральных параметров, характеризующих физиологическое состояние растений. Изменения в содержании хлорофиллов *a*, *b* (Хл *a*, *b*) и каротиноидов (Кар) во многом определяются факторами среды и периодами вегетации растений (Нарзуллоев, Эргашев, 2010) [9]. В фармакологии и медицине

© 2017 г. Богданова Е.С., Розенцвет О.А., Табаленкова Г.Н., Захожий И.Г.

* Автор для переписки:

Богданова Елена Сергеевна
кандидат биол. наук, научный сотрудник Института экологии
Волжского бассейна РАН,
E-mail: cornales@mail.ru

Хл применяют в качестве дезодорирующих средств и пищевых добавок (Ключников, Гнетнева, 2007) [5].

Полисахариды способствуют устойчивости растений к различным абиотическим стрессам, взаимодействуют с симбионтами и патогенами, участвуют в клеточной адгезии и структурной интеграции тканей, обеспечивают пористость клеточной стенки (Козлова и др., 2002 [6]; Caffall, Mohnen, 2009 [19]). Использование полисахаридов основано на их свойстве адсорбировать и инактивировать токсины бактерий и вирусов, токсических продуктов, а также образовывать коллоидные растворы, что облегчает откашливание, регулирует уровень холестерина в сыворотке крови, связывает и выводит из организма человека тяжелые металлы, в том числе радионуклиды (Хотимченко и др., 2005) [16].

Вещества липидной природы включают в себя обширную группу молекул, в том числе стеринны, жирорастворимые витамины, компоненты биологических мембран. К последним относятся вещества с четко выраженной химической структурой и тесно связанные биохимически — это жирные кислоты (ЖК) и их производные (Васьковский, 1996) [1]. Фосфолипиды (ФЛ) и гликолипиды (ГЛ) являются одними из основных компонентов биологических мембран, компоненты нейтральных липидов (НЛ) чаще выполняют запасную функцию. Широкое разнообразие липидных молекул, различающихся по химической структуре, дает возможность современной фармакологической промышленности использовать их при производстве многих ценных продуктов, например, для получения препаратов липофильной формы, имеющих большое сродство к ФЛ мембран клеток (Раменская и др., 2012) [12].

Изменения в содержании пигментов, липидов, ЖК, полисахаридов, фенольных соединений растений могут рассматриваться как компоненты эколого-физиологической характеристики, позволяющей выявить особенности вида в самых разнообразных условиях среды.

Цель настоящей работы — исследование сезонной динамики содержания указанных компонентов в растениях *E. distachya* в течение одного года вегетации.

Материалы и методы

E. distachya является представителем семейства *Ephedraceae* (хвойниковые), класса *Gnetopsida*, отдела *Pinophyta*, порядка *Ephedrales* (Жизнь растений, 1978) [3].

Растительный материал отбирали в весенний (апрель — IV), летний (июль — VII), осенний (октябрь

— X) и зимний (декабрь — XII) периоды в 2015—2016 гг. на двух площадках 1 (П-1) и 2 (П-2), расположенных на территории национального парка «Самарская Лука». Растения местообитания П-1 произрастали в условиях ксерофитной каменистой степи, растения П-2 — в условиях мезофитной луговой степи с выходом скальной породы.

Для анализов использовали надземные части побегов 15—20 растений, из усредненной массы составляли три биологические пробы по 0,5—2 г сырой массы. Далее растительный материал фиксировали кипящим изопропанолом и хранили при температуре -20°C .

Содержание фотосинтетических пигментов определяли спектрофотометрически на приборе UV-1700 (Shimadzu, Япония) в ацетоновой вытяжке при длинах волн 662 и 644 нм (Хл а, б) и 470 нм (Кар) (Maslova et al., 1986) [23].

Определение суммарного содержания растворимых фенольных соединений проводили спектрофотометрическим методом с использованием реактива Фолина — Дениса (Ермаков А.И. и др, 1972) [8]. При построении градуировочной зависимости в качестве стандарта применяли галловую кислоту. Содержание флавоноидов определяли спектрофотометрически (Pękal, Ryzynska, 2014) [24], в качестве стандарта применяли катехин. Содержание фенолов выражали в эквивалентах галловой кислоты, флавоноидов — в эквивалентах катехина в пересчете на единицу сухой массы растительного материала.

Содержание полисахаридов определяли по методу из Государственной фармакопеи [2]. Полисахариды разделяли на водорастворимые (ВРПС), пектиновые вещества (ПВ), гемицеллюлозы А и Б (ГЦ А и ГЦ Б) (Кочетков, 1970) [7].

Липиды экстрагировали смесью хлороформа и метанола (1:2) с одновременным механическим разрушением тканей. Разделение липидов осуществляли методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) (Кейтс, 1985) [4]. Количество ФЛ определяли по содержанию неорганического фосфора, ГЛ и НЛ — денситометрически «Денскан-04» (Ленхром, Россия). Хроматограммы анализировали в режиме параболической аппроксимации по градуировочным зависимостям, используя моногалактозилдиацилглицерин (МГДГ) и трипальмитат в качестве стандартов. Суммарное содержание липидов (СЛ) рассчитывали как сумму НЛ, ГЛ и ФЛ (Розенцвиг и др., 2013) [13].

Для анализа ЖК использовали их метиловые эфиры, полученные путем кипячения в 5%-ном растворе HCl в метаноле. Полученные эфиры очищали с помощью

ТСХ и анализировали на газожидкостном хроматографе «Хроматек Кристалл 5000.1» (Россия).

Статистическую обработку результатов анализов проводили с использованием программ Statistica 6.0 for Windows, Microsoft Excel 2007.

Результаты и обсуждение

E. distachya — вечнозеленый корневищный кустарничек высотой до 25 см. Растение светолюбивое и засухоустойчивое, обитает на степных склонах, остепненных опушках и полянах сосновых лесов на карбонатных породах (Жизнь растений, 1978) [3]. Особенностью растений *Ephedra* является отсутствие зеленых листьев, фотосинтетическую функцию осуществляют вечнозеленые побеги, которые со временем деревенеют и покрываются толстой корой.

Динамику содержания различных типов химических соединений исследовали в надземной части растений, собранных в пределах одного региона на двух местообитаниях в разные сезоны года. Согласно данным таблицы 1, условия обитания по температурному режиму, влажности и рН почвы на момент отбора растений были идентичны, хотя растения отнесены к разным фитоценологическим и экологическим условиям.

Таблица 1

Абиотические факторы среды в местах произрастания растений

Параметры	П-1				П-2			
	IV	VII	X	XII	IV	VII	X	XII
Температура воздуха °С	+12	+24	+14	-8	+12	+24	+14	-8
рН почвы	7,8	8,2	8,4	8,3	8,2	8,2	8,6	8,4
Влажность почвы, %	11,7	58,4	6,4	72,3	28,1	54,0	14,6	63,9

Примечание: П-1 растения произрастали в условиях ксерофитной каменистой степи, П-2 — в условиях мезофитной луговой степи; IV, VII, X, XII — апрель, июль, октябрь, декабрь, соответственно

Исследование состава и содержания пигментов является важной характеристикой процессов фотосинтеза растений, реализация которого влияет на рост и продуктивность растений. В зависимости от сезона содержание пигментов может значительно варьировать. Наши результаты показали, что вечнозеленые побеги

E. distachya, произраставшие на участках П-1 и П-2, содержали зеленые пигменты в количестве от 1,8 до 3,4 мг/г, а Кар — в количестве от 0,5 до 0,8 мг/г сухой массы (рис. 1). Образцы растений П-1 весной и летом характеризовались более низким содержанием Хл. Дальнейшее течение вегетационного периода демонстрировало увеличение Хл в этих растениях и соответствовало значениям, полученным для растений П-2. В летний период наблюдали увеличение содержания зеленых пигментов в расчете на сухую массу, причем у растений П-2 их количество было примерно на 10% выше. По данным Софроновой В.Е. и др. (2014) [14], растения близкородственного вида *E. monosperma* способны осуществлять фотосинтез в течение круглого года в суровых условиях Якутии за счет перестройки фотосинтетического аппарата, хотя уровень пигментов в осенне-зимний период снижается примерно на 30%. Можно полагать, что растения *E. distachya* также способны осуществлять фотосинтез в зимний период. Увеличение доли Кар в пигментном пуле обоих типов растений и снижение содержания Хл, подобно растениям *E. monosperma*, являются косвенным подтверждением такого предположения.

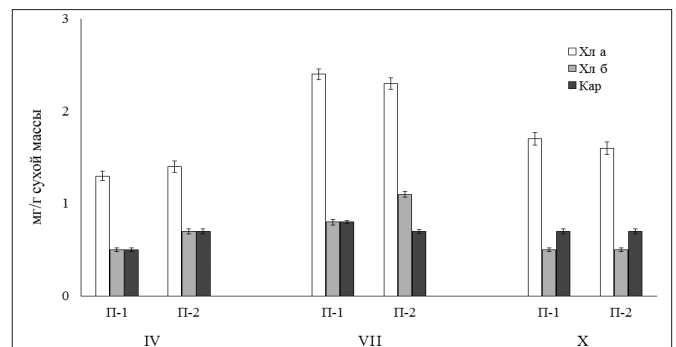
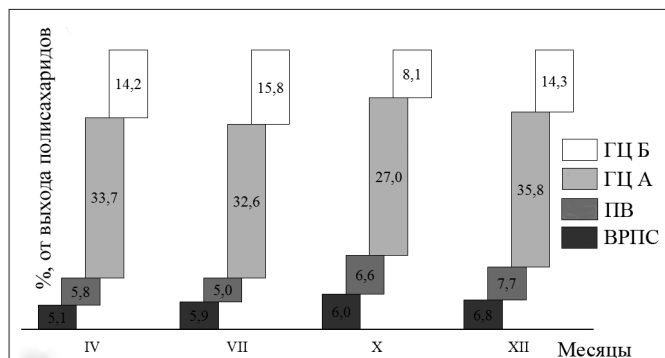


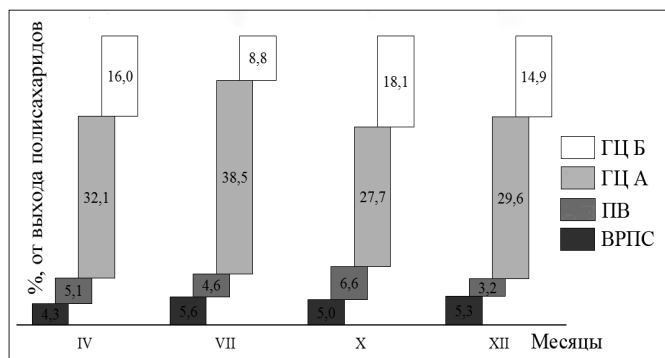
Рис. 1. Фотосинтетические пигменты *E. distachya*. IV — апрель; VII — июль; X — октябрь

Гравиметрический анализ полисахаридного комплекса исследуемых в разные сезоны растений показал преобладание ГЦ А и Б, суммарный вклад которых составил 35,1–50,1 и 44,5–48,1% от выхода для растений П-1 и П-2, соответственно (рис. 2). Следовательно, для растений П-1 содержание гемицеллюлоз — соединений, выполняющих запасную и структурную функции, подвержено большим изменениям. Кроме того, можно видеть, что суммарное содержание гемицеллюлоз у растений П-1 в июле было существенно ниже по сравнению с другими месяцами и ниже, чем у растений П-2. Содержание ВРПС растений П-1 варьировало в интервале 5,1–6,8%, а П-2 — в интервале 4,3–5,6% от выхода полисахаридов. ПВ изменялись в диапазоне 5,0–7,7%

(П-1) и 3,2–6,6% (П-2) (рис. 2 А, Б). Известно, что полисахариды обладают свойством удерживать воду в клетках растений (Хотимченко и др., 2005) [16]. Большая изменчивость содержания гемицеллюлоз и соотношения ГЦ А к ГЦ Б в растениях П-1 может быть связана с менее благоприятными условиями увлажнения в ксерофитных условиях.



А



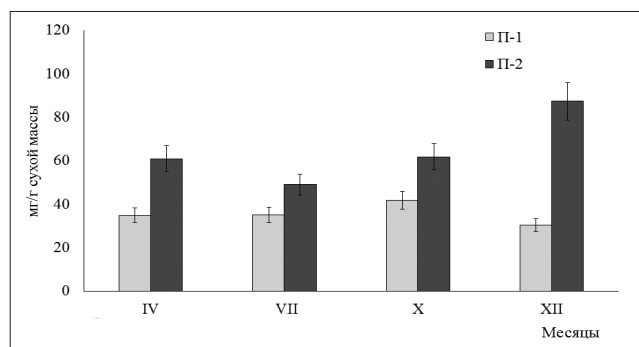
Б

Рис. 2. Содержание полисахаридов в *E. distachya*. IV – апрель; VII – июль; X – октябрь; XII – декабрь. А – П-1; Б – П-2

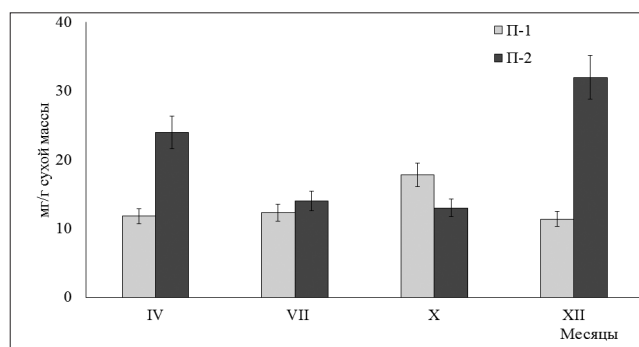
Антиоксидантный статус растений оценивали по содержанию фенольных соединений и флавоноидов. В работах ряда авторов сообщается, что в разных видах *Ephedra* содержание фенольных компонентов и флавоноидов может варьировать в широких пределах – от 6,8 до 53,3 и 0,5 до 3,0 мг/г сухой массы, соответственно (Amakura et al., 2013 [17]; Ibragic, Sofić, 2015 [22]). Фенольные соединения *E. distachya* представлены флавоноидами и фенолкарбоновыми кислотами. Данные сезонной динамики показывают, что в растениях П-2 концентрация фенолов и флавоноидов была в 1,7 и в 2,0 раза выше по сравнению с растениями П-1 и наиболее высокие значения этих компонентов получены в апреле и декабре (рис. 3).

Образование многих фенольных соединений происходит по шикиматному пути. На определенной стадии происходит его разветвление, по одному направлению из

горизонтальной кислоты образуется L-триптофан (и далее индольные производные), по другому – L-фенилаланин и L-тирозин. С последним ответвлением сопряжены дальнейшие превращения, которые, в конечном счете, приводят к образованию в растительных клетках фенольных соединений. Фенилаланин, в частности, используется для биосинтеза алкалоидов (Caveney et al., 2001 [20]; Ibragic, Sofić, 2015 [22]). Можно предположить, что повышенное содержание фенольных соединений у растений, произрастающих в более благоприятных условиях влажности, будет способствовать накоплению специфических алкалоидов, характерных для данного вида растений.



А



Б

Рис. 3. Содержание фенольных соединений и флавоноидов в *E. distachya*. IV – апрель; VII – июль; X – октябрь; XII – декабрь. А – фенольные соединения; Б – флавоноиды

Как отмечалось выше, вещества липидной природы объединяют большое количество молекул различного химического строения. Общее содержание липидов, выделенных из растений, варьировало от 31,2 до 82,4 мг/г сухой массы. Кроме того, в растениях отмечали высокое содержание НЛ: 44,3–50,7% – для растений П-1 и 44,6–58,9% – для растений П-2. Сезонная динамика у растений П-1 характеризовалась увеличением СЛ и НЛ в холодные месяцы, по сравнению с теплым периодом года (табл. 2). Для растений П-2 максимальное количество липидов отмечено в июле.

Таблица 2

Содержание суммарных и индивидуальных липидов в *E. distachya*

Липиды	П-1				П-2			
	IV	VII	X	XII	IV	VII	X	XII
Суммарные липиды и их соотношение, мг/г сухой массы								
СЛ	35,3±1,7	31,2±1,7	56,8±2,8	62,5±3,1	33,8±1,6	82,4±4,1	50,6±2,5	54,5±2,7
ГЛ	9,2±2,2	10,4±2,5	21,5±1,1	13,7±0,6	10,2±0,5	27,2±1,3	11,6±3,4	11,3±3,5
ФЛ	8,2±2,2	6,4±1,5	10,3±2,5	19,0±0,9	4,3±0,2	18,4±0,9	9,0±2,5	11,3±3,5
НЛ	17,9±4,2	14,4±3,4	25,0±1,2	29,8±1,4	19,3±0,9	36,8±1,8	30,0±1,2	31,9±1,5
Гликолипиды, %								
МГДГ	49,6±4,9	43,8±4,3	40,8±4,0	42,1±4,2	46,5±4,6	45,6±4,6	39,0±3,9	39,5±3,9
ДГДГ	41,0±4,1	41,7±0,7	44,1±4,4	47,4±4,7	43,7±4,3	40,0±4,0	44,8±4,8	46,7±4,7
СХДГ	9,5±0,9	14,5±0,5	15,1±0,5	10,5±0,5	9,8±0,9	14,4±0,4	16,1±1,1	13,8±1,9
Фосфолипиды*, %								
ФХ	53,4±5,3	50,2±5,0	47,4±4,4	46,5±4,5	40,8±4,8	45,1±4,5	53,9±5,9	47,8±1,7
ФЭ	23,3±2,3	18,1±1,8	20,8±1,8	30,1±3,0	21,5±2,1	22,1±2,2	22,2±1,1	30,9±3,0
ФГ	8,8±0,8	16,3±1,6	16,1±1,1	10,1±1,1	14,7±1,7	16,1±1,1	11,4±1,4	8,2±0,8
ФИ	12,6±0,6	13,2±1,3	10,2±1,2	10,8±1,8	18,0±1,0	12,0±1,2	7,9±1,0	9,6±0,6

Примечание: * – в таблице представлены данные индивидуальных ФЛ, содержание которых составляло более 90% от суммы

В отличие от НЛ, полярные липиды входят в состав мембран. Среди ГЛ, локализованных во внутренних мембранах хлоропластов, идентифицировали моногалактозилдиацилглицерин (МГДГ), дигалактозилдиацилглицерин (ДГДГ) и сульфохиновозилдиацилглицерин (СХДГ). В начале вегетации в растениях как П-1, так и П-2, среди ГЛ доминировал МГДГ (46,5–49,6% от суммы ГЛ). Затем на фоне постепенного снижения МГДГ увеличивалась доля ДГДГ и СХДГ независимо от местообитания.

Фракция ФЛ – структурного компонента непластидных мембран, содержала фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилэтаноламин (ФЭ), фосфатидилглицерин (ФГ), фосфатидилинозит (ФИ). Особенностью изменения состава фракции ФЛ было увеличение ФЭ в зимний период у растений двух местообитаний, что, по-видимому, связано с сезонной структурной реорганизацией мембран.

ЖК являются важным элементом в мембране клетки и определяют ее подвижность. В нашем исследовании основными кислотами *E. distachya* (более 60%) были ЖК с длиной цепи 16 и 18 атомов углерода. Содержание ненасыщенных ЖК (ННЖК) составляло

от 56,3 до 66,4% от суммы ЖК (табл. 3). В группе ННЖК преобладали линолевая (18:2n6) и линоленовая (18:3n3) кислоты. Среди насыщенных ЖК (НЖК) главной кислотой была пальмитиновая кислота (16:0). Содержание короткоцепочечных ЖК составляло от 1,3 до 1,9% от суммы ЖК. Следует отметить довольно высокий вклад ЖК с длиной цепи более 20 атомов углерода, содержание которых достигало 10% и более, особенно у растений П-2.

Известно, что изменения температуры в сторону снижения или повышения оказывают сильное влияние на физические свойства мембранных липидов и регулируют текучесть клеточных мембран. В исследованных растениях более высокое содержание ННЖК наблюдали в осенне-зимний период. Однако характер динамики отдельных кислот различался. Например, содержание 18:2n6 у растений П-1 снижалось в летне-осенний период, в то время как в растениях П-2 доля этой кислоты оставалась неизменной. Менялась и динамика НЖК. Так, содержание кислоты 16:0 снижалось при переходе с теплого времени года к холодному, особенно в растениях П-2, а высокая концентрация кислоты 18:0 отмечалась преимущественно в летний период.

Основной состав жирных кислот *E. distachya*

Кислоты	П-1				П-2			
	IV	VII	X	XII	IV	VII	X	XII
<16:0	1,9±0,1	1,7±0,1	1,3±0,3	1,3±0,3	1,7±0,1	1,8±0,2	1,4±0,3	1,3±0,3
16:0	18,3±1,3	20,6±2,0	20,6±2,0	16,7±0,7	17,6±0,1	19,7±0,9	18,0±0,8	12,0±0,2
18:0	2,3±0,3	4,1±0,1	3,3±0,3	1,7±0,7	3,2±0,2	4,3±0,4	2,2±20,2	3,7±0,7
18:1n9	3,0±0,3	7,0±0,7	9,3±0,3	2,5±0,5	3,1±0,1	4,7±0,4	4,5±0,4	3,1±0,3
18:2n6	23,6±0,6	16,0±0,6	17,7±0,1	23,9±0,9	20,4±0,8	20,1±2,0	22,7±0,5	21,3±0,1
18:3n3	30,3±0,3	33,2±3,3	31,3±0,3	34,5±0,5	31,8±0,8	27,9±2,7	35,0±0,5	28,5±0,5
20:0	1,9±0,1	4,4±0,4	3,9±0,9	1,8±0,1	3,7±0,7	5,2±0,2	2,3±0,3	4,3±0,4
22:0	3,0±0,3	2,5±2,0	1,8±0,0	3,6±0,3	3,9±0,3	3,8±0,8	2,5±0,2	4,4±0,4
24:0	1,5±0,1	2,2±0,2	1,9±0,1	1,7±0,1	1,6±0,1	2,9±0,2	2,1±0,1	2,2±0,2
НЖК	30,0	35,3	33,1	27,1	31,8	37,9	28,6	34,6
ННЖК	58,0	58,3	61,3	66,2	57,8	56,4	65,5	58,6
Другие	14,2	6,4	5,6	6,7	10,4	5,7	5,9	6,8

Примечание: в таблице не представлены данные ЖК, содержание которых было менее 1%

Заключение

Таким образом, исследована динамика содержания пигментов, углеводов, липидов, фенольных соединений в надземной части у вечнозеленого кустарничка *E. distachya*. Характер изменчивости выбранных групп химических соединений сопряжен с условиями обитания. Наибольшее содержание пигментов обнаружено в летний период и у растений, произрастающих в ксерофитных условиях (П-1); их суммарное количество было примерно на 10% ниже. Для этих же растений характерно более низкое содержание фенольных соединений по сравнению с растениями мезофитных условий (П-2). Сезонная динамика полисахаридов в течение сезона вегетации у растений П-1 более вариативна в сравнении с растениями П-2, несмотря на то, что для каждого из исследованных типов полисахаридов характерна индивидуальная динамика, связанная с выполняемыми функциями, зависимыми от времени сезона и метаболических циклов, в которых они участвуют. Для липидного комплекса растений П-1 характерно увеличение как суммарных, так и отдельных групп липидов, в то время как для растений П-2 такая тенденция обнаружена только в отношении НЛ. В составе ЖК отмечена тенденция к увеличению содержания ПНЖК в более холодный осенне-зимний период.

Литература

1. Васьковский В.Е. Липиды // Соросовский образовательный журнал. — 1997. — № 3. — С. 32–37.
2. Государственная Фармакопея СССР. XI издание. Выпуск 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / Под ред. М.Д. Машковского, Э.А. Бабаяна, А.Н. Обоймаковой и др. — М.: 1990. — 400 с.
3. Жизнь растений. В 6 томах / Ред. Федоров А.А. — М.: Просвещение, 1974–1982. — 3385 с.; Том 4. Мхи, плауны, хвощи, папоротники, голосемянные растения / Под ред. И.В. Грушвицкого, С.Г. Жилина. — 1978. — 447 с. — С. 299–314.
4. Кейтс М. Техника липидологии. — М.: Мир, 1975. — 323 с.
5. Ключников С.О., Гнетнева Е.С. Незаменимые микронутриенты: бета-каротин и витамин А // Практика педиатра. — 2007. — № 5. — С. 39–42.
6. Козлова Р.Ю., Оводова Р.Г., Гюнтер Е.А., Винтер В.Г., Оводов Ю.С. Влияние полисахаридов растений на синтез алкалоидов // Сб. материалов II Всероссийской конференции «Химия и технология растительных веществ». Казань, 24–27 июня 2002 г. Стендовый доклад. — Казань, 2002. — С. 53.
7. Кочетков Н.К. Химия биологически активных соединений. — М., 1970. — 631 с.
8. Методы биохимического исследования растений / А.И. Ермаков, В.В. Арасимович, Н.П. Ярош. — Л.: Колос, 1972. — 465 с.

9. Нарзуллоев А., Эргашев А. Динамика изменения содержания фотосинтетических пигментов в листьях люцерны // Доклады Академии наук Республики Таджикистан. — 2010. — Т. 53. — № 11. — С. 884–888.
10. Пешкова Г.А. К происхождению рода *Ephedra* L. (*Ephedraceae*) // Turczaninowia. — 2005. — Т. 8. — № 2. — С. 54–68.
11. Природа защитной реакции растений / Г.П. Богдан. — Киев: Наукова думка, 1981. — 208 с.
12. Раменская Г.В., Петухова О.А., Смирнов В.В. Клинико-фармакологические аспекты применения препаратов витамина В1 с различной растворимостью в жирах и водных средах // Фармакотерапия. — 2012. — № 4. — С. 67–70.
13. Розенцвиг О.А., Головкин Т.К., Богданова Е.С., Табаленкова Г.Н., Нестеров В.Н., Дымова О.В. Модификация пула полярных липидов листьев при адаптации растений *Plantago media* L. к световому режиму в природных условиях // Известия РАН. Сер. биол. — 2013. — № 2. — С. 1–9.
14. Софронова В. Е., Чепалов В. А., Дымова О. В., Головкин Т. К. Роль пигментной системы вечнозеленого кустарничка *Ephedra monosperma* в адаптации к климату центральной Якутии // Физиология растений. — 2014. — Т. 61. — № 2. — С. 266–274.
15. Фармакология / Под ред. Р.Н. Аляутдина. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. — 832 с.
16. Хотимченко Ю.С., Ермак И.М., Бедняк А.Е., Хасина Э.И., Кропотков А.В., Коленченко Е.А., Сергущенко И.С., Хотимченко М.Ю., Ковалев В.В. Фармакология некрахмальных полисахаридов // Вестник ДВО РАН. — 2005. — № 1. — С. 72–82.
17. Amakura Y., Yoshimura M., Yamakami S., Yoshida T., Wakana D., Hyuga M., Hyuga S., Hanawa T., Goda Y. Characterization of phenolic constituents from Ephedra herb extract // Molecules. — 2013. — Vol. 18. — No. 5. — P. 5326–5334.
18. Barnes J., Anderson A.L., Phillipson J.D. Herbal Medicines. — London: Pharmaceutical Press, 2007.
19. Caffall K. H., Mohnen D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides // Carbohydrate Research. — 2009. — Vol. 344. — P. 1879–1900.
20. Caveney S., Charlet D.A., Freitag H. Maier-stolte M., Starratt A.N. New observations on the secondary chemistry of world Ephedra (*Ephedraceae*) // American Journal of Botany. — 2001. — Vol. 88(7). — P. 1199–1208.
21. Hong H., Chen H.B., Yang D.H., Shang M.Y., Wang X., Cai S.Q., et al. Comparison of contents of five ephedrine alkaloids in three official origins of Ephedra herb in China by high-performance liquid chromatography // Journal Natural Medicinal. — 2011. — Vol. 65. — No. 3–4. — P. 623–628.
22. Ibragic S., Sofić E. Chemical composition of various Ephedra species // Bosnian Journal of Basic Medical Sciences. — 2015. — Vol. 15. — No. 3. — P. 21–27.
23. Maslova T.G., Popova I.A., Popova O.F. Critical appraisal of the spectrophotometric method of quantifying carotenoids // Russian Journal of Plant Physiology. — 1986. — Vol. 33. — P. 615–619.
24. Peřkal A., Pyrzyńska K. Valuation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay // Food Analytical Methods. — 2014. — Vol. 60. — P. 324–349.

SEASONAL DYNAMICS OF THE CONTENT OF PIGMENTS, POLYSACCHARIDES, ANTIOXIDANTS, LIPIDES OF THE EVERGREEN *EPHEDRA DISTACHYA* L.

E.S. BOGDANOVA¹, O.A. ROZENTSVET¹, G.N. TABALENKOVA², I.G. ZAKHOZHIIY²

¹ Institute of Ecology of the Volga Basin, RAS, Togliatti;

² Institute of Biology Komi, Ural Division, RAS, Syktyvkar

The chemical composition (the content of pigments, carbohydrates, lipids, phenolic compounds) in the overground part of the evergreen shrub *Ephedra distachya* L. was studied within one year of vegetation. Plants grew under conditions of xerophytic stony steppe (P-1) and mesophytic meadow steppe with the exit of rock (P-2). In plants P-2, the concentration of phenols and flavonoids was 1.7 and 2.0 times higher than in plants P-1, and the highest values of these components were obtained in April and December. The content of the most variable component of hemicellulose HC B was 8,1–18,0%. The lipid complex of plants P-1 is characterized by an increase in both total and individual groups of lipids, while for P-2 plants this trend is only observed in relation to neutral lipids (NL). The composition of fatty acids (FA) indicated a tendency to increase the PUFA content in the colder autumn-winter period.

Keywords: lipids, fatty acids, pigments, polysaccharides, phenolic compounds, *Ephedra distachya* L.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ АКТИВНОГО ИЛА В СОВМЕСТНОЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ И РЕАГЕНТНОЙ ОЧИСТКЕ СТОЧНЫХ ВОД

Й.В. КОБЕЛЕВА*, А.С. СИРОТКИН, Т.В. ВДОВИНА, Е.В. ПЕТРОВА,
Э.Ф. ВОЗНЕСЕНСКИЙ, И.С. МИФТАХОВ

ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет»

Проведено исследование зависимости размеров агрегатов активного ила от размеров частиц компонентов наноструктурированных реагентных препаратов в процессе комплексной биологической и реагентной очистки сточных вод. Показано, что в пробе с реагентом Nanofloc A644 образуются морфологически более крупные агломераты по сравнению с пробой с реагентом Biokat P500. Отмечено, что реагентный препарат Biokat P500 в рабочей дозировке 50 мкл/дм³ обеспечивает максимально однородную дисперсию размеров хлопьев активного ила по сравнению с другими дозировками

Ключевые слова: активный ил, биологическая очистка сточных вод, наночастицы, размер хлопьев, седиментация.

Введение

Проблема очистки сточных вод в современных масштабах производств остается сложной научно-технической задачей, так как сточные воды содержат множество примесей, подлежащих обезвреживанию. В связи с этим актуальной является задача определения достаточно экономичных и эффективных методов очистки сточных вод, позволяющих осуществлять сброс в водоемы при полном соответствии требованиям действующих нормативов качества воды [1].

Важное место среди существующих методов занимает биологическая очистка, широко применяемая для обработки коммунально-бытовых и промышленных сточных вод. Наряду с преимуществами данного метода, он отличается недостатками, к которым относятся проблемы с отделением активного ила от очищенной воды, а также низкая эффективность биологической дефосфотации. Традиционно для решения указанных проблем применяются реагентные препараты в комбинации с биологической стадией очистки, дополняя ее в виде предварительной или финишной стадии.

Наиболее перспективным в настоящее время является совместный во времени и в пространстве биологиче-

ский и физико-химический метод удаления соединений фосфора из сточных вод (симультанная преципитация) [4, 11]. В связи с этим значительное внимание уделяется получению реагентов нового поколения, предназначенных для проведения такого процесса. Одним из таких реагентов является продукт компании VTA Austria GmbH – Biokat P500, рекомендованный для дефосфотации сточных вод и удаления взвешенных веществ. В отличие от традиционной последовательной физико-химической и биологической обработки сточных вод реагент VTA Biokat P500 предполагает его внесение непосредственно в биологическую среду (активный ил) для получения максимального эффекта от его использования [9].

Реагент VTA Biokat P500 является комбинированным коагулянт-флокулянт, в состав которого входят традиционно применяемые для осаждения и дефосфотации соли железа, алюминия и органические полимеры [9]. Соотношение компонентов препарата и форма их приготовления являются оригинальными; более того, железо в составе этого реагента находится в форме наночастиц ферромагнетита [9, 13].

Проведенные ранее исследования [7] были направлены на выявление оптимальной дозировки реагента по ряду показателей, таких как эффективность дефосфотации, улучшение седиментационных свойств активного ила, влияние реагента на окислительную способность микроорганизмов, а также на процессы нитрификации.

Результаты показали, что наиболее оптимальной дозировкой данного реагента является 50 мкл/дм³. Выбранная дозировка обеспечивает удаление соединений фосфора до 76% при разовом внесении в лабораторных

© 2017 г. Кобелева Й.В., Сироткин А.С., Вдовина Т.В., Петрова Е.В., Вознесенский Э.Ф., Мифтахов И.С.

* Автор для переписки:

Кобелева Йолдыз Витальевна

ведущий инженер кафедры промышленной биотехнологии ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский университет»

E-mail: ioldiz-ksu@mail.ru

условиях, не оказывает выраженного негативного действия; напротив, было отмечено стимулирование активности микробного сообщества активного ила [2, 6].

Проведенные опытно-промышленные испытания подтвердили эффективность выбранной дозировки и показали положительный результат от применения VTA Biokat P500 в совместном процессе биологической и реагентной очистки [3].

Целью настоящего исследования является выявление взаимосвязи между размерами частиц в растворах реагентного препарата и морфологией агрегатов активного ила при применении реагента в процессе комплексной биологической и реагентной очистки сточных вод.

Материалы и методы

Объектами исследования в работе выступали:

- Микробное сообщество активного ила, отобранное на биологических очистных сооружениях (БОСК) г. Казани.
- Реагентные препараты VTA Biokat P500 и VTA Nanofloc A644.

Для детального изучения зависимости размера хлопьев активного ила в присутствии реагента Biokat P500 в среде были проведены исследования размеров частиц в исходном растворе реагента, а также в рабочих растворах с разными дозировками реагента. Исследования проводились методом динамического рассеяния света на лазерном анализаторе наночастиц «Malvern Zetasizer Nano» (Великобритания).

Дозировки были выбраны, исходя из ранее проведенных исследований [7], и составили 10, 50 и 100 мкл/дм³. При приготовлении рабочих растворов в качестве растворителя использовалась дистиллированная вода.

Результаты и обсуждение

Для сравнения размеров частиц с другим реагентом, имеющим в своем составе наноразмерные частицы, был выбран препарат того же производителя — флокулянт Nanofloc A644. Согласно паспортным данным [9, 10], в исследуемых реагентах содержится железо в форме ферромагнетита, что определяет улучшение седиментационных свойств активного ила.

Помимо наноразмерного железа, в составе Biokat P500 также присутствуют полиалюминия гидроксихлорид и сополимер эпихлоргидрина и диметиламина. Такой комплексный состав предполагает наличие в исходном растворе реагента частиц разного размера (рис. 1).

Интенсивность сигнала (по оси ординат) отражает относительную величину светорассеяния веществами в исследуемых образцах и, таким образом, демонстрирует отклик системы на светопропускание. Для использования данного показателя интерес представляет сравнение различных систем.

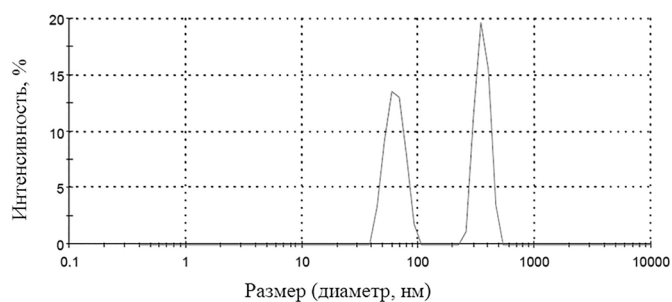


Рис. 1. Распределение частиц по размерам в исходном растворе реагента Biokat P500

Следует отметить, что в исходном растворе реагента Biokat P500 зарегистрированы частицы, отнесенные к двум фракциям: размерами от 50 до 100 нм и от 200 до 500 нм (см. рис. 1).

На рисунке 2 представлена зависимость распределения частиц в реагенте сравнения — Nanofloc A644.

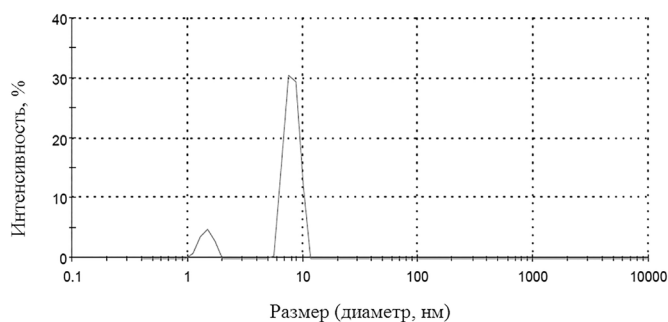


Рис. 2. Распределение частиц по размерам в исходном растворе реагента Nanofloc A644

Полученные результаты (см. рис. 2) подтверждают наличие в составе реагента наночастиц размером от 1 до 10 нм.

Размер частиц и их доля в составе реагентов представлены в таблице 1.

Результаты наблюдений по указанной методике измерений указывают на то, что исходные растворы реагентов обладают полидисперсностью. В реагенте Biokat P500 частицы значительно крупнее, чем в реагенте Nanofloc A644, что, очевидно, связано с присутствием в составе Biokat P500 полимерных компонентов и комплексов.

Таблица 1
Распределение частиц по размерам в исходных растворах реагентов

Исследуемый образец	Доля частиц определенного размера в образце	
	Средний размер (диаметр, нм)	Доля, %
Biokat P500	354,0	51,3
	63,15	48,7
Nanofloc A644	8,10	87,8
	1,46	12,2

Для более детального исследования распределения частиц реагента в растворе были проанализированы рабочие растворы реагента Biokat P500 в дистиллированной воде (рис. 3–5).

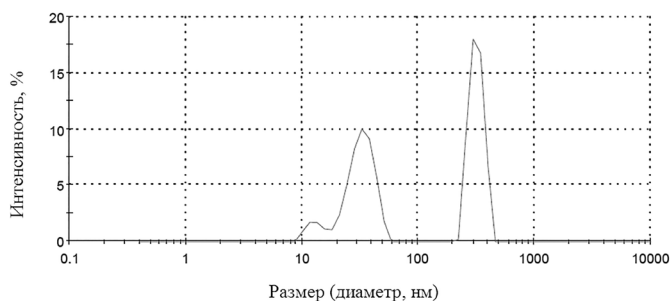


Рис. 3. Распределение частиц по размерам в растворе с дозировкой 10 мкл/дм³

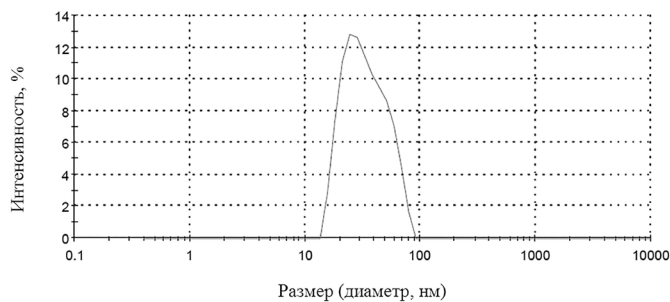


Рис. 4. Распределение частиц по размерам в растворе с дозировкой 50 мкл/дм³

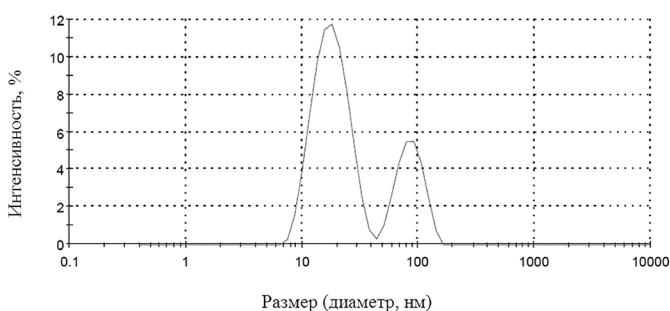


Рис. 5. Распределение частиц по размерам в растворе с дозировкой 100 мкл/дм³

Результаты, представленные на рисунках 3–5, свидетельствуют о неоднородном распределении частиц в образцах с дозировками 10 и 100 мкл/дм³. Большой полидисперсностью из трех исследуемых сред обладает образец с дозировкой 10 мкл/дм³, для которого размеры частиц варьируют от 13 до 316 нм (табл. 2).

Таблица 2
Распределение частиц по размерам в рабочих растворах реагента

Исследуемый образец	Доля частиц определенного размера в образце	
	Средний размер (диаметр), нм	Доля, %
Biokat P500 10 мкл/дм³	316,4	50,0
	33,17	43,5
	13,71	6,5
Biokat P500 50 мкл/дм³	35,59	100
Biokat P500 100 мкл/дм³	18,49	73,1
	86,31	26,9

Наибольшей гомогенностью обладает образец с дозировкой 50 мкл/дм³, где весь объем раствора составляют частицы размера 35,6 нм.

Имеются основания предположить, что размер частиц реагента в рабочем растворе в достаточно узком интервале от 30 до 40 нм может являться определяющим для морфологии иловых хлопьев, формирующихся в контакте с такими растворами реагента. При этом биокислительная и ферментативная активности микроорганизмов в активном иле, агрегированном в присутствии Biokat P500 10 и 50 мкл/дм³, оказались высокими. Именно для указанных дозировок реагента характерен размер частиц в интервале от 30 до 40 нм (от 43 до 100%) (см. табл. 2).

Таким образом, представляется очевидным, что размеры частиц реагента в растворе определяют агрегацию и размеры формируемых иловых хлопьев. Для выявления данной зависимости были проведены исследования морфологии хлопьев активного ила при применении реагента Biokat P500 в сравнении с реагентом Nanofloc A644, а также с образцами активного ила в среде без реагента.

Агрегирование фиксировали визуально, а также определяли размеры хлопьев при помощи конфокального лазерного сканирующего микроскопа Olympus LEXT OLS 4000.

Эксперимент проводился в стеклянных емкостях объемом 2 л, в которые вносился модельный раствор коммунально-бытового стока (табл. 3) и смешивался с активным илом.

Доза активного ила по сухому веществу составляла в среднем 2 г/дм³. В емкости дозировались реагенты в количестве 50 мкл/дм³, согласно ранее проведенным исследованиям. Реагент Nanofloc А 644 также применялся в дозировке 50 мкл/дм³ для достоверности сравниваемых сред. В контрольную емкость реагенты не вносились.

Результаты визуального контроля свидетельствуют о значительном укрупнении хлопьев активного ила в

образце с реагентом Nanofloc по сравнению с образцом без реагента и с реагентом Biokat P500 (рис. 6).

Таблица 3

Состав модельного раствора сточной воды

Компонент	Количество, мг/дм ³
NH ₄ Cl	60
K ₂ HPO ₄	25
Крахмал	50
Сахароза	125
Глицерин	50

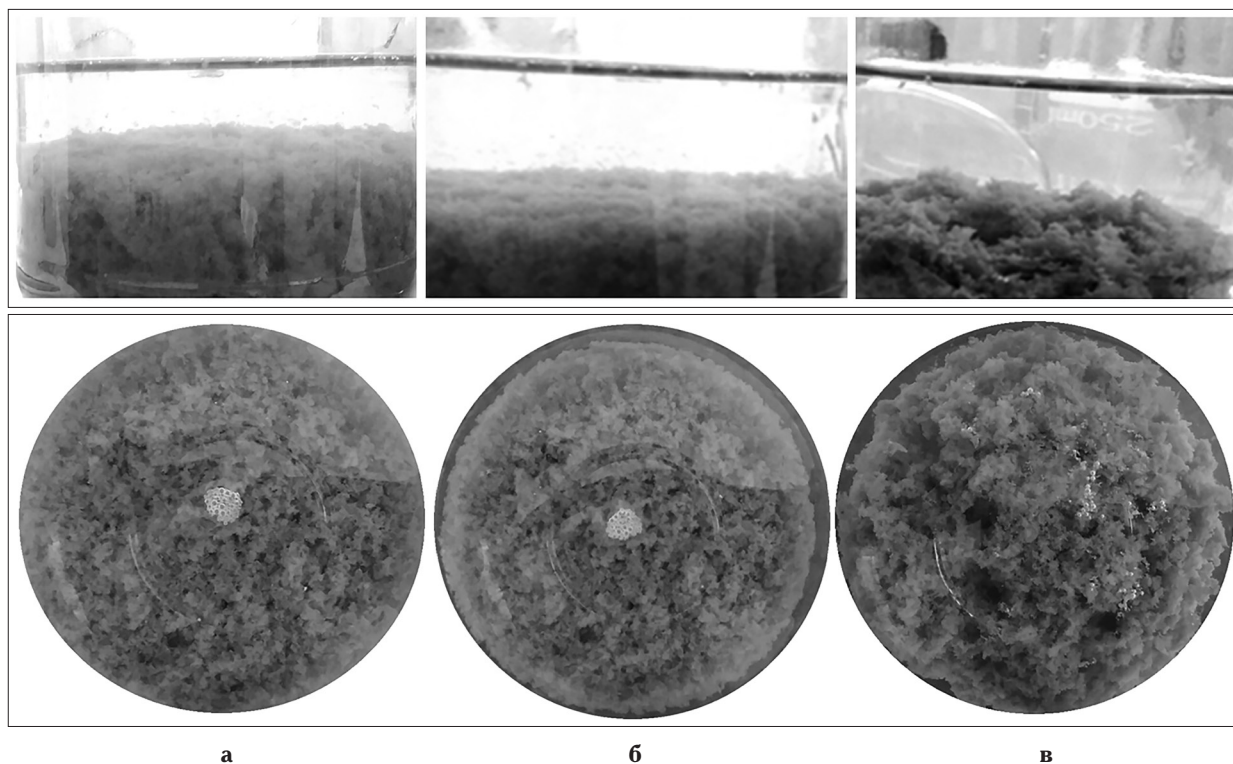


Рис. 6. Внешний вид активного ила в присутствии реагентных препаратов (а – без реагента, б – Biokat P500, в – Nanofloc)

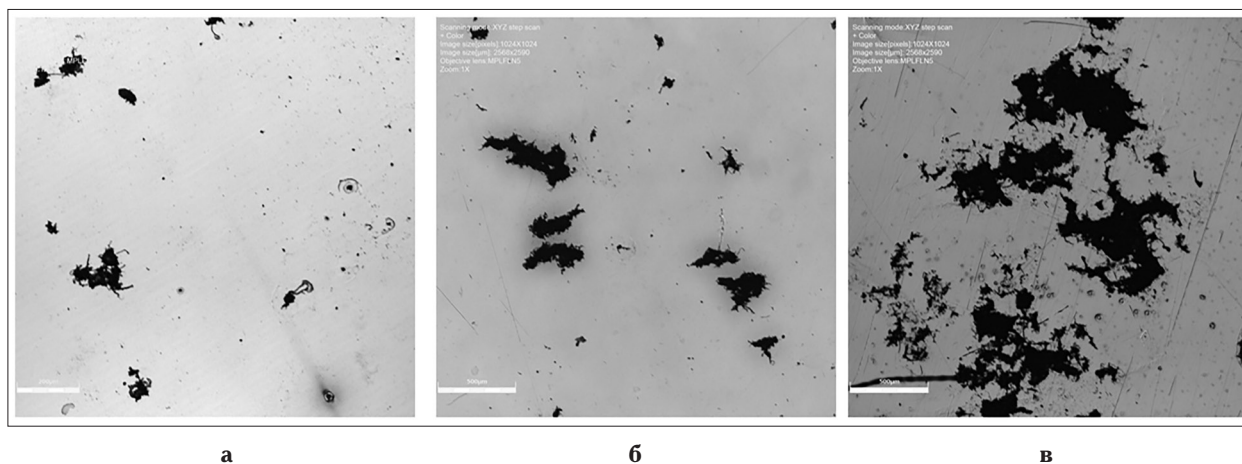


Рис. 7. Микроскопическая картина хлопьев активного ила ×107 (а – без реагента, б – Biokat P500, в – Nanofloc А644), калибровочная шкала соответствует 500 мкм

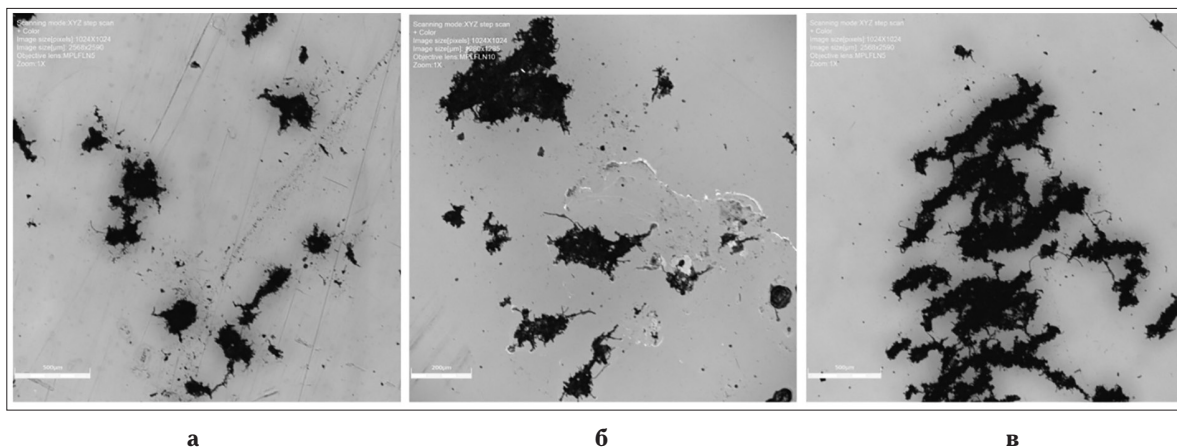


Рис. 8. Микроскопическая картина хлопьев активного ила $\times 217$ (а — без реагента, б — Biokat P500, в — Nanofloc A644), калибровочная шкала соответствует 200 мкм

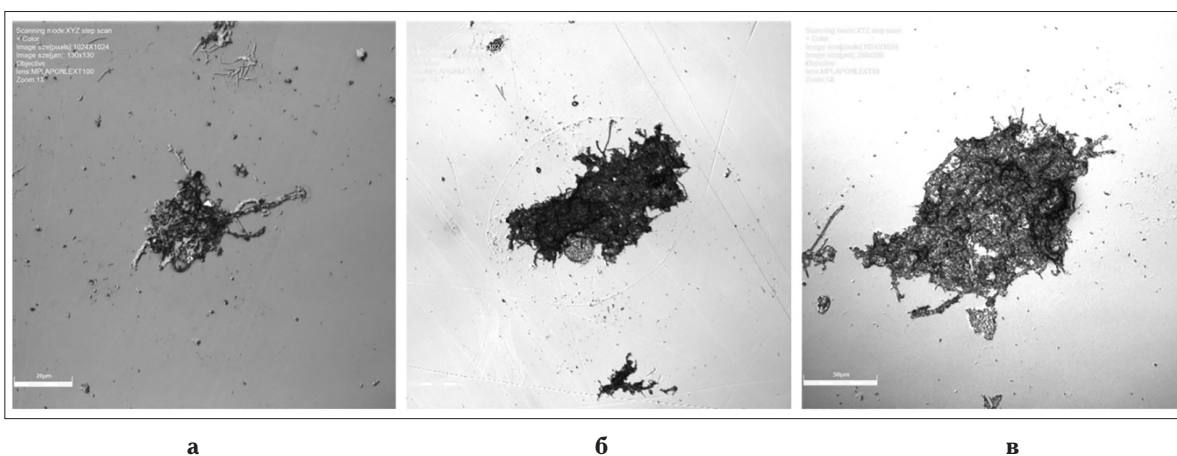


Рис. 9. Микроскопическая картина хлопьев активного ила (а — без реагента, б — Biokat P500 $\times 400$, в — Nanofloc A644 $\times 217$), калибровочная шкала соответствует 100 мкм

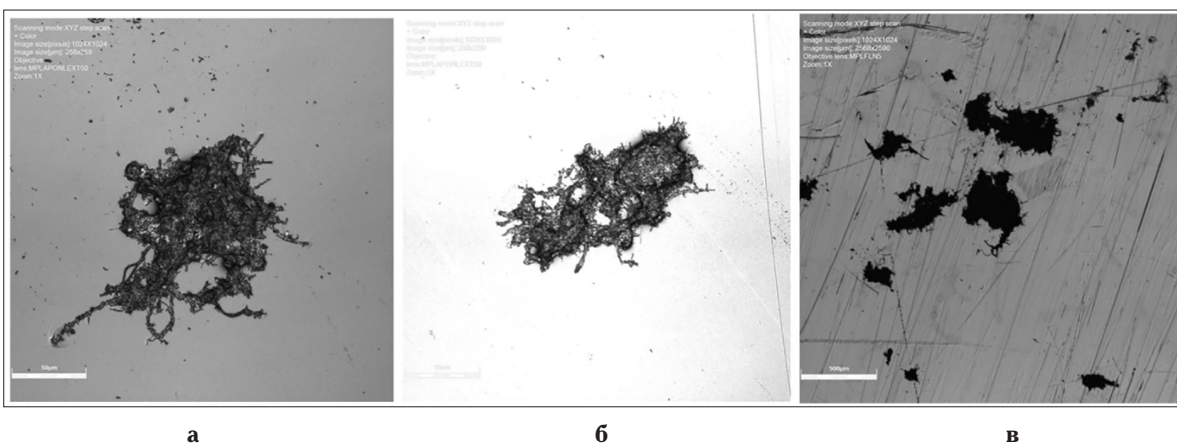


Рис. 10. Микроскопическая картина хлопьев активного ила (а — без реагента, б — Biokat P500 $\times 1000$, в — Nanofloc A644 $\times 217$), калибровочная шкала соответствует 50 мкм

Таблица 4

Размеры хлопьев активного ила в исследованных образцах

Образец	Размеры хлопьев, мкм	Средний размер хлопьев, мкм
Без реагента	65,0–100,0	98,0
Biokat P500	150,0–360,0	125,0
Nanofloc A644	117,0–816,0	304,0

По данным рисунка ба, для контрольного образца отмечены большие значения илового индекса, а также содержания взвешенных веществ в надиловой жидкости по сравнению с образцами в присутствии реагентов.

Результаты микроскопической съемки (рис. 7–10, табл. 4) подтверждают данные об укрупнении хлопьев активного ила в средах с реагентами [2–4, 6, 7].

Надо отметить (см. табл. 4), что дисперсия значений размеров хлопьев в контрольном образце, а также с реагентом Biokat P500 является незначительной по сравнению с образцом в присутствии Nanofloc A644.

Размеры хлопьев активного ила в присутствии реагентов указывают на выраженную агрегацию хлопьев в обоих образцах с реагентами (см. табл. 4). Так, в образце с реагентом Biokat P500 размер хлопьев увеличился в среднем в 1,5 раза по сравнению с пробой без реагента, в пробе с реагентом Nanofloc A644 хлопья увеличились в среднем в 3,2 раза по сравнению с контролем.

Ранее обсуждалась линейная зависимость между размером хлопьев активного ила и способностью активного ила к биоокислению (табл. 5) [8].

удовлетворительные процессы биоокисления. При этом такие хлопья отличаются худшими седиментационными свойствами. Известно, что для нормальной работы очистных сооружений требуется, чтобы количество отдельных суспендированных микроорганизмов было минимальным, а хлопья ила имели большие размеры и высокую плотность. В этом случае активный ил будет хорошо осажаться, и в очистной системе представляется возможным поддержание высокой концентрации биомассы [8, 12].

Таким образом, полученные результаты дисперсии размеров хлопьев активного ила (см. табл. 4) в образце с реагентом Biokat P500 сопоставимы с результатами распределения частиц в рабочем растворе с дозировкой 50 мкл/дм³ (см. табл. 2). Гомогенность частиц реагента в рабочем растворе 50 мкл/дм³ (см. табл. 2) обеспечивает агрегацию хлопьев средним размером 125 мкм, что обеспечивает достаточно высокий уровень биоокисления, улучшение седиментационных свойств, а также эффективную физико-химическую очистку, в частности, дефосфотацию сточных вод до нормативно допустимых значений [2–7].

Таблица 5

Влияние радиуса флокул на качество очистки (начальное ХПК = 700 мг О₂/дм³)

Размер флокул d, мкм	Коэффициент массопереноса K _f , 1/ч	Концентрация ХПК очищенной воды, мг О ₂ /дм ³	Концентрация активного ила, г/дм ³
30	391,6	43,5	5,52
60	97,9	44,1	5,51
125	24,5	46,7	5,53
250	6,1	62,3	5,57
500	1,5	81,5	5,64
750	0,67	86,1	5,66
1000	0,38	87,9	5,66

Примечание: п/ж отмечен критический размер 250 мкм

Отмечено, что критическим размером, для которого резко уменьшается коэффициент массопереноса кислорода внутрь хлопьев, является диаметр 250 мкм. При достижении диаметра хлопьев 250 мкм коэффициент массопереноса снижается в 4 раза и в 1,5 раза возрастает концентрация загрязнений по ХПК в очищенной воде [8].

Средний размер хлопьев в контрольном образце (см. табл. 4) не превышает 100 мкм, что обеспечивает

Заключение

В результате экспериментальных исследований процессов агрегирования (хлопьеобразования) в присутствии реагентного препарата VTA Biokat P500 отмечено, что раствор с рабочей концентрацией VTA Biokat P500 50 мкл/дм³ отличается гомогенностью размеров частиц, что, в свою очередь, обуславливает образование размеров хлопьев активного ила, благоприятных для протекания процессов биоокисления и удовлетворительной седиментации.

Литература

1. Кафаров В.В., Винаров А.Ю., Гордеев Л.С. Моделирование и системный анализ биохимических производств. — М.: Лесная промышленность, 1985. — 278 с.
2. Кобелева Й.В., Кирилина Т.В., Гадыева А.А., Сироткин А.С. Сравнительная оценка применения традиционных и современных дефосфотирующих реагентных препаратов в системах биологической очистки сточных вод // Вестник Казанского технологического университета. — 2015. — Т. 18. — № 13. — С. 222–225.
3. Кобелева Й.В., Кирилина Т.В., Низамова А.А., Лисюкова Ю.В., Каблова М.А., Бурнашева И.Р., Сироткин А.С. Анализ состояния активного ила в процессе опытно-промышленных испытаний реагента VTA ВЮКАТ P500 для очистки сточных вод от соединений фосфора

- // Вестник Казанского технологического университета. – 2014. – Т. 17. – № 10. – С. 125–128.
4. Кобелева И.В., Сироткин А.С., Кирилина Т.В., Сибиева Л.М., Гадыева А.А. Совместная биологическая и физико-химическая очистка сточных вод с применением инновационного дефосфотирующего реагента. Часть 1. Оценка процесса дефосфотации сточных вод // Вестник Казанского технологического университета. – 2016. – Т. 19. – № 16. – С. 127–130.
 5. Кобелева И.В., Сироткин А.С., Кирилина Т.В., Сибиева Л.М., Гадыева А.А. Совместная биологическая и физико-химическая очистка сточных вод с применением инновационного дефосфотирующего реагента. Часть 2. Оценка биологических процессов очистки сточных вод // Вестник Казанского технологического университета. – 2016. – Т. 19. – № 16. – С. 133–136.
 6. Кобелева И.В., Шерстнева К.В., Кирилина Т.В., Сироткин А.С., Буттингер А., Лейнвебер В. Влияние реагента VTA BIOKAT P 500 на эффективность процесса биологической очистки сточных вод // Водоочистка. – 2015. – № 8. – С. 18–24.
 7. Кобелева И.В., Шерстнева К.В., Кирилина Т.В., Сироткин А.С., Буттингер А., Лейнвебер В. Оценка влияния перспективного реагента VTA BIOKAT P 500 на эффективность процесса биологической очистки сточных вод // Вода: химия и экология. – 2014. – № 10(76). – С. 95–100.
 8. Конончук Р.М. Исследование биохимической очистки сточных вод на базе флокуляционной модели: дис..... на соискание ученой степени кандидата технических наук. – Казань, 2000.
 9. Паспорт безопасности материала VTA Biokat P 500 / VTA Austria. – GmbH, 2013. – 8 с.
 10. Паспорт безопасности материала VTA Nanofloc A644 / VTA Austria. – GmbH, 2013. – 8 с.
 11. Харьковин С.В. Организация процессов удаления фосфора из сточных вод // Водоочистка. Водоподготовка. Водоснабжение. – 2013. – № 11. – С. 52–59.
 12. Argaman Y., Kaufman W.I. Turbulence and flocculation // J. Sanit. Eng. Div. ASCE. – 1970. – Vol. 96. – Issue 2. – P. 223–241.
 13. [Электронный ресурс] <http://www.vta.cc>.

MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF ACTIVE SLUDGE IN THE SIMULTANEOUS BIOLOGICAL AND REAGENT WASTE WATER TREATMENT

Y.V. KOBELEVA, A.S. SIROTKIN, T.V. VDOVINA, E.V. PETROVA,
E.F. VOZNESENSKY, I.S. MIFTAKHOV

Kazan National Research Technological University

The dependence of the active sludge aggregates sizes formed on the particle sizes of the components of nanostructured reagents in the process of simultaneous biological and reagent wastewater treatment was analyzed. It was shown that morphologically larger agglomerates are formed in the sample with reagent Nanofloc A644 in comparison with the sample with Biokat P500 reagent. The reagent Biokat P500 in a work dose of 50 $\mu\text{l}/\text{dm}^3$ provides the most homogeneous dispersion of the sizes activated sludge flakes in comparison with other doses.

Keywords: activated sludge, biological wastewater treatment, nanoparticles, flake size, sedimentation.

АНАЭРОБНОЕ РАЗЛОЖЕНИЕ ПИЩЕВЫХ АЗОКРАСИТЕЛЕЙ МИКРОБНЫМИ СООБЩЕСТВАМИ, ВЫДЕЛЕННЫМИ ИЗ КИШЕЧНИКА МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Ю.В. ТАКТАРОВА, И.Б. КОТОВА*, А.И. НЕТРУСОВ

МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Проведен скрининг 8 видов анаэробных сообществ, выделенных из желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) различных млекопитающих, на способность разрушать пищевые азокрасители путем их метаногенной конверсии в биогаз. Показано, что под действием симбиотических микроорганизмов азокрасители могут претерпевать химические превращения с образованием интермедиатов различной токсичности. При контакте с данными веществами происходит снижение общего количества микробных клеток и изменение соотношения морфотипов в микробных сообществах. Вызванная пищевыми азокрасителями и их производными сукцессия микробных сообществ ЖКТ может негативно сказаться на здоровье человека и животных.

Ключевые слова: биодegradация, ксенобиотики, азокрасители, микробные сообщества, метаногенез.

Введение

Азокрасители, устойчивые к изменению своих свойств под действием факторов окружающей среды, используются при изготовлении красок и лаков, тканей, кожаных и пластиковых изделий, в типографском деле. Они входят в состав многих продуктов питания (мармелада, конфет, газированной воды и др.), оболочек таблеток и парфюмерно-косметической продукции (например, красок для волос) [2, 17]. Аминоароматические вещества в значительных количествах содержатся в стоках и твердых отходах предприятий, производящих пестициды, взрывчатые вещества, полимеры, красители, лекарственные препараты, пищевые добавки и товары хозяйственного назначения [16] и составляют 3–4% от всех органических загрязнений [1, 18]. Пищевые азокрасители требуют особо пристального внимания, так как они вступают в прямой контакт с человеком и оказывают непосредственное влияние на его жизнедеятельность. Высокую токсичность и мутагенность этих соединений связывают с преобразованием их в организме в реакционноспособные интермедиаты, взаимодействующие с молекулами ДНК и гемоглобином крови [11, 20].

Проникновение ароматических веществ в клеточную мембрану приводит к ее «разбуханию», увеличению проницаемости и нарушению транспорта протонов [14, 15].

Ранее нами было показано [4, 5, 22], что микробные сообщества, полученные из илов очистных сооружений и донных отложений естественных водоемов, с высокой скоростью и без лаг-периода обесцвечивали структурно различные азокрасители путем восстановления азосвязей и образования бесцветных ароматических аминов. Ряд таких сообществ был способен к эффективной полной минерализации некоторых аминоароматических производных до метана [3, 22]. Нами продемонстрированы различия в условиях прохождения первого этапа разложения азокрасителей (обесцвечивания) и дальнейших стадий преобразования образовавшихся аминов-интермедиатов [5]. Так, самая лучшая в испытанном диапазоне температура для обесцвечивания азокрасителей (55 °С) приводила к полному ингибированию деструкции аминоароматических кислот (ААК), то есть последующих реакций в цепи полной минерализации. Стадии трансформации и деароматизации ААК требовали значительной плотности инокулята (50% и более), тогда как для разрыва азосвязи азокрасителей было достаточно 5–10% содержания посевного материала. Оптимальными для процесса метаногенной биодegradации в целом оказались 30 °С и рН=6,5–7,5.

Известно, что в ЖКТ многих животных активно проходят или потенциально возможны процессы метаногенного разложения природных биополимеров, в частности целлюлозы. Поскольку нами и другими авторами [6, 7,

© 2017 г. Тактарова Ю.В., Котова И.Б., Нетрусов А.И.

* **Автор для переписки:**

Котова Ирина Борисовна
доктор биол. наук,

профессор кафедры микробиологии биологического факультета
МГУ им. М.В. Ломоносова

E-mail: kira1959@gmail.com.

12] ранее продемонстрирована способность метаногенных микробных сообществ из других резервуаров переключаться на минерализацию сложных ксенобиотических соединений, то было решено проверить, сможет ли микробиота из ЖКТ некоторых млекопитающих воздействовать на пищевые азокрасители и продукты их обесцвечивания. В ряде работ описано разложение азокрасителей группы Sudan микробиотой ЖКТ крыс, кроликов [8, 9] и человека [21] с образованием высокотоксичных веществ (анилина, 2,4-диметиланилина, о-толуидина и 4-нитроанилина). О полной минерализации этих соединений микробиотой ЖКТ млекопитающих не сообщается.

Целью работы была проверка способности выделенных из ЖКТ млекопитающих анаэробных микробных сообществ к деструкции пищевых азокрасителей и продуктов их обесцвечивания.

Материалы и методы

Источники биологического материала. В работе использовали пробы фекалий лошади (ФЛ), верблюда (ФВ), козы (ФКЗ), оленя (ФО), свиньи (ФС) и коровы (ФКР) из национального парка «Хвалынский» Саратовской области, а также ребенка в возрасте 3,5

(ФЧ1) и 5,5 лет (ФЧ2). Исходные образцы хранили в доверху заполненных герметично закупоренных пенициллиновых флаконах в бескислородных условиях в темноте при температуре 4 °С.

Основные субстраты и другие реактивы. В качестве субстратов были использованы азокрасители Tartrazine (Tn), Ponceau 4R (PS) и Sunset Yellow FCF (SY), активно применяемые в пищевой, фармацевтической и косметической промышленности, Azophloxine (Az), который ранее являлся пищевым азокрасителем, а в настоящее время запрещен к использованию в этом качестве в большинстве стран, и, для сравнения, технический азокраситель Methyl Red (MR), широко применяемый в текстильной промышленности (табл. 1).

Как предполагаемые интермедиаты разложения азокрасителей и их изомеры применяли: 4-аминорезорцин, 1-амино-2-нафтол, сульфаниловую кислоту, N,N-диметил-п-фенилендиамин (ДМФ), 1,4-фенилендиамин (Aldrich, США), 2- и 3-аминобензойные кислоты (2- и 3-АБК), 4-аминосалициловую кислоту (4-АСК) (Sigma, США), 4-АБК (Merck, ФРГ), 5-АСК (Merck, ФРГ и Janssen Chimica, Бельгия). Все используемые субстраты были высшей степени очистки.

Таблица 1

Азокрасители, использованные в работе
(ПДК – предельно допустимая концентрация, ДСД – допустимая суточная доза)

Субстрат (другие названия, обозначения)	Молярная масса (г/моль)	Индекс пищевой добавки (ПДК, мг/кг продукта; ДСД, мг/кг массы тела)	Характерные максимумы поглощения (нм)
Ponceau 4R (Понсо 4R, Пунцовый 4R, Кошенилевый красный, С.І.16255)	604,5	Е 124 (50; 4,0)	352 и 505
Tartrazine (Тартразин, Кислый желтый, Acid yellow T, Hydrazine yellow, С.І.19140)	534,5	Е 102 (100-150; 7,5)	426
Sunset Yellow FCF (Желтый «солнечный закат», Апельсиновый желтый S, С.І. 15985)	452,4	Е 110 (30-300; 2,5)	485
Azophloxine (красный 2G, С.І. 18050)	509,4	Е 128 (запрещен в ЕС, РФ и ряде других стран)	505 и 532
Methyl Red (Метиловый красный, Метиленовый красный, С.І.13020)	269	Технический краситель	431

Вещества хранили в виде анаэробных стерильных концентрированных растворов в дистиллированной воде или в минеральной среде и вносили в сосуды шприцем до нужной концентрации.

Среды для выделения и поддержания микробных сообществ. Для получения сообществ как базовую использовали анаэробную минеральную среду [10, 13] с 0,01% дрожжевого экстракта, рН 7,0–7,5. Элективные условия создавали путем внесения в эту среду азокрасителей до конечной концентрации 1 мМ как единственных источников углерода и энергии. Инкубацию осуществляли в пузырьках объемом 120 мл с герметично закрывающимися резиновыми пробками в минеральной среде объемом от 30 до 50 мл. Газовая фаза была заменена на инертный газ (азот, аргон) для создания анаэробноз. Все пересевы анаэробных сообществ проводили с помощью стерильных шприцев, не нарушая условий анаэробноз.

Методы анализа. Анализ содержания азокрасителей и (амино)ароматических интермедиатов в культуральной жидкости проводили спектрофотометрическим сканированием в диапазоне длин волн 200–600 нм на спектрофотометре Shimadzu UV-1202 (Япония) в кварцевой кювете с $l=1$ см. Для анализа 100 мкл пробы жидкой фазы доводили до 2 мл фосфатным буфером (0,1 М, рН 7,0). Концентрацию веществ определяли по величине оптической плотности при длинах волн максимумов поглощения, используя калибровочные кривые для каждого вещества.

Концентрацию ароматических аминов определяли также с помощью метода ВЭЖХ на хроматографах Gilson (Франция) и Du Pont (США), используя колонку с обращенной фазой 250×4 мм, Диасорб 130-С16Т, 6 мкм (ВСМ, Россия) в системе уксусная кислота (1%) – метанол (в соотношении 50:50 по объему). Скорость подачи элюента – 0,6 мл·мин⁻¹, давление – 150 бар. В качестве детектора использовали спектрофотометр, настроенный на длину волны 225 нм (оптимум поглощения ароматических соединений). Объем вводимой пробы – 20 мкл. Расчет концентрации компонентов смеси проводили по площадям пиков, отнесенным к площадям пиков веществ в стандартных растворах.

Анализ состава летучих продуктов (жирных кислот и спиртов с длиной углеродного скелета не более семи атомов) в культуральной жидкости проводили с помощью хроматографа Кристалл 2000М (Россия) с пламенно-ионизационным детектором и микрокапиллярной колонкой Zebron ZB-FFAP (США). Длина колонки – 15 м, внутренний диаметр – 0,32 мм, толщина неподвижной

фазы – 0,50 мкм, неподвижная фаза – полиэтиленгликоль, модифицированный нитротерефталевой кислотой. Температура термостата колонок: градиент 70–160 °С. Температура испарителя и детектора 200 °С. Скорость газа-носителя (азота) 22,8 см/сек, расход азота – 15 мл/мин, водорода – 20 мл/мин, воздуха – 200 мл/мин. Объем вводимой пробы 1 мкл. С помощью программного обеспечения «Хроматэк-аналитик 2.5» проводили качественный анализ и расчет концентраций летучих веществ в пробе.

Концентрацию органических кислот также определяли с помощью ВЭЖХ. Разделение проводили на колонках Polyspher ОАНУ 3 см × 6,5 мм (Merck, ФРГ) и Varian Metacarb 67Н (300 мм) (Merck, Германия) в 0,01 н. Н₂SO₄. Скорость потока элюента – 0,6 мл/мин, температура колонки – 30 и 60 °С. Смываемые с колонки органические кислоты количественно определяли с помощью дифференциального рефрактометра.

Определение содержания лактата проводили электрохимически с использованием биосенсоров первого поколения на основе L-лактатоксидазы в проточно-инжекционной ячейке. Биосенсоры были любезно предоставлены ООО «РУСЕНС» (www.rusens.com).

Анализ содержания газов проводили на газовом хроматографе ЛХМ 8 МД – модель 3 с катарометром (Россия), газ-носитель – аргон, скорость газа-носителя – 20 мл/мин, при температуре 50 °С. Колонки длиной 2 м заполнены порпаком QS. Объем пробы газа составлял 0,2 мл.

Микроскопическую картину проб анализировали с помощью световой микроскопии фиксированных окрашенных препаратов.

Результаты и обсуждение

Микробные сообщества из фекалий различных млекопитающих были способны с разной скоростью обесцвечивать использованные азокрасители (рис. 1). Это свидетельствует о «микробиологической» неспецифичности реакции разрыва азосвязей, так как каждое из сообществ могло без лаг-периода разрушать структурно различные молекулы азокрасителей и, наоборот, каждое из веществ обесцвечивалось любым из выделенных сообществ. Форма спектров культуральной жидкости при обесцвечивании менялась: исчезали основные пики азокрасителей и появлялись пики, соответствующие ароматическим интермедиатам (рис. 2): сульфаниловой кислоте (250 нм) в образцах с PS, Tn, SY и Az, 2-АБК (310 нм) и ДМФ (297 и 242 нм) в образцах с MR.

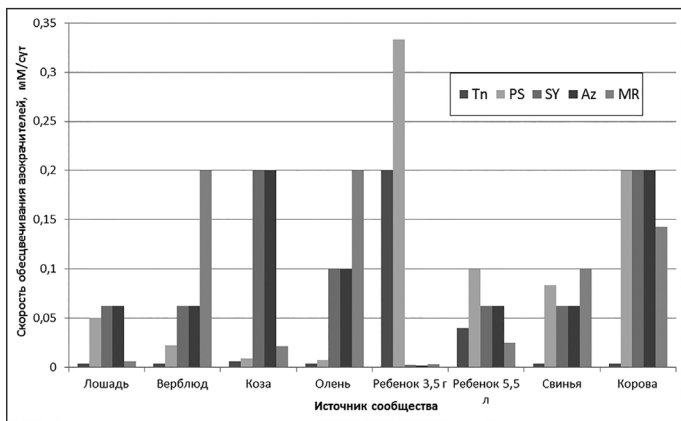
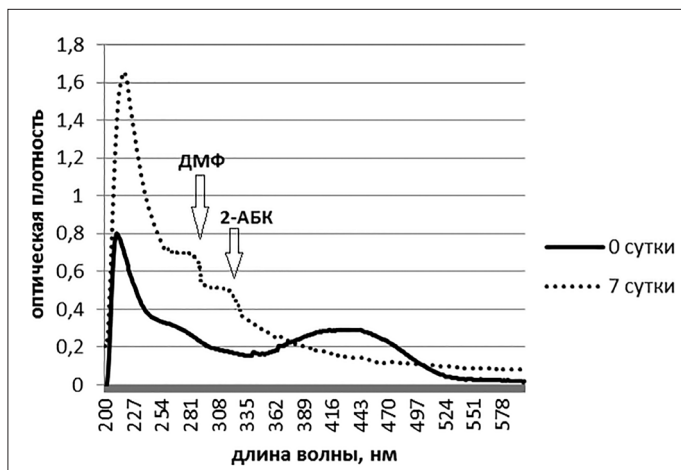
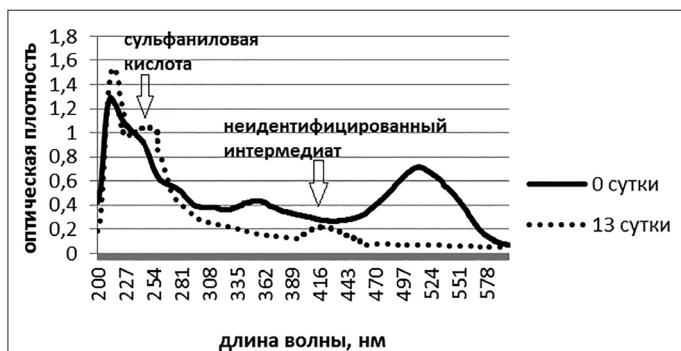


Рис. 1. Сравнение скоростей обесцвечивания азокрасителей микробными сообществами из ЖКТ разных млекопитающих (начальная концентрация азокрасителей 1 мМ)



А



Б

Рис. 2. Характерные изменения спектров в образцах с азокрасителями и микробными сообществами из ЖКТ млекопитающих. А – ФО + MR; Б – ФС + PS

В качестве линейных промежуточных продуктов во всех пробах регистрировали ацетат и пропионат, а в ряде сообществ – также бутират, валериановую и капроновую кислоты.

В сообществах ФВ, ФКЗ, ФЧ2, ФКР и ФО, где биогаз являлся конечным продуктом разложения

азокрасителя, отмечали возрастание метаногенеза в 2–5 раз по сравнению с контрольными вариантами без внесения азокрасителей, где метан образовывался только за счет разложения органических веществ самой пробы фекалий. Сообщество ФО конвертировало в биогаз три азокрасителя (PS, Tn и MR) из пяти использованных. В других образцах, наоборот, присутствие азокрасителя подавляло метаногенез на 10–90%.

Сравнение скоростей разложения азокрасителей микробными сообществами из разных источников (см. рис. 1) показало, что самым устойчивым оказался Tn, а самыми биodeградебельными – SY и Az. Наиболее активный и стабильный метаногенез наблюдали в сообществах ФО, ФКЗ и ФВ.

В опытных вариантах, где сульфаниловая кислота регистрировалась как интермедиат, в конце эксперимента наблюдали пик или небольшое плечо на 250 нм, что подтверждается нашими и литературными данными об устойчивости сульфаниловой кислоты к дальнейшему расщеплению [19]. В тех вариантах, где были выявлены 2-АБК и ДМФ, к концу опыта отмечали отсутствие характерных пиков, что позволяет нам сделать вывод о разложении этих веществ.

Для сообщества ФКР с азокрасителем Tn была исследована динамика выхода летучих жирных кислот (ЛЖК) (рис. 3). Показано, что содержание кислот в опытном варианте через 7 сут более чем в 2 раза превышает таковое в контрольном варианте, что говорит о деструкции ароматических интермедиатов (деароматизации). Обесцвечивание азокрасителя начиналось сразу же, появление пиков ароматических аминов наблюдали на 3 сут, увеличение содержания ЛЖК регистрировали до 15 сут, снижение их содержания – с 16 по 30–45 сут. После 45 сут активизировался метаногенез, что говорит о превращении линейных интермедиатов (через синтрофную стадию) в биогаз. Таким образом, путь деградации азокрасителей в кишечных сообществах (обесцвечивание азокрасителя → образование ароматических аминов → деароматизация с образованием линейных продуктов и их сбраживание → метаногенез) был аналогичен выявленному нами для сообществ из илов очистных сооружений и донных отложений природных водоемов, так как в них регистрировались те же интермедиаты и в той же последовательности, что и в указанных сообществах [3, 5, 6].

В то же время длительность удержания каловых масс у испытанных млекопитающих не дает возможности говорить о прохождении полной минерализации азокрасителей в реальных условиях ЖКТ.

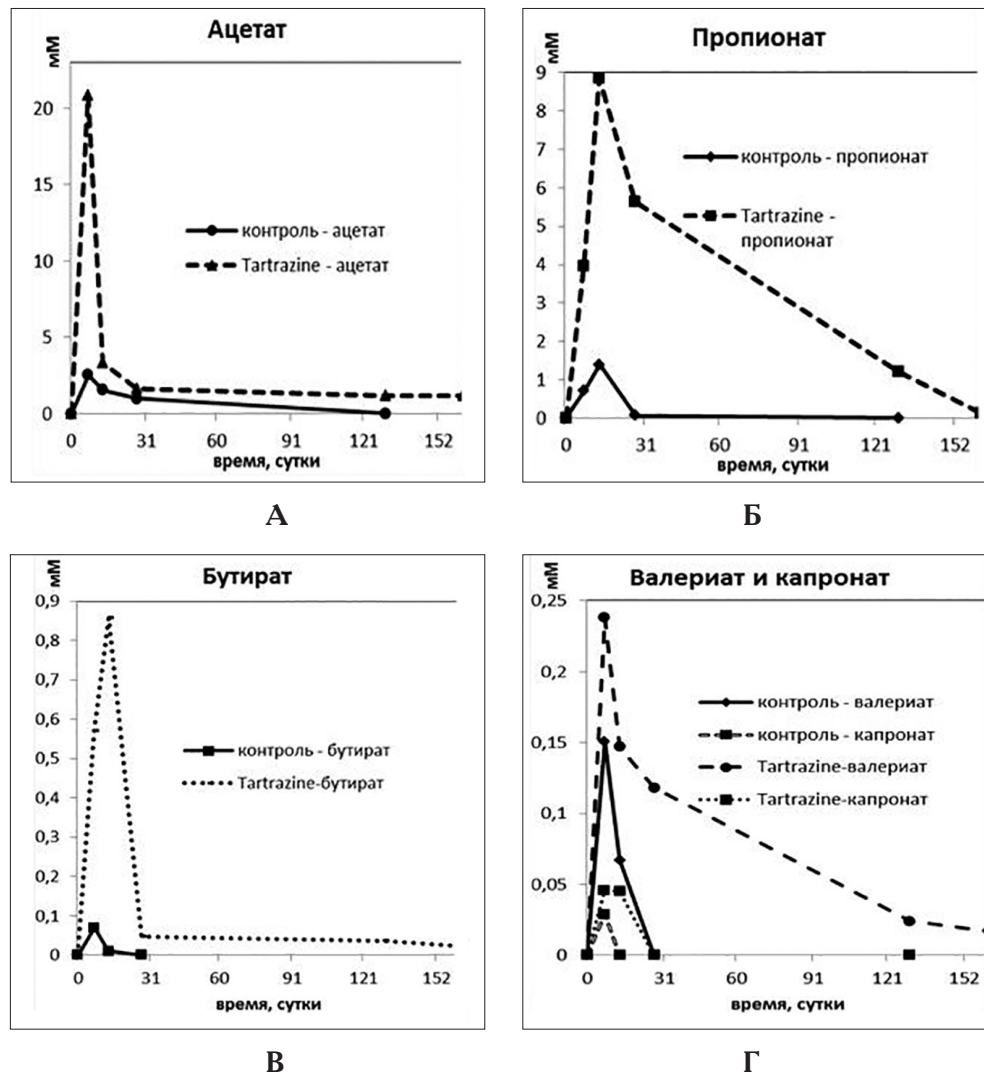


Рис. 3. Динамика выхода кислот в микробном сообществе ФКР с азокрасителем Тп по сравнению с контрольным вариантом. А — ацетат; Б — пропионат; В — бутират; Г — валериат и капронат

Поскольку разрыв азосвязей регистрировали в первые часы контакта сообществ с азокрасителями, то велика вероятность длительного присутствия в ЖКТ как остатков самих азокрасителей, так и продуктов их распада. Микроскопические исследования продемонстрировали, что данные вещества снижают общее количество клеток в сообществах в 2,5–4 раза, а число морфотипов — с 14 до 6–8. При этом в отличие от контроля, где доминировали палочки, преобладающим морфотипом становятся кокковидные клетки. Сравнение данных по кишечным сообществам одного и того же ребенка в возрасте 3,5 и 5,5 лет показало, что при взрослении микробиота его ЖКТ приобрела способность обесцвечивать технический азокраситель MR, однако скорости обесцвечивания PS и Тп снизились (см. рис. 1). Возможно, это связано с изменением соотношения функциональных групп микроорганизмов в микробиоте ЖКТ с возрастом.

Заключение

Наши исследования подтвердили способность микробных сообществ ЖКТ воздействовать на пищевые азокрасители и установили, что эти вещества проявляют селективный эффект по отношению к микробным сообществам. Поскольку наиболее тесный контакт человека с веществами этого ряда происходит через его нормальную микробиоту при потреблении их с едой, питьем, косметикой и лекарствами, то выяснение самого процесса разрушения азокрасителей в пищеварительной системе млекопитающих необходимо для понимания механизмов воздействия этих соединений на их организм. Следует также особо подчеркнуть, что в природных местообитаниях, в том числе в кишечнике млекопитающих, физико-химические параметры не соответствуют оптимальным для эффективного и полного процесса деструкции азокрасителей и ароматических аминов. Поэтому при попадании

азокрасителей в ЖКТ это несоответствие является одним из существенных ограничителей протекания их полной анаэробной биодеградация при показанной нами ее потенциальной возможности. Медленная и неполная биодеструкция может приводить к появлению и длительному присутствию в ЖКТ токсичных для живых организмов (амино)ароматических интермедиатов.

Детекция ароматических и линейных интермедиатов в кишечных сообществах легко осуществима и позволяет судить о возможных превращениях азокрасителя внутри ЖКТ. Даже в условиях наших опытов, которые не вполне соответствовали реальной ситуации, было выявлено, что не только запрещенный к использованию, но и разрешенные пищевые азокрасители подвергаются неполному разложению за времена нахождения в организме, а значит, могут вызывать негативные изменения в структуре и функционировании нормальной микробиоты человека и животных. Поскольку отказ от их использования в современной жизни не представляется реальным, то следует ограничивать контакт с пищевыми азокрасителями чувствительных групп населения (особенно детей) и проводить очистку сточных вод от этих соединений вследствие риска для здоровья.

Моделирование в лаборатории поведения резидентных микроорганизмов в ответ на «вброс» азокрасителей поможет прогнозировать их реакцию по отношению к данным ксенобиотикам в природных экосистемах и учитывать возможные структурные и функциональные изменения микробных сообществ ЖКТ при контакте с подобными синтетическими веществами.

Литература

1. *Емашова Н.А.* Кинетические закономерности конверсии азокрасителей и продуктов их распада анаэробным и аэробным консорциумами микроорганизмов: автореф. дис. ... канд. хим. наук. — М., 2006. — 24 с.
2. *Карпов В.В., Белов А.Е.* Современное состояние производства и потребления красителей // *Рос. хим. ж.* — 2002. — Т. XLVI. — № 1. — С. 67–71.
3. *Линькова Ю.В., Дьяконова А.Т., Гладченко М.А., Калюжный С.В., Котова И.Б., Стамс А., Нетрусов А.И.* Метаногенная деструкция (амино)ароматических веществ анаэробными микробными сообществами // *Прикладная биохимия и микробиология.* — 2011. — Т. 47. — № 5. — С. 558–565.
4. *Линькова Ю.В., Есакова А.А., Дьяконова А.Т., Намсараев Б.Б., Котова И.Б., Нетрусов А.И.* Проверка способности анаэробных микробных сообществ к разрушению аминоароматических ксенобиотиков // *Экология и промышленность России.* — 2011. — № 1. — С. 29–33.
5. *Линькова Ю.В., Котова И.Б., Нетрусов А.И.* Способность микробных сообществ из донных отложений озера Цайдам к метаногенной деструкции аминоароматических ксенобиотиков // *Вода: химия и экология.* — 2013. — № 1. — С. 64–70.
6. *Линькова Ю.В., Куликова И.А., Котова И.Б., Нетрусов А.И.* Деградация азокрасителей и ароматических аминов метаногенными микробными сообществами из илов очистных сооружений // *Вода: химия и экология.* — 2011. — № 7. — С. 51–58.
7. *Balba M.T., Senior E., Nedwell D.B.* Anaerobic metabolism of aromatic compounds by microbial association isolated from saltmarsh sediment // *Biochem. Soc. Trans.* — 1981. — Vol. 9. — P. 230–231.
8. *Cerniglia C.E., Freeman J.P., Franklin W., Pack L.D.* Metabolism of benzidine and benzidine-congener based dyes by human, monkey and rat intestinal bacteria // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1982. — Vol. 107. — No. 4. — P. 1224–1229.
9. *Chung K.T., Fulk G.E., Egan M.* Reduction of azo dyes by intestinal anaerobes // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1978. — Vol. 35. — No. 3. — P. 558–566.
10. *Kalyuzhnyi S.V., Sclyar V.I., Mosolova T.P., Kucherenko I.A., Russkova I.A., Degtyarova N.N.* Methanogenic biodegradation of aromatic amines // *Water Sci. Technol.* — 2000. — Vol. 42. — No. 5–6. — P. 363–370.
11. *Pinheiro H.M., Touraud E., Thomas O.* Aromatic amines from azo dye reduction: status review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewaters // *Dyes and Pigments.* — 2004. — Vol. 61. — No. 2. — P. 121–139.
12. *Qiu Y.-L., Sekiguchi Y., Imachi H., Kamagata Y., Tseng I.-C., Cheng S.-S., Ohashi A., Harada H.* Identification and isolation of anaerobic, syntrophic phthalate isomer-degrading microbes from methanogenic sludges treating wastewater from terephthalate manufacturing // *Appl. Environ. Microbiol.* — Vol. 70. — No. 3. — P. 1617–1626.
13. *Razo-Flores E., Donlon B., Lettinga G., Field J.A.* Biotransformation and biodegradation of N-substituted aromatics in methanogenic granular sludge // *FEMS Microbiol. Rev.* — 1997. — Vol. 20. — No. 3–4. — P. 525–538.
14. *Ren S., Schultz T.W.* Identifying the mechanism of aquatic toxicity of selected compounds by hydrophobicity and electrophilicity descriptors // *Toxicol. Lett.* — 2002. — Vol. 129. — No. 1–2. — P. 151–160.
15. *Sikkema J., de Bond J.A.M., Poolman B.* Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons // *Microbiol. Rev.* — 1995. — Vol. 59. — No. 2. — P. 201–222.
16. *Snyderwine E.G., Sinha R., Felton J.S., Ferguson L.R.* Highlights of eight international conference on carcinogenic/mutagenic N-substituted aryl compounds // *Mutat. Res.* — 2002. — Vol. 506–507. — P. 1–8.

17. Solis M., Solis A., Pérez H.I., Manjarrez N., Flores M. Microbial decolouration of azo dyes: A review // *Proc. Biochem.* – 2012. – Vol. 47. – No. 12. – P. 1723–1748.
18. Sugumar S., Thangam B. BiodEnz: A database of biodegrading enzymes // *Bioinformation.* – 2012. – No. 8. – P. 40–42.
19. Tan N.C.G., Prenafeta-Boldu F.X., Opsteeg J.L., Lettinga G., Field J.A. Biodegradation of azo dyes in cocultures of anaerobic granular sludge with aerobic aromatic amine degrading enrichment cultures // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1999. – Vol. 51. – No. 6. – P. 865–871.
20. Weisburger J.H. A perspective on the history and significance of carcinogenic and mutagenic N-substituted aryl compounds in human health // *Mutat. Res.* – 1997. – Vol. 376. – No. 1–2. – P. 261–266.
21. Xu H., Heinze Th., Chen S., Cerniglia C. E., Chen H. Anaerobic metabolism of 1-Amino-2-Naphthol-Based azo dyes (Sudan Dyes) by human intestinal microflora // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2007. – Vol. 73. – No. 23. – P. 7759–7762.
22. Yemashova N., Kalyuzhnyi S. Microbial conversion of selected azo dyes and their breakdown products // *Wat. Sci. Technol.* – 2006. – Vol. 53. – No. 11. – P. 163–171.

ANAEROBIC DEGRADATION OF FOOD AZO DYES BY MICROBIAL COMMUNITIES ISOLATED FROM GASTROINTESTINAL TRACT OF MAMMALS

Yu.V. TAKTAROVA, I.B. KOTOVA, A.I. NETRUSOV

M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

The screening of 8 anaerobic communities isolated from the gastrointestinal tract (GIT) of various mammals for its ability to destroy food azo dyes by its methanogenic conversion into biogas was carried out. It is shown that, under the action of symbiotic microorganisms, azo dyes can undergo chemical transformations with formation of intermediates of different toxicity. After the contact of these substances and microbes there was a decrease of the total number of microbial cells and the change of different morphotypes' ratio in microbial communities. The succession of microbial communities from the gastrointestinal tract induced by food azo dyes and their derivatives may negatively affect the health of humans and animals.

Keywords: biodegradation, xenobiotics, azo dyes, microbial communities, methanogenesis.

ВЛИЯНИЕ АРАХИДОНОВОЙ КИСЛОТЫ НА РОСТ И СИНТЕЗ МИКОТОКСИНОВ ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ, ПОРАЖАЮЩИХ ЛЮЦЕРНУ

Ж.Н. ШЕМШЕЕВА¹, О.Н. ШЕМШУРА^{2*}, А.К. САДАНОВ², Н.Е. БЕКМАХАНОВА²,
Г.А. МОМБЕКОВА², С.В. КАМЗОЛОВА³, И.Г. МОРГУНОВ³

¹Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Алматы,

²РГП Институт микробиологии и вирусологии КН МОН РК, Алматы, Республика Казахстан;

³ФГБУН «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН»,
Пушино Московской области, Россия

Изучено влияние арахидоновой кислоты, выделенной из мицелия гриба *Mortierella alpina*, на рост и синтез микотоксинов фитопатогенных грибов *Purpureocillium lilacinum*, *Fusarium tricinctum* и *Fusarium oxysporum*, поражающих люцерну. Установлено, что арахидоновая кислота ингибировала колониеобразование грибов *F. tricinctum* и *F. oxysporum* на 69 и 90%, соответственно, и стимулировала на 62% — у гриба *P. lilacinum*. Проведенный биохимический анализ экстрактов культуральной жидкости и мицелия фитопатогенных грибов показал, что в их компонентном составе присутствуют токсины, относящиеся к алкалоидам индольной природы. В присутствии арахидоновой кислоты у фитопатогенных грибов не происходит образования ряда микотоксинов, в том числе, у *F. oxysporum* и *F. sporotrichiella* не синтезируется зеараленон, а у *P. lilacinum* — рокефортин и феллутанин. Высказано предположение, что арахидоновая кислота может быть использована как основа для создания экологически безопасного средства защиты кормовых культур от поражения токсинообразующими грибами.

Ключевые слова: грибы *Mortierella alpina*, арахидоновая кислота, фитопатогенные грибы, микотоксины.

Введение

Развитие животноводческого комплекса любой страны невозможно без расширения кормовой базы, поэтому значительные площади посевов отводят под многолетние бобовые травы, которые обеспечивают относительно высокий сбор дешевого кормового белка (Пестис, 2011) [11]. Во всем мире наиболее дешевый белок получают с посевов многолетних кормобобовых трав, в которых содержание белка в 2 раза больше, чем в злаковых (Усипбаев, 2016) [12].

В группе кормовых трав люцерна занимает особое место. Это одно из первых культурных растений, которое начал возделывать человек. Люцерна является основной кормовой культурой, дающей высокобелковые корма, сено, сенаж, травяную муку, гранулы, которые используют в кормлении всех видов животных (Губайдуллин,

Еникеев, 1982 [4]; Голобородько, 2001 [2]). Здоровье и продуктивность сельскохозяйственных животных, а также качество и количество получаемой от животных продукции в большей степени зависят от санитарного состояния кормов, потребляемых животными. Загрязнение микотоксинами значительно снижает качество кормов, делает их опасными для животных, а также людей, поскольку остатки микотоксинов могут присутствовать в продуктах питания (Авреньева и др., 1983 [1]; Binder et al., 2007 [13]; Cole, Schweikert, 2003 [14]; Dänicke et al., 2005 [15]; Ferrigo et al., 2015 [18]; Gallo et al., 2015 [19]; Guerre et al. 2015 [20]; Obremski et al., 2012 [24]; Perrone, Susca, 2017 [25]).

Одними из наиболее распространенных токсигенных грибов, поражающих кормобобовые культуры в Казахстане, в частности люцерну, являются грибы родов *Fusarium* и *Penicillium*. Токсины, выделяемые грибами, загрязняют зерно, силос, корма для животных (Dänicke et al., 2005 [15]; Gallo et al., 2015 [19]; Guerre, 2015 [20]; Ferrigo et al., 2016 [18]; Perrone, Susca 2017 [25]). Многие из микотоксинов грибов рода *Fusarium* и *Penicillium* являются индолсодержащими алкалоидами (Козловский и др., 2015) [7]. Высокая опасность микотоксинов выражается в том, что они обладают токсическим эффектом

© 2017 г. Шемшеева Ж.Н., Шемшура О.Н., Саданов А.К., Бекмаханова Н.Е., Момбекова Г.А., Камзолова С.В., Моргунов И.Г.

* Автор для переписки:

Шемшура Ольга Николаевна

кандидат биол. наук, зав. лабораторией защиты растений,

РГП Институт микробиологии и вирусологии КН МОН РК,

E-mail: olgashemshura@mail.ru

в чрезвычайно малых количествах и способны весьма интенсивно диффундировать в глубь продукта (Марфенина, Фомичева, 2007) [8].

В последние годы перспективным является использование арахиновой кислоты (АК) в качестве индуктора устойчивости растений к фитопатогенным грибам (Моргунов и др. 2016 [9]; Озерецковская, 1994 [10]; Eroshin, Dedyukhina, 2002 [17]; Dedyukhina et al., 2014 [16]; Morgunov et al., 2017 [23]). Применение индукторов болезнестойчивости растений, к которым относится АК, является одним из эффективных приемов фитосанитарной оптимизации растениеводства. Препараты этого типа отличаются низкой токсичностью для полезной фауны, по эффективности действия на фитопатогены зачастую не уступают фунгицидам химической природы, а меньшая стоимость и низкие нормы расхода делают их применение экономически выгодным. Использование индукторов болезнестойчивости целесообразно как в системах интегрированной защиты растений, так и в экологизированных технологиях возделывания сельскохозяйственных культур без применения химических средств защиты.

Цель работы — исследование влияния АК, выделенной из мицелия гриба *Mortierella alpina*, на рост и образование микотоксинов у фитопатогенных грибов *Purpureocillium lilaci*, *Fusarium tricinctum* и *Fusarium oxysporum*, поражающих люцерну.

Материалы и методы

Объектом исследования служил препарат АК, полученный из гриба *M. alpina* ЛРМ-301 в Институте биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН. Препарат содержал смесь этиловых эфиров жирных кислот с содержанием АК 40%.

В качестве тест-культур в работе использовали изоляты фитопатогенных грибов *P. lilaci* (синоним *Penicillium lilacinum* — Thom, 1910), *F. tricinctum*, *F. oxysporum*, выделенные в 2015 году из ризосферы и семян многолетней люцерны сорта «Кокорай», произрастающей в Южно-Казахстанской области. Фитопатогенные грибы поддерживали в пробирках на скошенном сусле-агаре.

Для определения ингибирующего действия АК на колониеобразование патогенных грибов ее вносили в количестве 3 мл в 200 мл среды КГА (конечная концентрация АК в питательной среде составляла 0,6%). Среда разливалась в чашки Петри. Затем в среду вносили 0,1 мл суспензии фитопатогенного гриба и растирали стериль-

ным шпателем. В контроле АК в среду культивирования не вносилась. Учет количества выросших колоний в опыте и контроле проводили через 7 суток роста фитопатогенных грибов при 28 °С. Среда КГА готовится следующим способом: 200 г нарезанного ломтиками очищенного картофеля варят 30 минут в 1 л воды, затем фильтруют через марлю, к фильтрату добавляют воду до прежнего объема, вносят 20 г агара и 3 г глюкозы.

Влияние АК гриба *M. alpina* на синтез микотоксинов, синтезируемых грибами *F. oxysporum*, *F. tricinctum* и *P. lilaci*, изучали следующим образом: АК в количестве 3 мл добавляли в 200 мл среды Абе следующего состава (г/л): маннит — 50; янтарная кислота — 5,4; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,3; KH_2PO_4 — 1,0; pH доводили до 5,4 концентрированным раствором NH_4OH . В колбу вносили 5 мл суспензии исследуемого фитопатогенного гриба и проводили культивирование каждого вида гриба в течение 12 суток при 27 ± 1 °С на качалке (180–200 об/мин). В контроле в среду культивирования фитопатогенных грибов АК не добавляли.

Токсины экстрагировали из фильтрата культуральной жидкости и мицелия на 12-е сутки роста бутанолом. Экстракты сушили безводным сульфатом натрия, отфильтровывали и упаривали досуха в вакууме. Хроматографический анализ экстрактов на содержание токсинов в фитопатогенных грибах, а также влияние АК на изменение количественного и качественного состава микотоксинов проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) в системе растворителей: хлороформ/метанол/аммиак = 90:10:0,1 на пластинках TLC Silica gel 60 F₂₅₄ (Germany). Вещества обнаруживали по поглощению и флуоресценции в УФ свете и после опрыскивания пластин реактивом Эрлиха (Зеленкова и др., 2003) [5]. Результаты сравнивали со стандартными веществами.

В качестве стандартных веществ были использованы токсины, загрязняющие зерно, силос, корма для животных: рокефортин (ML-0406 Sigma), феллутанин, зеараленон (полученные в лаборатории вторичных метаболитов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина).

Результаты

Влияние АК на колониеобразование фитопатогенных грибов. На рисунке 1 представлены фотографии колоний фитопатогенных грибов *P. lilacinum*, *F. tricinctum* и *F. oxysporum* без внесения препарата АК (а — контроль) и с внесением препарата АК (б — опыт). Колонии грибов *F. tricinctum* и *F. oxysporum* в присут-

ствии АК отличались от колоний в контроле как по цвету, так и по размеру. Колонии *P. lilacinum* в присутствии АК также морфологически изменились: если в контроле колонии крупные и рыхлые, то под влиянием АК произошло уменьшение размера колоний почти в 2 раза; при этом структура их стала более плотной, наблюдалось отсутствие розовато-кремового пигмента.

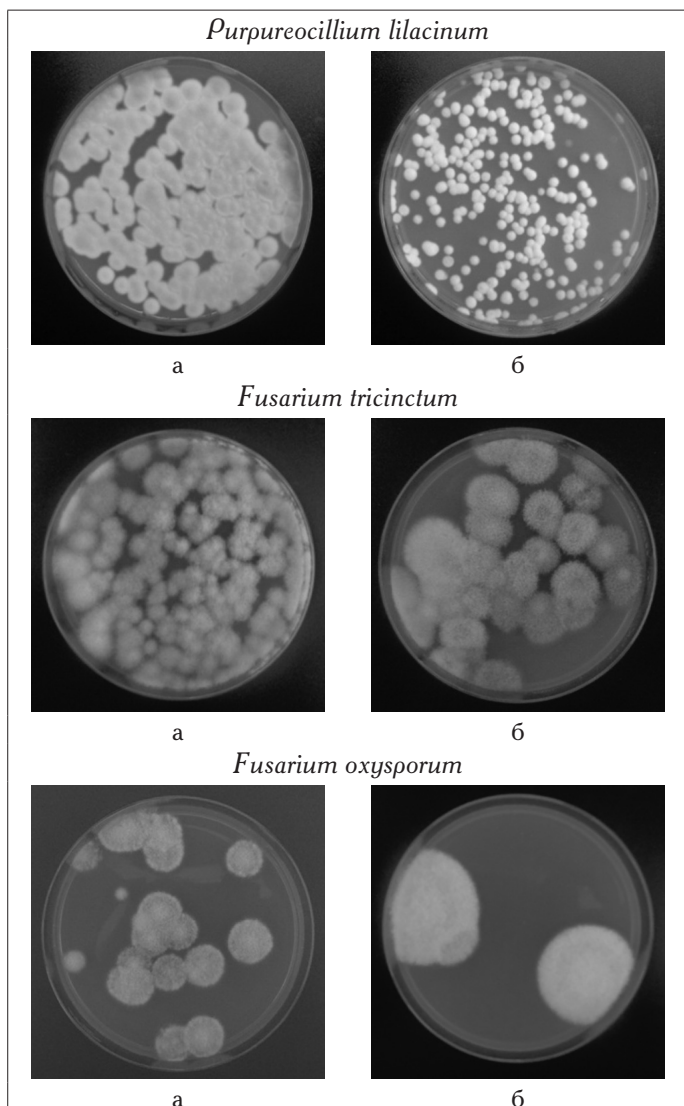


Рис. 1. Влияние препарата АК на рост колоний фитопатогенных грибов: а — контроль (среда без АК); б — опыт (среда с АК)

В таблице 1 даны сведения о влиянии АК на колониеобразование фитопатогенных грибов. В варианте с *F. tricinctum* присутствие АК в среде культивирования привело к снижению количества выросших колоний на 69%. Наибольшее влияние препарат АК оказал на рост гриба *F. oxysporum*: при его внесении в среду культивирования наблюдалось подавление колониеобразования на 90%. Количество колоний гриба *P. lilacinum* в присутствии АК увеличилось на 62 %.

Влияние препарата АК на биосинтез микотоксинов. Для выявления механизма ингибирующего действия АК на фитопатогенные грибы *F. oxysporum*, *F. tricinctum* и *P. lilacinum* был проведен хроматографический анализ экстрактов мицелия и культуральной жидкости грибов, которые были получены в результате культивирования их в присутствии АК (опыт) и в отсутствие АК (контроль).

Таблица 1

Влияние АК на колониеобразование фитопатогенных грибов

Исследуемый объект	% стимулирования (-)/ингибирования (+) колониеобразования		
	<i>P. lilacinum</i>	<i>F. tricinctum</i>	<i>F. oxysporum</i>
Препарат АК	-62	+69	+90

Тонкослойная хроматография является экспресс-анализом микотоксинов, выделенных из микроскопических грибов, по хроматографической подвижности (R_f), флуоресценции, цветной реакции со специфическими реактивами в присутствии стандартных веществ она дает возможность первичной идентификации метаболитов (Зеленкова и др., 2003) [5].

В таблице 2 представлены данные о влиянии АК на изменение качественного и количественного состава микотоксинов, присутствующих в экстракте мицелия *F. oxysporum*, *F. tricinctum* и *P. lilacinum*.

Как видно из таблицы 2, в экстракте мицелия *F. oxysporum*, выращенного на среде без АК (контроль), обнаружено 10 метаболитов и 6 из них отнесены к веществам индольной природы: метаболит с $R_f=0,02$ имел сине-голубое свечение в УФ-свете и коричнево-синее окрашивание после обработки реактивом Эрлиха; метаболит с $R_f=0,14$ имел серое свечение в УФ-свете и светло-синее окрашивание после обработки реактивом Эрлиха; метаболит с $R_f=0,31$ имел бежевое свечение в УФ-свете и фиолетово-розовое окрашивание после обработки реактивом Эрлиха; компонент с $R_f=0,49$ имел коричневое свечение в УФ-свете и синее окрашивание после обработки реактивом Эрлиха; метаболит с $R_f=0,60$ не имел свечения в УФ-свете, но после обработки реактивом Эрлиха проявился на хроматограмме коричнево-синей зоной; метаболит с $R_f=0,74$ имел темнопоглощающую зону в УФ-свете и голубое окрашивание после обработки реактивом Эрлиха. В то же время в экстракте мицелия гриба *F. oxysporum*, выросшем на среде с добавлением АК (опыт), общее количество метаболитов сократилось в 3,3 раза; среди них выявлен один метаболит индольной природы с $R_f=0,60$.

Таблица 2

Влияние АК на состав микотоксинов в экстракте мицелия фитопатогенных грибов

Организм	Контроль (среда без АК)			Опыт (среда с АК)		
	R _f	Свечение в УФ-свете	Окраска с реактивом Эрлиха	R _f	Свечение в УФ-свете	Окраска с реактивом Эрлиха
<i>F. oxysporum</i>	0,02	сине-голубое*	коричнево-синяя*	—	—	—
	0,14	серое	светло-синяя	—	—	—
	0,19	голубое	—	0,19	голубое	—
	0,22	бирюзовое	—	0,22	бирюзовое	—
	0,26	коричневое	—	—	—	—
	0,31	бежевое	фиолетово-розовая	—	—	—
	0,49	коричневое	синяя	—	—	—
	0,60	—	коричнево-синяя	0,60	—	коричнево-синяя
	0,74	темно-поглощающее	голубая	—	—	—
	0,97	песочное	—	—	—	—
<i>F. tricinatum</i>	0,02	сине-голубое*	коричнево-синяя*	—	—	—
	0,06	серая	—	0,06	серое	—
	0,14	светло-зеленое	светло-синяя	—	—	—
	0,28	голубое	—	0,28	голубое	—
	0,79	темно-поглощающее	голубая	—	—	—
	0,87	серое	розовое	0,87	серое	розовая
	0,97	бежевое	фиолетово-розовая	—	—	—
<i>P. lilacinum</i>	0,15	бирюзовое*	фиолетово-синяя*	—	—	—
	0,34	серое	—	0,34	серое	—
	0,44	оранжевое	оранжевая	0,44	оранжевое	оранжевая
	0,73	темно-поглощающее	желто-голубая	—	—	—
	0,85	голубое	сине-серая	—	—	—
	0,93	желтое	синее	0,93	желтое	синяя

Примечание: * — обозначает соответствие метаболита стандартному образцу микотоксина, приведенному в таблице 4

Из таблицы 2 следует, что в экстракте мицелия гриба *F. tricinatum*, выросшего на среде без добавления АК (контроль), обнаружено наличие 7 метаболитов, из которых 5 были индольной природы: метаболит с R_f=0,02 имел сине-голубое свечение в УФ-свете и коричнево-синее окрашивание после обработки реактивом Эрлиха; метаболит с R_f=0,14 имел светло-зеленое свечение в УФ-свете и светло-синее окрашивание после обработки реактивом Эрлиха; метаболит с R_f=0,79 имел темнопоглощающую зону в УФ-свете и голубое окрашивание после обработки реактивом Эрлиха; метаболит с R_f=0,87 имел серое свечение в УФ-свете, и розовое окрашивание после обработки реактивом Эрлиха и метаболит с R_f=0,97 имел бежевое свечение в УФ-свете и фиолетово-розовое окрашивание после обработки реактивом Эрлиха. В то же время в присутствии АК (опыт) в экстракте мицелия *F. tricinatum* общее количество метаболитов снизилось в 2,3 раза, а количество индолсодержащих метаболитов снизилось

с пяти до двух: метаболиты с R_f=0,38 и с R_f=0,87, у которого отмечено серое свечение в УФ-свете и розовое окрашивание после обработки реактивом Эрлиха.

В таблице 2 также приводится, что в экстракте мицелия гриба *P. lilacinum*, выросшего на среде без добавления АК (контроль), найдено 6 метаболитов, пять из которых индольной природы: метаболит с R_f=0,15 имел бирюзовое свечение в УФ-свете и фиолетово-синее окрашивание после обработки реактивом Эрлиха; метаболит с R_f=0,34 имел темно-синее свечение в УФ-свете и фиолетовое окрашивание после обработки реактивом Эрлиха; метаболит с R_f=0,44 имел оранжевое свечение в УФ-свете и оранжевое окрашивание после обработки реактивом Эрлиха; метаболит с R_f=0,73 имел темно-поглощающую зону в УФ-свете и желто-голубое окрашивание после обработки реактивом Эрлиха; метаболит с R_f=0,85 имел голубое свечение в УФ-свете и сине-серое окрашивание после обработки реактивом

Эрлиха и компонент с $R_f=0,93$ имел желтое свечение в УФ-свете и синий цвет на хроматограмме после обработки реактивом Эрлиха. В то же время в присутствии АК (опыт) в экстракте мицелия *P. lilacinum* общее количество метаболитов сократилось в 2 раза, выявлено три метаболита, относящихся к алкалоидам: метаболиты с $R_f=0,34$, $R_f=0,44$ и $R_f=0,93$.

В таблице 3 представлены данные о влиянии АК гриба *M. alpina* на качественный и количественный состав микотоксинов, присутствующих в экстракте культуральной жидкости исследуемых фитопатогенных грибов. Как видно из таблицы 3, в экстракте культуральной жидкости *F. oxysporum* выявлено 9 метаболитов, из которых 7 дали положительную реакцию с реактивом Эрлиха: метаболит с $R_f=0,03$ имел сине-голубое свечение в УФ-свете и ко-

ричнево-синее окрашивание после обработки реактивом Эрлиха; метаболит с $R_f=0,14$ имел зеленое свечение в УФ-свете и фиолетовое окрашивание после обработки реактивом Эрлиха; метаболит с $R_f=0,16$ не имел свечения в УФ-свете, но после обработки реактивом Эрлиха проявился на хроматограмме серой зоной; метаболит с $R_f=0,24$ имел зеленое свечение в УФ-свете и фиолетовое окрашивание после обработки реактивом Эрлиха; метаболит с $R_f=0,71$ имел темнопоглощающую зону в УФ-свете и фиолетовое окрашивание после обработки реактивом Эрлиха; метаболит с $R_f=0,87$ имел темнопоглощающую зону в УФ-свете и голубое окрашивание после обработки реактивом Эрлиха и метаболит с $R_f=0,97$ имел светло-коричневое свечение в УФ-свете и фиолетовое окрашивание после обработки реактивом Эрлиха.

Таблица 3

**Влияние АК на состав микотоксинов в экстракте культуральной жидкости
исследуемых фитопатогенных грибов**

Организм	Контроль (среда без АК)			Опыт (среда с АК)		
	R_f	Свечение в УФ-свете	Окраска с реактивом Эрлиха	R_f	Свечение в УФ-свете	Окраска с реактивом Эрлиха
<i>F. oxysporum</i>	0,03	сине-голубое*	коричнево-синяя*	—	—	—
	0,14	зеленое	фиолетовая	—	—	—
	0,16	—	серая	—	—	—
	0,24	зеленое	фиолетовая	0,24	зеленое	фиолетовая
	0,49	коричневое	—	0,49	коричневое	—
	0,71	темно-поглощающее	фиолетовая	—	—	—
	0,85	темно-поглощающее	—	—	—	—
	0,87	желтое	голубая	0,60	—	коричнево-синяя
	0,97	светло-коричневое	голубая	—	—	—
<i>F. tricinctum</i>	0,02	сине-голубое*	коричнево-синяя*	—	—	—
	0,09	зеленое	фиолетово-розовая	—	—	—
	0,10	—	синяя	—	—	—
	0,16	темно-поглощающее	светло-синяя	—	—	—
	0,38	темно-поглощающее	фиолетовая	—	—	—
	0,62	темно-поглощающее	фиолетовая	—	—	—
	0,68	темно-поглощающее	фиолетовая	0,68	темно-поглощающее	фиолетовая
	0,85	ярко-голубое	фиолетовая	0,85	ярко-голубое	фиолетовая
	0,89	бордовое	розово-синяя	—	—	—
0,97	—	коричнево-синяя	—	—	—	
<i>P. lilacinum</i>	0,14	бирюзовое*	фиолетово-синяя*	—	—	—
	0,20	темно-поглощающее	фиолетовая	0,20	темно-поглощающее	фиолетовая
	0,31	желтое*	голубая*	—	—	—
	0,43	темно-поглощающее	—	0,43	темно-поглощающее	—
	0,64	серое	—	0,64	серое	—
	0,71	темно-поглощающее	фиолетовая	—	—	—
	0,74	серое	—	—	—	—
	0,85	голубое	сине-серая	0,85	голубое	сине-серая
0,93	серое	—	—	—	—	

Примечание: * — обозначает соответствие метаболита стандартному образцу микотоксина, приведенному в таблице 4

В то же время в присутствии АК (опыт) в экстракте культуральной жидкости *F. oxysporum* общее количество метаболитов сократилось в 4,5 раза, из индольных веществ 6 не синтезировались, а в компонентном составе выявлен один индолсодержащий метаболит с $R_f=0,24$.

Результаты хроматографического анализа экстракта культуральной жидкости гриба *F. tricinctum*, представленные в таблице 3, показали наличие 10 метаболитов, которые дали положительную реакцию с реактивом Эрлиха: метаболит с $R_f=0,02$ имел синее-голубое свечение в УФ-свете и коричнево-синее окрашивание после обработки реактивом Эрлиха; метаболит с $R_f=0,09$ имел зеленое свечение в УФ-свете и фиолетово-розовое окрашивание после обработки реактивом Эрлиха; метаболит с $R_f=0,1$ не имел свечения в УФ-свете, однако после обработки реактивом Эрлиха проявился в виде синей зоны на хроматограмме; метаболит с $R_f=0,14$ имел бирюзовое свечение в УФ-свете и светло-синее окрашивание после обработки реактивом Эрлиха; метаболит с $R_f=0,38$ имел темнопоглощающую зону в УФ-свете и фиолетовое окрашивание после обработки реактивом Эрлиха; метаболит с $R_f=0,62$ имел темнопоглощающую зону в УФ-свете и фиолетовое окрашивание после обработки реактивом Эрлиха; метаболит с $R_f=0,78$ имел темнопоглощающую зону в УФ-свете и голубое окрашивание после обработки реактивом Эрлиха и компонент с $R_f=0,85$ имел ярко-голубое свечение в УФ-свете и фиолетовое окрашивание после обработки реактивом Эрлиха; метаболит с $R_f=0,89$ имел бордовое свечение в УФ-свете и розово-серое окрашивание после обработки реактивом Эрлиха; метаболит с $R_f=0,97$ не имел свечения в УФ-свете, однако после обработки реактивом Эрлиха проявился в виде коричнево-синей зоны на хроматограмме. В то же время в присутствии АК (опыт) в экстракте культуральной жидкости *F. tricinctum* произошло снижение количества индолсодержащих метаболитов в 5 раз, были обнаружены только два метаболита: метаболит с $R_f=0,68$ и метаболит с $R_f=0,85$.

Из таблицы 3 также видно, что при культивировании гриба *P. lilacinum* на среде без добавления АК (контроль) в экстракте культуральной жидкости выявлено 9 метаболитов, из которых 5 относятся к индолсодержащим алкалоидам: метаболит с $R_f=0,14$ имел бирюзовое свечение в УФ-свете и фиолетово-синее окрашивание после обработки реактивом Эрлиха; метаболиты с $R_f=0,20$ и $R_f=0,71$ имели темнопоглощающую зону в УФ-свете и фиолетовое окрашивание после обработки реактивом Эрлиха; метаболит с $R_f=0,31$ имел желтое свечение в УФ-свете и голубое окрашивание после обработки реак-

тивом Эрлиха; компонент с $R_f=0,85$, имеющий голубое свечение в УФ-свете и синее-серое окрашивание после обработки реактивом Эрлиха. В то же время в присутствии АК (опыт) в экстракте культуральной жидкости гриба *P. lilacinum* отмечено уменьшение общего количества метаболитов в 2,2 раза и выявлены алкалоиды с $R_f=0,20$ и $R_f=0,85$.

Таблица 4

Характеристика стандартных образцов (эталонных) микотоксинов

Стандартный образец	R_f	Свечение в УФ-свете	Окраска с реактивом Эрлиха
Зеараленон	0,02	синее-голубое	коричнево-синяя
Феллутанин А	0,14	бирюзовое	фиолетово-синяя
Рокефортин	0,30	желтое	голубая

Для сравнения в таблице 4 представлены результаты хроматографического анализа стандартных веществ (эталонных) микотоксинов: зеараленон имеет $R_f=0,02$, синее-голубую флуоресценцию в УФ-свете и коричнево-синее окрашивание после обработки реактивом Эрлиха; феллутанин А имеет $R_f=0,14$, бирюзовую флуоресценцию в УФ-свете и фиолетово-синее окрашивание после обработки реактивом Эрлиха; рокефортин имеет $R_f=0,30$, желтую флуоресценцию в УФ-свете и голубое окрашивание после обработки реактивом Эрлиха.

Обсуждение

В настоящей работе впервые было обнаружено, что АК гриба *M. alpina* влияет на колониеобразование у фитопатогенных грибов, выделенных из ризосферы и семян многолетней люцерны сорта «Кокорай», произрастающей в Южно-Казахстанской области. Так, установлено, что АК обладает мощным ингибирующим эффектом против *F. tricinctum* и *F. oxysporum*, подавляя их колониеобразование на 69 и 90%, соответственно (см. табл. 1). Хотя АК оказала стимулирующий эффект на образование колоний грибом *P. lilacinum*, следует отметить, что сами колонии морфологически изменились: под влиянием АК произошло уменьшение размера колоний почти в 2 раза, их структура стала более плотной, отсутствовала розовато-кремовая пигментация (см. рис. 1).

Необходимо подчеркнуть, что в последние годы публикуется все больше данных об антимикробном потенциале других органических кислот — лимонной кислоты, янтарной кислоты, α -кетоглутаровой кислоты и пальмитолеиновой кислоты. Сравнительно недавно

мы нашли, что фильтрат культуральной жидкости гриба *Aspergillus candidus*, содержащий в своем составе лимонную кислоту и 1,2-диметил цитрат, проявлявших нематоцидную активность против паразитических нематод *Ditylenchus destructor*, которые особенно опасны для картофеля, и корневых нематод *Meloidogyne incognita* (Shemshura et al., 2016) [26]. Янтарная кислота тормозит рост бактерий *Erwinia carotovora* (возбудитель черной ножки — мягкой гнили — картофеля) и грибов *Penicillium casei* (возбудитель пенициллеза — голубой гнили); обладает ярко выраженной нематоцидной активностью: после 72-часовой выдержки с янтарной кислотой летальность особо губительных для картофеля фитопаразитических стеблевых нематод *Ditylenchus destructor* составляла около 60% (Kamzolova et al., 2014) [22]. α -Кетоглутаровая кислота угнетает рост грибов *Fusarium napiforme* и фитопаразитических стеблевых нематод *Ditylenchus destructor* (Камзолова и др., 2016) [6]. Этиловые и метиловые эфиры пальмитолеиновой кислоты проявляют высокую антимикробную активность в отношении таких патогенов, как *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* и *Porphyromonas gingivalis* (Huang et al., 2010) [21].

Анализируя полученные результаты по изучению влияния препарата АК на биосинтез токсинов фитопатогенных грибов, мы установили, что на среде с АК у них не происходит образования ряда микотоксинов. Так, у гриба *F. oxysporum* при росте на среде без добавления АК было обнаружено в экстракте мицелия 6 метаболитов, а в культуральной жидкости — 7 метаболитов, относящихся к индолсодержащим алкалоидам. В то же время в присутствии АК как в экстракте мицелия, так и культуральной жидкости количество токсинов снизилось до одного (см. табл. 2, 3). Метаболиты, продемонстрированные в контрольных вариантах экстракта мицелия с $R_f=0,02$ и экстракта культуральной жидкости с $R_f=0,03$ и дававшие сине-голубую флуоресценцию и коричнево-синее окрашивание с реактивом Эрлиха, соответствовали по тем же параметрам микотоксину зеараленону (стандарт) (см. табл. 4). В опытных вариантах (внесение АК) у гриба *F. oxysporum* образование этого токсина отсутствовало как в мицелии, так и в культуральной жидкости (см. табл. 2, 3). У штамма *F. tricinctum*, как и у гриба *F. oxysporum* при росте на среде с АК, также отмечено снижение количества образуемых токсинов, и в их числе зеараленон (см. табл. 2, 3). Ряд авторов в своих работах отметил, что зеараленон является одним из наиболее распространенных токсинов, синтезируется

грибами рода *Fusarium*, загрязняющими зерно, силос, корма для животных (Dänicke et al., 2005 [15]; Ferrigo et al., 2016 [18]; Obremski et al., 2012 [24]). Факт влияния препарата АК на снижение образования токсичного зеараленон делает его перспективным в качестве фунгицида для защиты кормовых культур от загрязнения токсинообразующими грибами.

Проведенный сравнительный хроматографический анализ экстрактов мицелия и культуральной жидкости гриба *P. lilacinum* выявил наличие 5 алкалоидов в мицелии и в культуральной жидкости. Метаболиты с $R_f=0,15$ (экстракт мицелия) и $R_f=0,14$ (экстракт культуральной жидкости) по своей хроматографической подвижности, бирюзовому свечению в УФ-свете и фиолетово-синему окрашиванию после обработки реактивом Эрлиха соответствовали стандартно феллутанину. Кроме феллутанина, в культуральной жидкости гриба *P. lilacinum* обнаружен метаболит с $R_f=0,31$, имеющий желтое свечение в УФ-свете и голубое окрашивание после обработки реактивом Эрлиха, соответствующий стандарту рокефортина (см. табл. 2, 3). Было обнаружено, что как в экстракте мицелия, так и культуральной жидкости гриба *P. lilacinum*, выросшем на среде с добавлением АК (опыт), общее количество метаболитов сократилось в 2 раза, а количество токсинов, представляющих собой индолсодержащие алкалоиды, сократилось с пяти метаболитов до одного. При этом токсины, соответствующие стандартным образцам «феллутанин» и «рокефортин», отсутствовали (см. табл. 2, 3).

В литературе отмечен синтез микотоксинов феллутанина и рокефортина у грибов рода *Penicillium*. Хроматографические характеристики метаболитов, полученные нами при исследовании экстрактов мицелия и культуральной жидкости гриба *P. lilaci*, соответствуют литературным данным (Зеленкова и др., 2003 [5]; Cole, Schweikert, 2003 [14]; Козловский и др., 2015 [7]).

Заключение

В заключение хотелось бы отметить, что АК может быть использована как основа для создания экологически безопасного фунгицида для защиты кормовых культур от поражения токсинообразующими грибами.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан в соответствии с исследовательским проектом № 0373/ГФ4.

Литература

1. Авреньева Л.И., Соболев В.С., Кравченко Л.В., Тутельян В.А. Микотоксины в кормах // Гигиена и санитария. — 1983. — № 2. — С. 27–28.
2. Голобородько С.П. Семеноводство люцерны. — Херсон. 2001. — 222 с.
3. Гончаров П.Л., Лубенец П.Л. Биологические аспекты возделывания люцерны. — Новосибирск: Наука, 1985. — 255 с.
4. Губайдуллин Х.Г., Еникеев Р.С. Люцерна на корм и семена. — М.: Россельхозиздат, 1982. — 111 с.
5. Зеленкова И.Ф., Винокурова Н.Г., Аринбасаров М.У. Анализ вторичных метаболитов микроскопических грибов рода *Penicillium* хроматографическими методами // Прикл. биохим. микробиол. — 2003. — Т. 39. — № 1. — С. 52–62.
6. Камзолова С.В., Самойленко В.А., Шемшюра О.Н., Бекмаханова Н.Е., Лунина Ю.Н., Аллаяров Р.К., Степанова Н.Н., Моргунов И.Г. Способ получения α -кетоглутаровой кислоты из этанола с помощью дрожжей *Yarrowia lipolytica* // В сб.: Вклад микробиологии и вирусологии в современную биоиндустрию: Междунар. науч.-практич. конф. — Алматы, 2016. — С. 173–176.
7. Козловский А.Г., Желифонова В.П., Антипова Т.В. Биосинтез низко-молекулярных физиологически активных соединений грибами рода *Penicillium* (Обзор) // Прикл. биохим. микробиол. — 2015. — Т. 51. — № 2. — С. 236–241.
8. Марфенина О.Е., Фомичева Г.М. Потенциальные патогенные мицелиальные грибы в среде обитания человека. Современные тенденции // Микология сегодня / Под ред. Ю.Т. Дьякова, Ю.В. Сергеева. — М.: Национальная академия микологии, 2007. — Т. 1. — С. 235–266.
9. Моргунов И.Г., Дедюхина Э.Г., Камзолова С.В., Чистякова Т.И., Лунина Ю.Н., Миронов А.А., Степанова Н.Н., Шемшюра О.Н., Вайнштейн М.Б. Микробиологическое получение препаратов органических кислот в качестве средств защиты растений // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2016. — Т. 12. — № 3. — С. 41–52.
10. Озерецковская О.Л. Индуцирование устойчивости растений биогенными элиситорами фитопатогенов // Прикл. биохим. микробиол. — 1994. — Т. 30. — № 3. — С. 325–331.
11. Пестис В.К. и др. Современные технологии производства продукции животноводства: рекомендации / Под общ. ред. В.К. Пестиса, Е.А. Добрука. — Гродно: ГГАУ, 2011. — 462 с.
12. Усипбаев Н.Б. Формирование урожая разновозрастной люцерны в зависимости от приемов обработки почвы в предгорно-степной зоне Юго-Востока Казахстана: дис. ... доктора PhD. — Казахский национальный аграрный университет, Алматы, 2016. — 139 с.
13. Binder E.M., Tan L.M., Chin L.J., Handl J., Richard J. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, animal feed and feed ingredients // *Animal Feed Sci. Technol.* — 2007. — Vol. 137. — P. 265–282.
14. Cole R.J., Schweikert M.A. Handbook of secondary fungal metabolites. — Academic, San Diego, 2003.
15. Dedyukhina E.G., Kamzolova S.V., Vainshtein M.B. Arachidonic acid as an elicitor of the plant defense response to phytopathogens (Review) // *Chemical and Biological Technologies in Agriculture.* — 2014. — Vol. 1. — No. 1. — P. 1–6.
16. Dänicke S.K., Matthäus P.L., Valenta K., Stemme K.H., Ueberschär E., Razzazi-Fazeli J.B., Flachowsky G. Effects of Fusarium toxin-contaminated wheat grain on nutrient turnover, microbial protein synthesis and metabolism of deoxynivalenol and zearalenone in the rumen of dairy cows // *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* — 2005. — Vol. 89. — P. 303–315.
17. Eroshin V.K., Dedyukhina E.G. Effect of lipids from *Mortierella hygrophila* on plant resistance to phytopathogens // *World J. Microbiol. Biotechnol.* — 2002. — Vol. 18. — P. 165–167.
18. Ferrigo D., Raiola A., Causin R. Fusarium toxins in cereals: Occurrence, legislation factors promoting the appearance and their management // *Molecules.* — 2015. — Vol. 21. — P. 627.
19. Gallo A., Giuberti G., Bertuzzi T., Moschini M. Study of the effects of PR toxin, mycophenolic acid and roquefortine C on in vitro gas production parameters and their stability in the rumen environment // *J. Agric. Sci.* — 2015. — Vol. 153. — P. 163–176.
20. Guerre P. Fusariotoxins in avian species: Toxicokinetics, metabolism and persistence in tissues // *Toxins.* — 2015. — Vol. 7. — P. 2289–2305.
21. Huang C.B., George B., Ebersole J.L. Antimicrobial activity of n-6, n-7 and n-9 fatty acids and their esters for oral microorganisms // *Arch. Oral Biol.* — 2010. — Vol. 55. — No. 8. — P. 555–560.
22. Kamzolova S.V., Vinokurova N.G., Shemshura O.N., Bekmakhanova N.E., Lunina J.N., Samoilenko V.A., Morgunov I.G. The production of succinic acid by yeast *Yarrowia lipolytica* through a two-step process // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2014. — Vol. 98. — P. 7959–7969.
23. Morgunov I.G., Kamzolova S.V., Dedyukhina E.G., Chistyakova T.I., Lunina J.N., Mironov A.A., Stepanova N.N., Shemshura O.N., Vainshtein M.B. Application of organic acids for plant protection against phytopathogens // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2017. — Vol. 101. — P. 921–932.

24. Obremski M., Lutnicki K, Gajecki M. Zearalenone and deoxynivalenolmycotoxicosis // Pol. J. Vet. Sci. – 2012. – Vol. 15. – P. 365–372.
25. Perrone G., Susca A. Penicillium species and their associated mycotoxins // Methods Mol. Biol. – 2017. – Vol. 1542. – P. 107–119.
26. Shemshura O.N., Bekmakhanova N.E., Mazunina M.N., Meyer S.L., Rice C.P., Masler E.P. Isolation and identification of nematode-antagonistic compounds from the fungus *Aspergillus candidus* // FEMS Microbiol. Lett. – 2016. – Vol. 363(5). – fnw026.

THE EFFECT OF ARACHIDONIC ACID FOR THE GROWTH AND SYNTHESIS OF MYCOTOXINS OF PHYTOPATHOGENIC FUNGI, ATTACKED THE ALFALFA

Zh.N. SHEMSHEYEVA¹, O.N. SHEMSHURA², A.K. SADANOV², N.E. BEKMAKHANOVA², G.A. MOMBEKOVA², S.V. KAMZOLOVA³, I.G. MORGUNOV³

¹*Al-Farabi Kazakh National University, Almaty,*

²*Institute of Microbiology and Virology CS MES RK, Almaty, Republic of Kazakhstan;*

³*G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, RAS, Pushchino, Russia*

The effect of arachidonic acid isolated from the fungal mycelium *Mortierella alpina* on the growth and synthesis of mycotoxins of the phytopathogenic fungi *Purpureocillium lilaci*, *Fusarium tricinctum* and *Fusarium oxysporum* attacked the alfalfa cultivar was studied. It was shown that arachidonic acid inhibited the colony formation of *F. tricinctum* and *F. oxysporum* for 69 and 90%, respectively, and stimulated for 62% in *P. lilacinum*. The biochemical analysis of the extracts of the culture liquid and the mycelium of phytopathogenic fungi showed that toxins belonging to the alkaloids of the indole nature are present in their component composition. It has been established that the phytopathogenic fungi, grown in the presence of arachidonic acid, do not produced several mycotoxins, in particular, *F. oxysporum* and *F. tricinctum* do not synthesize zearalenone, while the fungus *P. lilacinum* – roquefortine and fellutanine. It is suggested that arachidonic acid can be used as the basis of bioproduct for the protection of crops from a number of fungi diseases.

Keywords: fungus *Mortierella alpina*, arachidonic acid, phytopathogenic fungi, mycotoxins.

СОЗДАНИЕ КУЛЬТУР БОРОДАТЫХ КОРНЕЙ *WITHANIA SOMNIFERA* И ОЦЕНКА ПАРАМЕТРОВ ИХ РОСТА ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ НА ТВЕРДЫХ И ЖИДКИХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

Е.В. МИХАЙЛОВА*, Б.Р. КУЛУЕВ, Г.Р. ЯСЫБАЕВА, А.В. ЧЕМЕРИС

ФГБУН «Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН», Уфа

Withania somnifera — ценное лекарственное растение, произрастающее в Индии. Его биологически активные вещества можно получать из культуры бородачатых корней вне зависимости от климата. Эффективность трансформации семядольных листьев *W. somnifera* составила 70% при использовании *A. rhizogenes* штамма А4 и 60% — при использовании штамма 15834. С использованием штамма А4 было получено 23 линии бородачатых корней, длина которых на твердой среде увеличивалась в среднем в 6,2 раза за три недели, а вес сырой массы на жидкой среде — в 7,2 раза за две недели. С использованием штамма 15834 было получено 49 линий бородачатых корней, их длина увеличивалась в среднем в 5,97 раз, а вес — в 5,3 раза. Отдельные линии корней демонстрировали более интенсивный рост и представляют интерес для биотехнологического производства.

Ключевые слова: *Withania somnifera*, витания, ашваганда, *Agrobacterium rhizogenes*, бородачатые корни, генетически трансформированные корни, скорость роста.

Введение

Withania somnifera L. (Ашваганда) — ценное лекарственное растение, используемое как в традиционной медицине, так и в качестве биологически активной добавки. В его состав входят более 12 различных алкалоидов, флавоногликозиды, лигнаны, стероидные лактоны группы витанолидов [11]. Эти вещества выделяют из корней *W. somnifera* и применяют в лечении туберкулеза, ревматизма, рака, воспалительных заболеваний, заболеваний сердечно-сосудистой системы, а также в качестве общеукрепляющего средства [2]. Из более чем 40 витанолидов в составе *W. somnifera* наиболее ценны вещества витанолид А и витаферин А, у которых была обнаружена противораковая активность [4, 5]. Витаанолид А способен реконструировать нейронные сети и благодаря этому имеет перспективы в лечении нейродегенеративных болезней, в том числе болезни Альцгеймера, паркинсонизма, конвульсий, различных когнитивных нарушений [15]. Витаферин А известен противораковыми свойствами, основанными на торможении роста клеток различных видов злокачественных опухолей, например, рака легких [3].

Витанолиды составляют 0,001–0,5% сухой массы растения. Эти вещества пока не удалось синтезировать химически, их получают только из растительного сырья. *W. somnifera* культивируется в основном в засушливых регионах Индии [8]; в странах же с более холодным климатом получать растительное сырье традиционным способом не удастся. Сбор *W. somnifera* в естественных местообитаниях ставит под угрозу существование вида [13].

Одним из хорошо зарекомендовавших себя способов получения биологически активных веществ растений являются культуры бородачатых (или «косматых») корней, которые могут выращиваться в промышленных масштабах в биореакторах. Таковые уже были получены для *W. somnifera* ранее [9], и было показано, что концентрация витанолида А в бородачатых корнях (157,4 мкг/г сухой массы) была в 2,7 раз выше, чем в обычных (57,9 мкг/г сухой массы). Биомасса наиболее быстро растущих культур корней удваивалась через 1–2 недели, а через 28 дней биомасса бородачатых корней была в 5 раз выше по сравнению с обычными корнями. Следовательно, получение биологически активных веществ из бородачатых корней *W. somnifera* оказалось эффективнее, чем из обычных растений.

Тем не менее трансформация различных частей этого растения при помощи *Agrobacterium rhizogenes*, вызывающих образование бородачатых корней, не всегда оказывалась одинаково успешна: при использовании штамма R1601 бородачатые корни удалось получить только из 3,33% семядольных эксплантов и 40,3% листовых

© 2017 г. Михайлова Е.В., Кулуев Б.Р., Ясыбаева Г.Р., Чемерис А.В.

* Автор для переписки:

Михайлова Елена Владимировна

старший лаборант Института биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук

E-mail: mikhele@list.ru

эксплантов. На листовых эксплантах корни появлялись через 2–4 дня, а на семядольных — через 32 дня после инокуляции. Стебли, корни, гипокотили и семядольные узлы *W. somnifera* некротизировались, не давая бородастых корней [9]. На гормональных средах при использовании штамма R1000 удавалось получать бородастые корни из 64% черешковых эксплантов, тогда как для междоузлий и листьев эффективность была ниже, 37,7 и 42,5% соответственно, а при использовании штамма 15834 — 29,7, 16,6 и 23,4% [13]. При использовании штамма R1000 наиболее высокая эффективность трансформации (93,3%) наблюдалась в течение трех недель после обработки эксплантов ультразвуком в течение 15 секунд и выдерживания в течение 5 минут при температуре 41 °С [14]. Таким образом, успешность получения бородастых корней зависит как от используемого для трансформации штамма агробактерий, так и от типа эксплантов.

Исходя из вышеуказанного, целью нашего исследования были определение эффективности трансформации *W. somnifera* двумя штаммами *A. rhizogenes* A4 и 15834 и оценка ростовых параметров бородастых корней, полученных при помощи этих штаммов агробактерий.

Материалы и методы

Семена *W. somnifera* перед посадкой скарифицировали при помощи наждачной бумаги, затем выдерживали в 500 мкг/л растворе гибберелловой кислоты в течение суток [7]. Семена стерилизовали в течение одной минуты в 70% этиловом спирте и в течение 8 минут в 15% белизне. Трансформацию семядольных эксплантов проводили через 75 дней после посева семян. Для трансформации использовали штаммы *A. rhizogenes* A4 и 15834, которые предварительно культивировались в жидкой среде LB с добавлением 100 мг/л рифампицина и 50 мг/л селективного антибиотика канамицина в течение суток. Затем культуры агробактерий центрифугировали при 4 тыс. об./мин в течение 10 минут при температуре 15–18 °С, и осадок растворяли в 20 мл жидкой среды MS с добавлением 100 мкМ ацетосирингона. Суспензию агробактерий культивировали на орбитальном шейкере в течение получаса, после чего проводили инокуляцию семядольных эксплантов.

Для получения эксплантов было использовано 10 семядолей проростков *W. somnifera*. Каждая семядоля была разрезана поперек на две части. Каждый из эксплантов по центральной жилке несколько раз укалывали иглой инсулинового шприца, обмакиваемой в инокулюм. Затем экспланты нижней стороной листа вверх погружали

в чашку Петри, содержащую 10 мл жидкой среды MS с добавлением 4 мл инокулюма. Чашки Петри с эксплантами аккуратно перемешивали в течение получаса, не допуская попадания агробактерий на нижнюю (находящуюся сверху) сторону листа. Затем экспланты подсушивали на фильтровальной бумаге и в течение двух суток сокультивировали с агробактериями на твердой среде MS, содержащей дополнительно 120 мг/л инозитола, 2 мг/л глицина, 1 мг/л тиамин и 1 мг/л никотиновой кислоты, без добавления антибиотиков; после этого экспланты пересаживали на среду, содержащую дополнительно 200 мг/л цефотаксима. После появления бородастых корней каждый корень (в среднем, длиной 1,5 см) пересаживался в отдельную чашку без содержания антибиотика. В течение трех недель измерялась длина корня. Чашки содержали при температуре 26 °С и освещенности 5 клк.

Наиболее активно растущие корни (в среднем, массой 50 мг) пересаживались на жидкую среду MS, также содержащую инозитол, глицин, тиамин и никотиновую кислоту в тех же концентрациях, а также 15 г/л либо 30 г/л сахарозы. 20 линий корней (по 10 на каждый штамм) дополнительно культивировались в колбах, содержащих 5 мл среды, на орбитальном шейкере при температуре 26 °С и скорости вращения 50 об/мин. В течение трех недель на 3-, 7-, 14- и 21-й день измерялась сырая масса корней, растущих на жидкой среде. Перед взвешиванием корни освобождали от среды при помощи фильтровальной бумаги. ДНК из корней выделяли методом солевой экстракции [1], затем проводили ПЦР-анализ на наличие последовательностей двух специфичных участков *rol-B* генов (5'-AGGTCTGGCTCCGGTGA-3', 5'-GTTCATTCACCTGCTGGAGT-3', а также 5'-GCGACAACGATTCAACCATATCG-3', 5'-TTTACTGCAGCAGGCTTCATGAC-3'). Статистическую обработку данных осуществляли в программе LibreOffice.

Результаты и обсуждение

Бородастые корни начинали появляться через 13 дней после инокуляции агробактериями. Эффективность трансформации составила 70% для штамма A4 и 60% для штамма 15834, причем во втором случае новые бородастые корни продолжали формироваться в течение как минимум пяти месяцев, тогда как при использовании штамма A4 новые корни продолжали образовываться только в течение первого месяца. На всех эксплантах со временем образовывались каллусы (рис. 1).

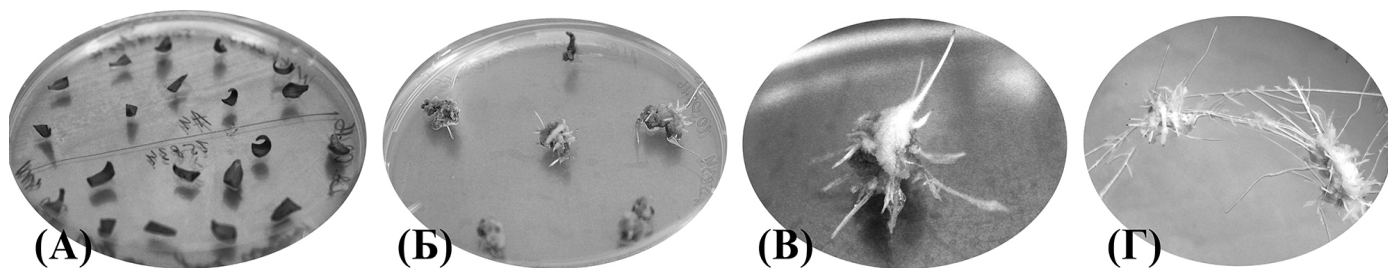


Рис. 1. Получение бородачатых корней *W. somnifera*: А — сокультивация семядольных эксплантов с агробактериями, Б — экспланты через месяц после трансформации, В, Г — экспланты через полтора месяца после трансформации

В различных работах нами были получены каллусы и корни различных морфотипов, что может быть связано с местом интеграции Т-ДНК в растительный геном и ее дальнейшей экспрессией [16]. Причиной образования каллуса может служить перенос TR-ДНК, которая стимулирует *aux* гены, а их повышенная экспрессия приводит к дополнительной выработке ауксинов и формированию каллуса в линиях трансформированных корней [6, 12, 13].

Можно выделить три основных морфотипа полученных в нашем эксперименте бородачатых корней. Первый морфотип, чаще встречающийся у линий, полученных при помощи штамма А4, характеризовался более толстыми и темными корнями с большим количеством коротких,

растущих вертикально вверх пушистых корешков, имеющих потемневший кончик и остановившихся в росте. На корнях, погруженных в среду, образовывались единичные каллусы (рис. 2А). Второй морфотип образовывался чаще на эксплантах, трансформированных штаммом 15834, и отличался от первого меньшей толщиной корней, отсутствием заметного потемнения кончиков корней, а также большим количеством мелких каллусов (рис. 2Б). Третий морфотип существенно отличался от первых двух и характеризовался наиболее разветвленными, тонкими и светлыми корнями без каллусов, а также длинными густо растущими вертикально вверх пушистыми корешками, не останавливающимися в развитии (рис. 2В).

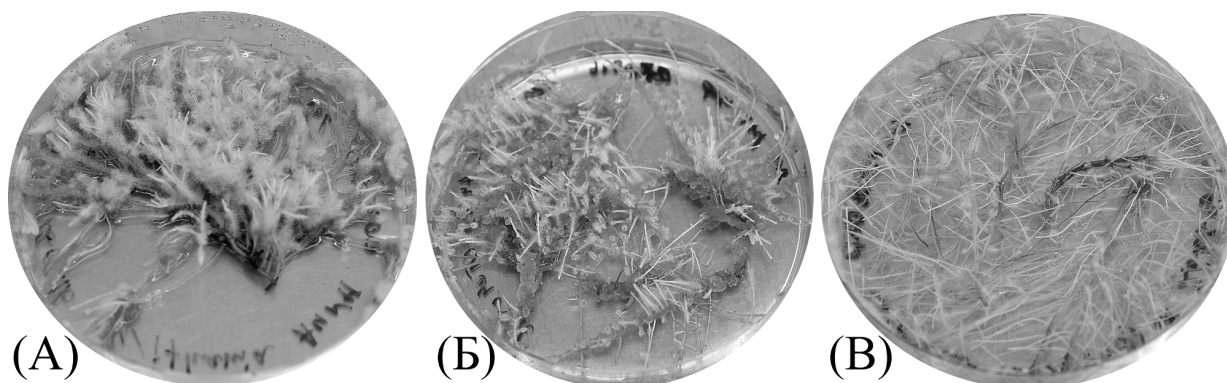


Рис. 2. Основные морфотипы бородачатых корней *W. somnifera*: А — морфотип 1, Б — морфотип 2, В — морфотип 3

С использованием штамма А4 было получено 23 линии бородачатых корней, с использованием штамма 15834 было получено 49 линий. На твердой среде средняя длина корня, полученного при помощи штамма А4, за три недели увеличивалась на $6,7 \pm 1,055$ см (в 6,2 раза). Средняя длина корня, полученного при помощи штамма 15834, за три недели увеличивалась на $7,1 \pm 0,94$ см (в 5,97 раз). Таким образом, статистически достоверных различий между двумя штаммами по данному параметру не наблюдалось (рис. 3).

Тем не менее в случае со штаммом 15834 у отдельных корней наблюдался более интенсивный рост (корень

линии № 33 за три недели удлинился в 11,5 раз, корни линий № 34 и № 48 — 9,6 раз, а корни линий № 1, № 32, № 42 — в 9 раз, тогда как корни, полученные при помощи штамма А4, удлинились не более чем в 8,58 раз (линия № 19).

Наиболее активно растущие корни в количестве около 50 мг были пересажены на жидкую среду МС. Поскольку корни разных морфотипов характеризовались разной толщиной, количеством образующихся каллусов и степенью разветвленности, зависимости между длиной бородачатого корня на твердой среде и биомассой корней на жидкой среде не наблюдалось.

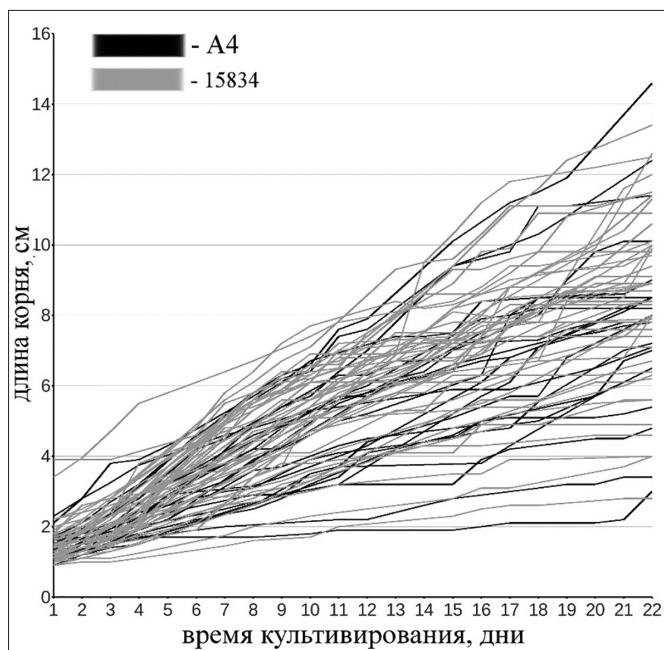


Рис. 3. Темпы роста в длину бородатых корней *W. somnifera* на твердой питательной среде

Заметное влияние на параметры роста бородатых корней может оказывать содержание в среде сахарозы. В других исследованиях наиболее быстрый рост бородатых корней *W. somnifera* наблюдался при 40 г/л концентрации сахарозы в среде, за 4 недели сухая масса корней при такой концентрации достигала 600 мг, тогда как при концентрации 10 г/л — всего 100 мг. При концентрации 30 г/л также наблюдался заметный рост массы (в 4 раза) по сравнению с корнями, растущими в среде с 10 г/л сахарозы [9]. В связи с этим опыт проводился с двумя вариациями состава обогащенной жидкой среды МС, содержащей 15 и 30 г/л сахарозы. Тем не менее в нашем исследовании удвоение содержания сахарозы в питательной среде не приводило к соответствующему увеличению биомассы корней. Для корней, полученных при помощи штамма А4, различия не были статистически достоверны, а корни, полученные при помощи штамма 15834, за две недели наращивали лишь на 50% больше сырой массы на среде, содержащей 30 г/л сахарозы.

На жидкой среде с содержанием 30 г/л сахарозы биомасса бородатых корней стабильно увеличивалась в течение первых двух недель (в среднем в 7,2 раза у корней, полученных при помощи штамма А4 и в 5,3 раза у корней, полученных при помощи штамма 15834). Лишь некоторые линии продолжали быстрый рост в течение третьей недели, тогда как биомасса корней других линий в этот период увеличивалась незначительно (в среднем на 12%), а по истечении трех недель рост прекращался (рис. 4).

Бородатые корни лишь одной из линий (А4 № 15) увеличили биомассу на 55% после этого рубежа, достигнув сырой массы в 1,88 г на 40-й день; при этом в конце периода наблюдалось потемнение корней и образование на них мелких каллусов (рис. 5). Для сравнения: линия 15834 № 28 достигла показателя 2,2 г всего за 20 дней.

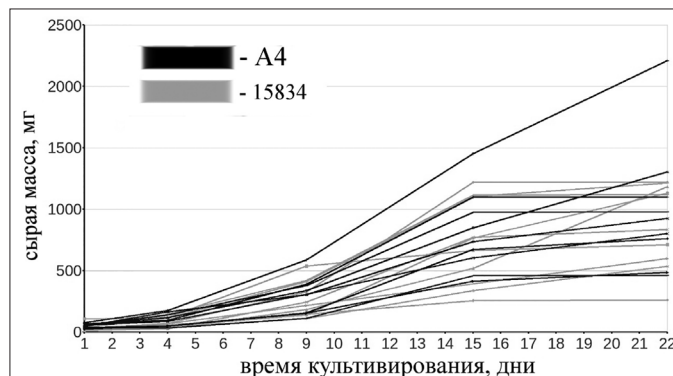


Рис. 4. Темпы роста биомассы бородатых корней *W. somnifera* на жидкой питательной среде МС, содержащей 30 г/л сахарозы

Заключение

Таким образом, без использования гормональных сред нам удалось трансформировать семядольные листья *W. somnifera* с эффективностью 70% при помощи *A. rhizogenes* штамма А4 и 60% — при помощи штамма 15834. Это оказалось эффективнее, чем в большинстве аналогичных исследований [9, 13], что может быть связано с использованием обогащенной среды МС, методологическими различиями в процессе трансформации и примененными в работе штаммами агробактерий.

Особого внимания заслуживает полученная нами линия корней А4 № 15, характеризовавшаяся наиболее быстрым и длительным ростом на жидкой питательной среде, а также линия 15834 № 28, характеризовавшаяся наиболее стремительным ростом. Однако для практического применения нашей разработки необходимо провести анализ содержания биологически активных веществ в полученных линиях корней в питательных средах различного состава, поскольку изменение концентрации других компонентов среды, помимо сахарозы, также может влиять на рост корней и продукцию вторичных метаболитов. Например, известно, что изменение содержания макроэлементов и источника азота в среде МС позволяет увеличить содержание витанолида А в бородатых корнях и увеличить их биомассу.

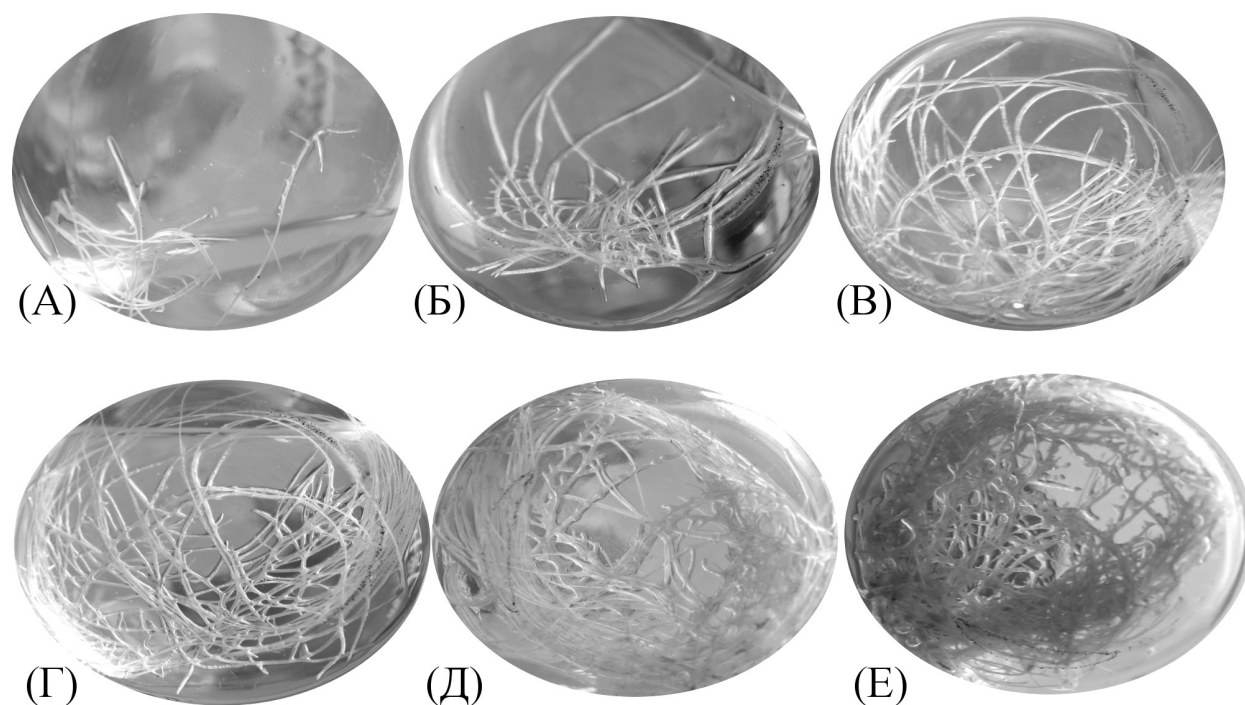


Рис. 5. Корни линии А4 № 15 на первый (А), третий (Б), седьмой (В), девятый (Г), шестнадцатый (Д) и сороковой (Е) дни культивации

Так, ускоренный рост биомассы наблюдался при удвоении концентрации KH_2PO_4 в среде, а также при содержании ионов NH_4^+ и NO_3^- в пропорции 14,38/37,6 мМоль, тогда как при удвоении концентрации KNO_3 и содержании ионов NH_4^+ и NO_3^- в пропорции 0/18,8 мМоль наблюдалось наиболее высокое содержание витанолида А в бородачатых корнях. Максимальный полученный выход витанолида А составил 15,27 мг/г сухого веса [10]. Следовательно, есть основания полагать, что полученные нами бородачатые корни *W. somnifera* после анализа содержания биологически активных веществ могут быть использованы для биотехнологического производства.

Литература

1. Aljanabi S.M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques // *Nucleic Acids Research*. – 1997. – Vol. 25. – P. 4692–4693.
2. Asthana R., Raina M.K. Pharmacology of *Withania somnifera* – a review // *Drugs*. – 1989. – Vol. 26. – P. 1–7.
3. Choudhary M.I., Yousuf S. Withanolides: Chemistry and Antitumor Activity // *Natural Products*. – Springer Berlin Heidelberg, 2013. – P. 3465–3495.
4. Ichikawa H., Takada Y., Shishodia S., Jayaprakasam B., Nair M.G., Aggarwal B.B. Withanolides potentiate apoptosis, inhibit invasion, and abolish osteoclastogenesis through suppression of nuclear factor- κB (NF- κB) activation and NF- κB -regulated gene expression // *Molecular Cancer Therapeutics*. – 2006. – Vol. 5(6). – P. 1434–1445.
5. Jayaprakasam B., Zhang Y., Seeram N.P., Nair M.G. Growth inhibition of human tumor cell lines by withanolides from *Withania somnifera* leaves // *Life Sciences*. – 2003. – Vol. 74(1). – P. 125–132.
6. Jung K.H., Kwak S.S., Choi C.Y., Liu J.R. An interchangeable system of hairy root and cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* for indole alkaloid production // *Plant Cell Reports*. – 1995. – Vol. 15(1–2). – P. 51–54.
7. Khanna P.K., Kumar A., Chandra R., Verma V. Germination behaviour of seeds of *Withania somnifera* (L.) Dunal: a high value medicinal plant // *Physiology and Molecular Biology of Plants*. – 2013. – Vol. 19(3). – P. 449–454.
8. Mirjalili M.H., Moyano E., Bonfill M., Cusido R.M., Palazon J. Steroidal lactones from *Withania somnifera*, an ancient plant for novel medicine // *Molecules*. – 2009. – Vol. 14(7). – P. 2373–2393.
9. Murthy H.N., Dijkstra C., Anthony P., White D.A., Davey M.R., Power J.B., Paek K.Y. Establishment of *Withania somnifera* hairy root cultures for the production of withanolide A // *Journal of Integrative Plant Biology*. – 2008. – Vol. 50(8). – P. 975–981.
10. Praveen N., Murthy H.N. Withanolide A production from *Withania somnifera* hairy root cultures with improved growth by altering the concentrations of macro elements and nitrogen source in the medium // *Acta physiologiae plantarum*. – 2013. – Vol. 35(3). – P. 811–816.

11. Ray A.B., Gupta M. Withasteroids, a growing group of naturally occurring steroidal lactones // Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. — Springer Vienna, 1994. — P. 1–106.
12. Robins R.J., Bent E.G., Rhodes M.J.C. Studies on the biosynthesis of tropane alkaloids by *Datura stramonium* L. transformed root cultures: 3. The relationship between morphological integrity and alkaloid biosynthesis // Planta. — 1991. — Vol. 185(3). — P. 385–390.
13. Saravanakumar A., Aslam A., Shajahan A. Development and optimization of hairy root culture systems in *Withania somnifera* (L.) Dunal for withaferin-A production // African Journal of Biotechnology. — 2012. — Vol. 11(98). — P. 16412–16420.
14. Thilip C., Raju C.S., Varutharaju K., Aslam A., Shajahan A. Improved *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root culture system of *Withania somnifera* (L.) Dunal using sonication and heat treatment // 3 Biotech. — 2015. — Vol. 5(6). — P. 949–956.
15. Tohda C., Kuboyama T., Komatsu K. Search for natural products related to regeneration of the neuronal network // Neurosignals. — 2005. — Vol. 14(1-2) — P. 34–45.
16. Zhu L.H., Holefors A., Ahlman A., Xue Z.T., Welander M. Transformation of the apple rootstock M. 9/29 with the rolB gene and its influence on rooting and growth // Plant Science. — 2001. — Vol. 160(3). — P. 433–439.

CREATION OF *WITHANIA SOMNIFERA* HAIRY ROOT CULTURES AND ESTIMATION OF THEIR GROWTH PARAMETERS ON SOLID AND LIQUID MEDIUM

E.V. MIKHAYLOVA, B.R. KULUEV, G.R. YASYBAEVA, A.V. CHEMERIS

Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Sci. Center of RAS, Ufa, Russian Federation

Withania somnifera is a valuable medical plant, growing in India. Its bioactive agents can be produced in hairy roots regardless of the climate. *W. somnifera* cotyledons transformation efficiency was 70% with the use of *A. rhizogenes* strain A4 and 60% with strain 15834. With the use of strain A4, 23 lines of shaggy roots were obtained, the length of which on a solid medium increased by an average of 6.2 times in three weeks, and the weight of the wet mass on a liquid medium was 7.2 times in two weeks. With the use of strain 15834, 49 lines of hairy roots were obtained, their length increased by an average of 5.97 times, and weight — 5.3 times. Individual root lines showed more intensive growth and are of interest for biotechnology production.

Keywords: *Withania somnifera*, winter cherry, ashwagandha, *Agrobacterium rhizogenes*, hairy roots, genetically transformed roots, growth rate.

ОСОБЕННОСТИ РОСТА КУЛЬТУР ГЕНЕТИЧЕСКИ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ (БОРОДАТЫХ) КОРНЕЙ ТАБАКА И ВИТАНИИ ПРИ ИЗМЕНЕНИИ ОБЪЕМА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ

Х.Г. МУСИН^{1*}, А.Б. ЯКУПОВА¹, Е.В. МИХАЙЛОВА², Б.Р. КУЛУЕВ^{1,2}

¹ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет»,

²ФГБУН «Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук», Уфа

Генетически трансформированные (бородатые) корни растений являются перспективной системой в биотехнологии для продуцирования первичных и вторичных метаболитов как растительного, так и нерастительного происхождения. В лабораторных условиях бородатые корни выращивают в колбах с жидкой питательной средой на орбитальных шейкерах. Для промышленного выращивания бородатых корней разрабатываются различные биореакторы, однако многие из них сложно устроены и довольно трудно воспроизводимы. Поэтому остается актуальной возможность использования колб и орбитальных шейкеров для выращивания бородатых корней в промышленных масштабах. В связи с этим целью настоящего исследования стало определение биомассы бородатых корней при выращивании их в колбах и питательных средах разного объема. На культурах бородатых корней табака (*Nicotiana tabacum* L.) и витании (*Withania somnifera* L.) было показано, что с увеличением объема колбы и питательной среды скорость роста корней также увеличивается. Полученные данные указывают на перспективность выращивания культур бородатых корней в больших колбах не только для научных целей, но и для промышленного производства.

Ключевые слова: *Nicotiana tabacum*, *Withania somnifera*, бородатые корни, генетически трансформированные корни, *Agrobacterium rhizogenes*, скорость роста.

Введение

Многие современные лекарственные препараты имеют растительное происхождение, часть из которых извлекается из подземных частей различных лекарственных растений. При этом довольно часто содержание действующих веществ в таких растениях относительно невелико. Более того, некоторые лекарственные растения занесены в Красные книги разных уровней и/или встречаются на ограниченной территории, что затрудняет, либо даже исключает заготовку из них в массовых количествах ценного лекарственного сырья. В этой связи удобную альтернативу растениям, произрастающим как в дикой природе, так и на возделываемых площадях может составить биотехнологическое выращивание культур бородатых (или «косматых») корней этих растений, которые способны к неограниченному росту на безгормональных питательных средах [1].

Генетически трансформированные (бородатые) корни получают при помощи бактерий семейства *Rhizobiaceae Agrobacterium rhizogenes*. В природе данные бактерии, попадая в поврежденные части растений, взаимодействуют с клетками растений и интегрируют в ядерный геном Т-ДНК своей мегаплазмиды, известной под названием Ri-плазида (root-inducing). Благодаря своим биологическим особенностям *A. rhizogenes* широко применяется в генной инженерии растений, прежде всего для получения культур бородатых корней. Это связано с тем, что корни сохраняют в условиях *in vitro* генетическую стабильность и довольно часто способность к синтезу корнеспецифичных для данного растения вторичных метаболитов, что кардинально отличает их от культур недифференцированно растущих клеток и тканей [1].

В биотехнологии растений применяют три основных способа выращивания бородатых корней: в чашках Петри на твердых питательных средах, в колбах в жидкой среде и специально сконструированных для выращивания корневых культур биореакторах. Наиболее быстрого роста бородатых корней, а значит и наибольшей их продуктивности можно добиться, выращивая их в специальных биореакторах с хорошей аэрацией и аэрозольной подачей питательной среды, однако не все трудности при их конструировании на сегодняшний день преодолены

© 2017 г. Мусин Х.Г., Якупова А.Б., Михайлова Е.В., Кулуев Б.Р.

* Автор для переписки:

Мусин Халил Галеевич

аспирант

ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет»

E-mail: lu2666@yandex.ru

[5]. Медленнее всего бородатые корни растут на твердых питательных средах. Поэтому выращивание культур бородатых корней в колбах с жидкой средой продолжает оставаться перспективным, в том числе для их промышленного культивирования. Однако на сегодняшний день остается неясным, как будут меняться параметры роста бородатых корней при увеличении объема колб и питательной среды, то есть при масштабировании.

В связи с этим целью данного исследования стало определение параметров роста бородатых корней при выращивании их в колбах и питательных средах разного объема. В качестве объектов исследования были выбраны модельная система бородатых корней табака, а также генетически трансформированные корни витании *Withania somnifera* L. Известно, что в корнях *N. tabacum* содержится токсичное вещество никотин и ценный алкалоид анатабин. Однако ценность для биотехнологических исследований представляет другое свойство этого растения. Оно достаточно легко трансформируется агробактериями и потому часто используется в качестве модельного объекта [4]. *W. somnifera* (Ашваганда) — это ценное лекарственное растение, используемое как в традиционной медицине, так и в качестве биологически активной добавки. В его состав входят более 12 различных алкалоидов, флавоногликозиды, лигнаны, стероидные лактоны группы витанолидов [9]. Эти вещества выделяют из корней *W. somnifera* и применяют в лечении туберкулеза, ревматизма, рака, воспалительных заболеваний, заболеваний сердечно-сосудистой системы, а также в качестве общеукрепляющего средства [3].

Материалы и методы

Линии бородатых корней *W. somnifera* были получены ранее путем трансформации семядольных эксплантов, используя штаммы A4 и 15834 *A. rhizogenes* [2]. Для получения трансформированных корней табака использовали здоровые, молодые листья 4-месячных растений, стерилизованные с использованием 70% этилового спирта и 10% раствора гипохлорита натрия. Полученные стерильные листовые диски заражались штаммом A4 *A. rhizogenes*, выращенных предварительно на жидкой среде LB с добавлением 100 мг/л рифампицина. Совместное культивирование листовых эксплантов и агробактерий проводилось на твердой среде Мурасиге — Скуга (МС) [6] в течение 3 суток при температуре +26 °С, после чего растительные экспланты были перенесены на твердую среду МС (соли МС, сахароза — 30 г/л, 120 мг/л инозитола, 2 мг/л глицина, 1 мг/л тиамин и 1 мг/л никотиновой

кислоты, 350 мг/л антибиотика аугментина). После полного избавления от агробактерий экспланты переносили на полутвердую среду МС, не содержащую антибиотики, где они культивировались в течение месяца. Бородатые корни начинали появляться через неделю. Все образованные на эксплантах бородатые корни растений фрагментами длиной по 1,5–2 см переносились в отдельные колбы с жидкой средой МС и использовались как отдельные линии генетически трансформированных корней.

Дальнейшие исследования проводились с использованием полученных линий растений на жидкой среде МС. Двухнедельные культуры корней переносились в колбы объемами 100, 250, 500, 2000 мл, где объем питательной среды составлял 10% от указанных объемов колб, и культивировались на орбитальном шейкере (100 об/мин) при комнатной температуре (22–24 °С). Длительность культивирования составила 6 недель. Первоначальный вес корней составил порядка 30±0,4 мг. Независимо от объема колб среды обновлялись каждые 3 дня. В конце каждой недели осуществлялось измерение массы корней. Статистическая обработка проводилась в программе Microsoft Excel 2003. В целом было исследовано по 4 линии генетически трансформированных корней табака и витании.

Результаты и обсуждение

Бородатые корни табака начинали появляться на 7-й день после инокуляции. Эффективность трансформации для штамма агробактерий A4 составила 77%. Многие листовые пластинки с течением времени приобретали коричневый оттенок и образовывали каллус. Разные линии корней характеризовались различной толщиной корня, характером ветвления и интенсивностью образования каллуса. Можно предполагать, что каллусные наросты образуются в результате деятельности встроенных агробактерией Rol-генов, так как это способствует изменению содержания и активности фитогормонов в растениях [8].

После переноса культуры корней в колбы они интенсивно росли в длину и довольно быстро охватывали весь объем раствора. После заполнения всего пространства бородатые корни начинали усиленно ветвиться и разрастаться, появлялись каллусные наросты. Когда весь объем колбы заполнялся и возможность для дальнейшего разветвления корней отсутствовала, начиналось развитие каллуса.

Как показано на рисунке 1, в первые три недели масса корней росла по экспоненте. По истечении четвер-

той недели начинали интенсивно расти боковые корни. При этом наблюдалась закономерность: чем меньше объем питательной среды, тем быстрее останавливался рост боковых корней, поскольку объем колбы заполнялся быстрее. После того как уже все пространство было заполнено, корни начинали расти в толщину; при этом часто укрупнялись каллусные наросты. В колбах с большим объемом, даже в конце шестой недели каллусные образования были достаточно мелкими. Подобная закономерность наблюдалась у всех линий бородачатых корней (рис. 2).

Сравнивая результаты нескольких линий бородачатых корней *N. tabacum*, можно прийти к выводу, что наиболее быстро растущей линией является N.T.A4 (4) (рис. 3). Отметим, что линия N.T.A4 (1) в колбах с большим объемом образовывала массивные каллусы, после достижения шестой недели из них появлялись зеленые побеги. Имеются сведения, что после двухмесячного культивирования без пересадки корни с небольшим объемом колб начинали терять в массе, даже при том, что питательные среды постоянно обновлялись [10].

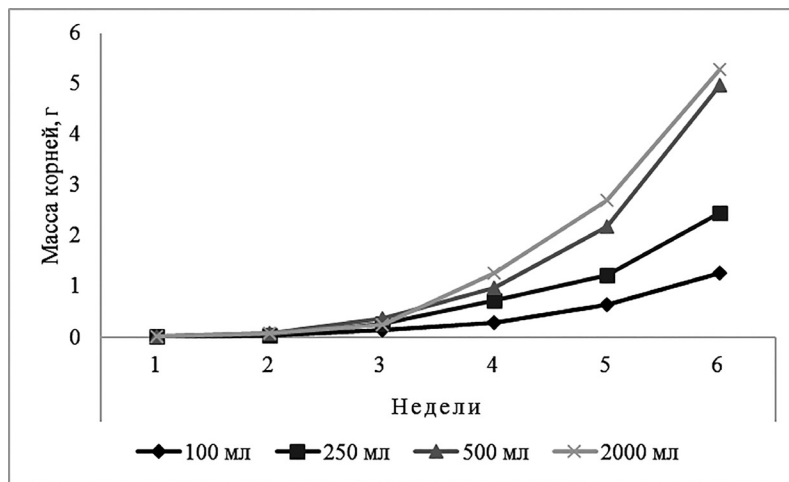


Рис.1. Динамика роста массы культуры бородачатых корней табака линии N.T.A4(2) в зависимости от объема колб и питательной среды

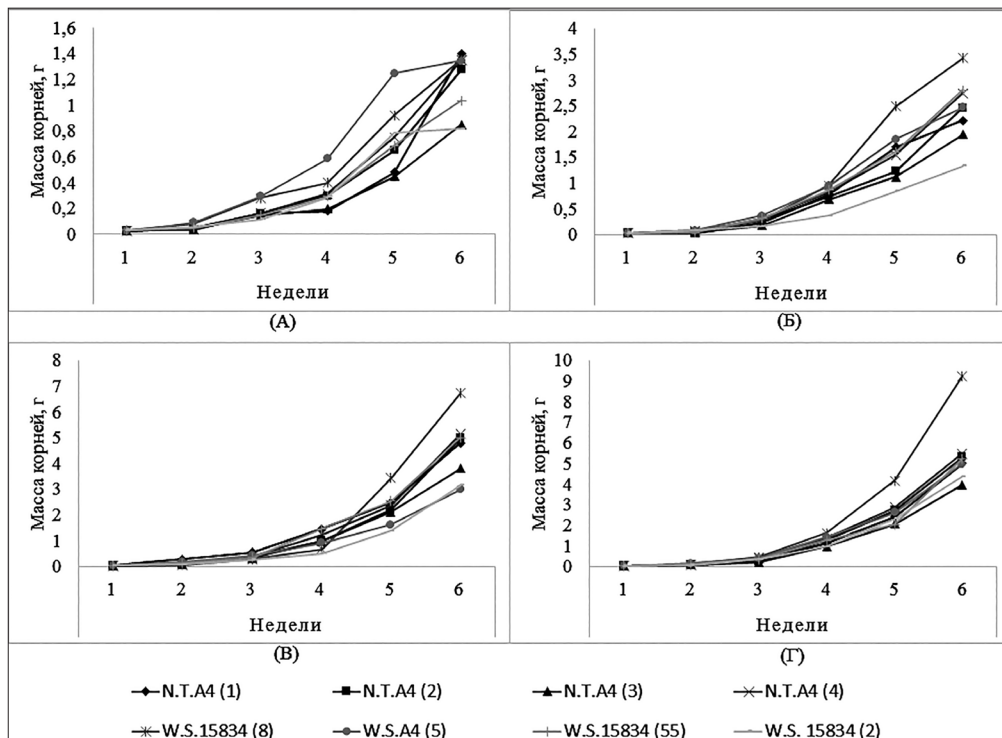


Рис. 2. Сравнительный анализ динамик роста массы культуры бородачатых корней в колбах объемами 100 мл (А), 250 мл (Б), 500 мл (В), 2000 мл (Г)

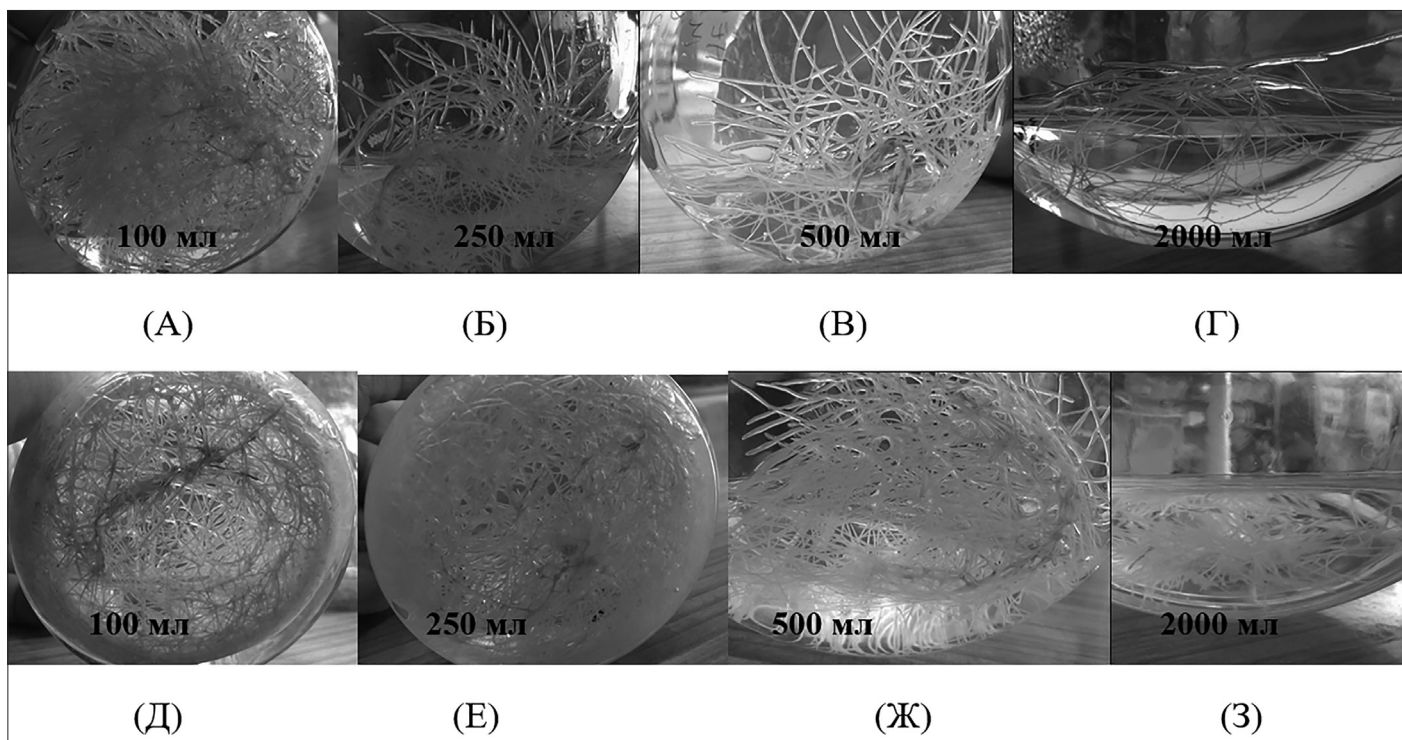


Рис. 3. Четырехнедельные корни табака линии N.T.A4 (4) (А, Б, В, Г) и витании линии W.S.15834 (55) (Д, Е, Ж, З) в колбах разного объема и с разным количеством питательной среды

При сравнении интенсивности роста культуры корней *W. somnifera* и *N. tabacum* выявлено, что корни витании быстрее набирают массу, чем корни табака. К примеру, в колбе объемом 2000 мл линия корней W.S.15834 (55) за шесть недель увеличила массу в 280 раз, тогда как наиболее быстрорастущая линия бородатых корней табака N.T.A4 (4) увеличилась лишь в 189 раз. Существенных различий между линиями бородатых корней витании, трансформированными с помощью различных штаммов *A. rhizogenes*, мы не наблюдали.

Бородатые корни линии W.S.15834 (2) быстро теряли способность к росту и рано образовывали каллус. В колбе объемом 100 мл при достижении 5-недельного возраста они бурели, а их масса увеличивалась лишь за счет роста каллусных клеток. Аналогичный результат получили Михайлова Е.В. с соавт. (2017) [2]. Murthy H.N. (2008) и его коллеги [7] приводят примерно те же результаты, утверждая, что оптимальный период роста трансформированных корней *W. somnifera* в 100 мл колбе ограничивается 28 днями. Для трансформации ростков витании они использовали агробактерии *A. rhizogenes* штамма R1601. Другие же линии, например, W.S.15834 (55) продолжали активно образовывать корни даже после шестой недели культивирования.

Заключение

Таким образом, бородатые корни растений в колбах с жидкой средой растут в геометрической прогрессии, и параметры их роста сильно зависят от объема колбы и питательной среды. При этом бородатые корни растут тем быстрее, чем больше объем колбы и питательной среды. Это означает, что масштабирование лабораторных способов культивирования бородатых корней может идти по довольно простому алгоритму, а именно: увеличению объема колбы и питательной среды; причем это будет способствовать существенному увеличению их продуктивности. Исходя из полученных нами результатов исследования, можно предполагать, что выращивание культур бородатых корней в больших колбах на орбитальных шейкерах перспективно не только для научных целей, но и для промышленного производства.

Литература

1. Кулуев Б.Р., Вершинина Э.Р., Князев А.В., Чемерис Д.А., Баймиев Ан.Х., Чумаков М.И., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. «Косматые» корни растений – важный инструментальный для исследователей и мощная фитохимбиофабрика для производителей // Биомика. – 2015. – № 2. – С. 70–120.

2. Михайлова Е.В., Кулуев Б.Р., Ясыбаева Г.Р., Чемерис А.В. Создание культур бородатых корней *Withania somnifera* и оценка параметров их роста при выращивании на твердых и жидких питательных средах // Вестник физико-химической биологии и биотехнологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2017. — Т. 13. — № 2. — С. 40–45.
3. Asthana R., Raina M.K. Pharmacology of *Withania somnifera* — a review // *Drugs*. — 1989. — Vol. 26. — P. 1–7.
4. Häkkinen S.T., Moyano E., Cusidó R.M., Palazón J., Piñol M.T., Oksman-Caldentey K.M. Enhanced secretion of tropane alkaloids in *Nicotiana tabacum* hairy roots expressing heterologous hyoscyamine-6beta-hydroxylase // *Journal of Experimental Botany*. — 2005. — Vol. 56(420) — P. 2611–2619.
5. Mishira B.N., Ranjan R. Growth of hairy-root cultures in various bioreactors for the production of secondary metabolites // *Biotechnology Application Biochemistry*. — 2008. — Vol. 49(Pt. 1). — P. 1–10.
6. Murashige T. and Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. // *Physiologia Plantarum*. — 1962. — N 15. — P. 473–497.
7. Murthy H.N., Dijkstra C., Anthony P., White D.A., Davey M.R., Power J.B., Paek K.Y. Establishment of *Withania somnifera* hairy root cultures for the production of withanolide A // *Journal of Integrative Plant Biology*. — 2008. — Vol. 50(8). — P. 975–981.
8. Nemoto K., Hara M., Suzuki M., Seki H., Oka A., Muranaka T., Mano Y. Function of the *aux* and *rol* genes of the Ri plasmid in plant cell division in vitro // *Plant Signaling & Behavior*. — 2009. — Vol. 4(12) — P. 1145–1452.
9. Ray A.B., Gupta M. Withasteroids, a growing group of naturally occurring steroidal lactones // *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. — Springer Vienna, 1994. — P. 1–106.
10. Zayed R. and Wink M. Induction of pyridine alkaloid formation in transformed root cultures of *Nicotiana tabacum* // *Zeitschrift für Naturforschung C*. — 2009. — Vol. 64(11–12). — P. 869–943.

GROWTH CHARACTERISTICS OF TABACCO AND *WITHANIA SOMNIFERA* HAIRY ROOT CULTURES IN DIFFERENT VOLUME OF FLASKS AND NUTRIENT MEDIA

Kh.G. MUSIN¹, A.B. YAKUPOVA¹, E.V. MIKHAYLOVA², B.R. KULUEV^{1,2}

¹*Bashkir State University,*

²*Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Scientific Center,
Russian Academy of Sciences, Ufa, Russian Federation*

Hairy roots of plant are a promising system in biotechnology for the production of primary and secondary metabolites. In the laboratory, hairy roots are grown in flasks with a liquid nutrient medium on orbital shakers. For the industrial cultivation of hairy roots, various bioreactors are being developed, but many of them are complex and difficult to reproduce. Therefore, it remains relevant to use flasks and orbital shakers for growing hairy roots on an industrial scale. In this regard, the purpose of this study was to determine the biomass of hairy roots when growing them in flasks and nutrient media of different volumes. On hairy root cultures of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) and ashwagandha (*Withania somnifera* L.) it was shown that with the increase in the volume of the flask and nutrient medium, the growth rate of the roots also increases. The received data indicate the prospects of growing hairy root cultures in large flasks not only for scientific purposes, but also for industrial production.

Keywords: *Nicotiana tabacum*, *Withania somnifera*, hairy roots, genetically transformed roots, *Agrobacterium rhizogenes*, growth rate.

К 100-ЛЕТИЮ ВЫХОДА В СВЕТ ОСНОВОПОЛАГАЮЩЕЙ РАБОТЫ Ф. д'ЭРЕЛЛЯ О БАКТЕРИОФАГИИ

В.С. ВОРОБЬЕВ*, О.В. ВОРОБЬЕВА

Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова, Москва

По случаю 100-летия открытия Ф. д'Эреллем феномена бактериофагии проведен исторический анализ его жизни и творчества. Особое внимание уделено проблеме приоритета открытия бактериофагии и возникшей в связи с этим многолетней дискуссии между Ф. д'Эреллем и Ф. Туортом и их сторонниками и противниками. Рассмотрен также вопрос о непосредственном влиянии Ф. д'Эрелля на развитие исследований бактериофагии в СССР и России.

Ключевые слова: бактериофагия, история открытия, история микробиологии, Ф. д'Эрель.



Введение. В 2017 году исполняется 100 лет со времени публикации работы Феликса д'Эрелля «О невидимом микробе антагонисте дизентерийной бациллы» [58]. Тогда шла Первая мировая война, человечество вступило в период социальных катастроф, были нарушены нормальные международные

научные связи. Поэтому немедленной адекватной реакции научного сообщества на выход в свет статьи малоизвестного автора не было (несколько позже, правда, возник бум). Между тем в ретроспекции ее содержание стало определенной вехой в развитии микробиологии в целом, сравнимой по значимости разве что с открытиями Дженнером оспопрививания, Пастером – прививок против бешенства, Мечниковым – фагоцитоза. В известной мере открытие д'Эрелля вписывалось в контекст сохранения биоценозов, экологического равновесия, межвидовых отношений, борьбы за существование и естественного отбора по Дарвину и т.д. (ведь феномен бактериофагии возрастал в среде с гниением, в сточных водах или в гнойных ранах, где усиленно размножались микробы – объект антагонизма бактериофагов). Возможно, это обстоятельство не давало покоя оппонентам д'Эрелля, особенно среди крупных ученых, которые не могли понять, как столь великое открытие досталось неподготовленному дилетанту в бактериологии (не исключены и нередкие в научном мире зависть и соперничество). К тому же технический уровень развития науки тогда не позволял точно и однозначно идентифицировать причинный фактор. Важно для русскоязычного читателя и то, что два из четырех указанных выдающихся взлетов человеческого разума (фагоцитоз и бактериофагия) находились в российском цивилизационном пространстве (см. далее). Уместно здесь еще добавить, что именно эти два направления, где, помимо деталей, превалирует более общая идея межвидового и внутривидового взаимодействия, в том числе своеобразного клеточного (или паразитического) «поедания» («лизиса»), вызвали наиболее

© 2017 г. Воробьев В.С., Воробьева О.В.

* **Автор для переписки:**

Воробьев Вадим Сергеевич

к.м.н., член Центрального Правления Общества биотехнологов

России им. Ю.А. Овчинникова

E-mail: obr@biorosinfo.ru

острую научную и общественную дискуссию, включая длительное непризнание большинством ученых.

В своей статье 1917 года Ф. д'Эррель сообщал, что он наблюдал при бациллярной дизентерии перед выздоровлением появление в кишечнике некоего «агента», способного лизировать палочки возбудителя. Он назвал его «бактериофагом» — «пожирателем бактерий» [58]. Им было также сообщено о других базовых характеристиках, которые определили направление будущих исследований по данному вопросу, включая лечение инфекционных болезней и научно-методологическую разработку проблем общей бактериологии. Существенно также то, что статью в «Докладах Парижской академии наук» представил Эмиль Ру — директор Института Пастера. Это способствовало повышенному вниманию к указанным фактам в профессиональной среде как в то время, так и в последующем.

Curriculum vitae. Феликс д'Эррель является канадцем французского происхождения. Он родился 25 апреля 1873 года.

Биография д'Эрреля полна необычных приключений, она воспринимается как увлекательный роман [12, 49]. Не зря она послужила писателю Синклеру Льюису материалом для написания книги «Эроусмит» (1925) [24, 80], которая вышла в свет при участии Поля де Крюи, автора популярного произведения «Охотники за микробами». Особенно стойким было увлечение путешествиями: в 16 лет он объездил пол-Европы, в 17 лет — путешествовал по Южной Америке. Во время одного из путешествий в 1893 году по Турции он женился на Мари-Адель де Кэр (дочери французского посла в Стамбуле).

Среднее образование он получил в 1887–1890 гг. в знаменитых учебных заведениях Парижа — лицеях Кондорсе и Людовика Великого, правда, не закончив полного курса средней школы. Высшего образования он также не получил, занимаясь самообразованием (хотя сообщается, что он слушал лекции в Бонне несколько месяцев в 1891 году). Поэтому зарубежные биографы часто употребляют термин «autodidact», «self-taught» («самоучка»).

В 1893 году д'Эррель вместе со своим братом Даниэлем поступил волонтером в армию. Однако он дезертировал по неизвестным причинам и с 1894 г. находился, вероятно, в Бельгии. В это время он также путешествовал по Турции и Греции.

Когда ему исполнилось 24 года, он с семьей эмигрировал в Канаду (Квебек). Здесь он сумел получить государственный заказ на изучение процесса производства крепкого алкогольного напитка из кленового сиропа.

В 1899 году принял участие в геологической экспедиции по разведке золота на полуострове Лабрадор, где выполнял миссию медработника, не имея соответствующей подготовки. В Канаде он, представившись как химик, напечатал весьма незрелую статью об обмене углерода в растениях (D'Herelle F. De la formation du carbone par les végétaux // *Le Naturaliste canadien*, 1901) (см. Библиографию № 1). Вместе с братом они создали и управляли шоколадной фабрикой до 1901 года, пока предприятие не обанкротилось.

Затем д'Эррель переместился в Гватемалу, по контракту подрядившись работать в столичном госпитале бактериологом (к тому времени он был уже отцом двух дочерей). В его обязанности входило лечение больных малярией и желтой лихорадкой. Параллельно он занимался разработкой процесса производства виски из бананов. В Гватемале он находился до 1906 года.

Приобретая опыт в алкогольном деле, д'Эррель в 1907 году принял предложение правительства Мексики заняться технологией получения шнапса из сока агавы. С этим он справился и для налаживания массового производства алкоголя отправился в Париж за необходимым оборудованием. Здесь в свободное время он начал трудиться как бесплатный помощник в Институте Пастера.

По возвращении в Мексику он утратил интерес к работе на спиртовом заводе. Его увлекла микробиологическая проблема: массовая гибель саранчи (*Schistocerca pallens*) от диареи, которую он наблюдал на плантациях агавы на полуострове Юкатан. Имея начальный опыт микробиологических исследований, он обнаружил в чашках Петри с посевами микроорганизмов, вызывающих смертельную болезнь саранчи (ими оказались коккобактерии), небольшие аномальные, прозрачные участки, которые при окрашивании были лишены бактерий. Свершилось это в 1910 году, за 7 лет до открытия д'Эррелем феномена бактериофагии у больных дизентерией. Тогда исследователь впервые высказал идею биологического способа борьбы с сельскохозяйственными вредителями.

Таким образом, пребывание в Новом Свете будущего первооткрывателя бактериофагии не прошло бесследно для его формирования как микробиолога. Исторически сложилось так, что ему, человеку без университетского образования, технологу по производству спирта было суждено выйти на решение сверхсложной биологической проблемы — межвидовой борьбы на уровне микроорганизмов, причем без непосредственной визуализации одного из агентов такого взаимодействия. Его пылкий ум, сработав в практическом смысле, вышел на опережающее решение преемственной те-

оретической, общебиологической задачи. Интересно отметить, что так же действовал гений Пастера в 1885 году при работе с вирусом — возбудителем бешенства, не открытым к тому времени (именно это ставил ему в вину его оппонент Кох).

В 1911 году д'Эрелль с семьей вернулся в Париж и приступил к исследованиям в Институте Пастера. Здесь он проработал 10 лет ассистентом (внештатным сотрудником — «*untenured laboratory worker*» или волонтером без оплаты — «*unpaid volunteer*», англ.) в лабораториях, сотрудничая с А. Salimbeni, С. Delzenne, Е. Rozerski, Г.Г. Элиавой. В частности, он занимался разработкой вакцины с помощью модельной системы — *Bacillus typhi murium* (палочки мышинного тифа) на ее природном хозяине — домашней мыши (это была его всегдашняя убежденность в справедливости такого подхода в противоположность чисто лабораторной методологии). В 1914 году в начале Первой мировой войны он был привлечен к работам по производству сывороток. В институте вместе с ним трудились его жена, старшая дочь Марселла, младшая дочь Хьюберта. Их семья во время Первой мировой войны произвела для военных нужд более 12 миллионов доз бактериальных препаратов. Одновременно он работал по личному плану. По совету директора Пастеровского института Э. Ру в августе 1915 года д'Эрелль начал обследовать дизентерийных больных из кавалерийского эскадрона, расквартированного в пригороде Парижа Maisons-Laffite (см. Библиографию № 75). Полученные по последней теме результаты были напечатаны в 1917 году в *Comptes rendues de l'Académie des Sciences (Paris)* (рис. 1) [58]. Статья была первопродческой, излагала суть явления бактериофагии, отличалась ясностью, однозначностью и воспроизводимостью открытых фактов и удачной семантикой: термин «бактериофаг» сразу прижился. Уже через два года в детском госпитале Парижа д'Эрелль вместе с профессором В.-А. Гутинелем провели первый эксперимент по лечению дизентерии с помощью бактериофага (фаготерапии). В 1921 году вышла его основополагающая книга «Бактериофаг: его роль в иммунитете» на французском языке (рис. 2), а в следующем году — на английском и немецком языках.

После публикации 1917 года, а особенно после выхода книги 1921 года имя и дела Ф. д'Эрелля стали широко известны. Но исследователь был неутомим. Он активно участвовал в многочисленных экспедициях, организованных Институтом Пастера: в Аргентине, Алжире, Турции, Тунисе, Мексике. Кроме того, он продолжал путешествовать с научной целью за свой счет.

В 1921 году д'Эрелль покинул Институт Пастера. Причину ухода биографы обычно не называют. Возможно, сыграли роль натянутые отношения с вице-директором Альбером Кальметтом. Есть информация о том, что у д'Эрелля не сложились контакты также с другими сотрудниками института (за редкими исключениями) [77]. Был общеизвестен и его принципиальный спор по теории бактериофагии со сверхавторитетом того времени Жюлем Борде, получившим Нобелевскую премию по медицине 1919 года. Как говорили в научных кругах, д'Эрелль обладал талантом наживать врагов среди крупных фигур.

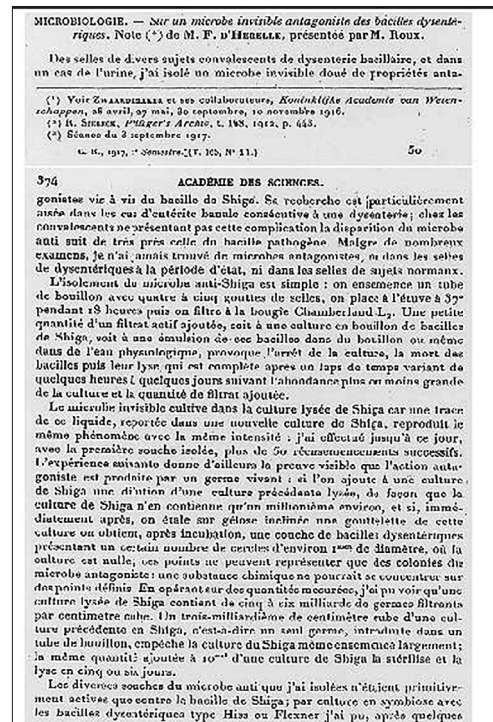


Рис. 1. Копия начала исторической публикации Ф. д'Эрелля 1917 года [73]

Он в 1920-е годы боролся с чумой и холерой в Индокитае. С 1921 по 1924 гг. являлся куратором Института тропической медицины в Лейдене (Нидерланды).

В 1925—1926 гг. он был директором бактериологической лаборатории при Санитарном, морском и карантинном совете Египта в Александрии. Ему приходилось заниматься борьбой с инфекциями на морских судах, следующих по Суэцкому каналу, выявлением их у паломников в Мекку. В 1927 году д'Эрелль работал в Медицинской службе Индии с целью профилактики холеры с помощью фаготерапии.

С 1928 по 1934 годы он состоял приглашенным профессором бактериологии в Йельском университете (США). В течение данного периода он принимал уча-

стие в конференциях в Монреале, Париже, Балтиморе, Риме, Марселе, Анн Арборе. В это время в Париже функционировала частная лаборатория по производству бактериофагов, организованная д'Эреллем (под руководством его зятя). В 1933 году он вернулся в нее. Это было вызвано необходимостью контроля стандартизации препаратов для фаготерапии в связи с многочисленными нарушениями их производства в различных фирмах.



Рис. 2. Титульный лист основополагающей книги д'Эрелля «Бактериофаг: его роль в иммунитете» (1921)

В 1934–1935 гг. по приглашению Советского Правительства он организовал в Тифлисе, Киеве, Харькове исследования бактериофагов.

В 1936 году д'Эрелль создал в Париже лабораторию по производству бактериофагов и стал ее научным директором.

Во время Второй мировой войны он с семьей находился под подпиской о невыезде (был интернирован властями как канадский гражданин). Это время он потратил на написание книги «Ценность эксперимента» и автобиографических записок (см. Библиографию № 71, 72). После освобождения Франции в 1944 г. прожил еще пять лет и умер практически в полном забвении.

Вклад в науку. Ключевым пиком научных достижений Ф. д'Эрелля является, как уже говорилось, публикация 1917 года (см. Библиографию № 8, 76).

В дальнейшем свои главные идеи он изложил в вышеупомянутом капитальном труде «Бактериофаг: его роль в иммунитете» (1921), в котором он сделал обобщение своей собственной работы на тот момент [53]. Высоко ценил сам автор и свою книгу 1926 года «Le bactériophage et son comportement», в которой проанализирован весь материал, опубликованный по проблеме бактериофагов в мире к тому времени [54].

Д'Эрелль пришел к своему открытию, имеющему общебиологическое значение, при изучении дизентерии у человека. Он обратил внимание на тот факт, что возбудитель этого заболевания в его начале выявляется в большом количестве, а в конце нередко перестает выделяться. В поисках причинного фактора данного феномена он стал добавлять к свежей бульонной культуре дизентерийной палочки небольшие количества фильтрата фекалий больного. Ему при этом удалось обнаружить просветление мутной бульонной культуры, а при посеве на плотный агар найти очаги прозрачных (стерильных) пятен (рис. 3).



Рис. 3. Пробирки с бактериальными культурами из первоначальных опытов д'Эрелля [53]

Это навело его на мысль (и стимулировало подтвердить ее) о существовании какого-то агента, способного размножаться и носящего корпускулярный характер. Ф. д'Эрелль дал ему наименование *Bacteriophageum intestinale*. Он сумел выделить этот антишигелловый «микроорганизм», размножить его на многочисленных сериях пассажей на бактерии-хозяине и получить указанные мелкие участки просветления при высеве. Он считал, что рассматриваемое явление может воспроизводиться как в экспериментальных условиях, так и в организме больного.

В мемориальной статье не будет излишним подробно процитировать авторское резюме его знаменитой

работы 1917 года: «В общем, у некоторых выздоравливающих от дизентерии я наблюдал, что исчезновение дизентерийных палочек совпадает с появлением невидимого микроба, наделенного антагонистическими свойствами против патогенной *бациллы*. Этот микроб, настоящий иммунный микроб, является облигатным бактериофагом; его паразитизм строго специфичен, но если ограничиться определенным видом, то можно постепенно, посредством прививания добиться активности против различных видов. Следовательно, кажется, что у дизентерийной палочки, равно как гомологический иммунитет, принадлежащий непосредственно инфицированному лицу, существует гетерологический иммунитет, исходящий из антагонистического микроба. Вероятно, что этот феномен не является специфическим для дизентерии, но что он имеет общее значение, так как я мог установить сходный факт, хотя менее выраженный, в двух случаях паратифозной лихорадки» [58].

Протицируем еще несколько коротких отрывков из этой статьи, приводящих детали.

«Из фекалий нескольких пациентов, выздоравливающих от инфекции дизентерийной палочкой, равно как и из мочи другого пациента изолировали невидимый микроб, обладающий антагонистическим свойством против *бациллы Шига*».

«В случаях выздоровления... антагонистический микроб очень скоро исчезает после исчезновения патогенной *бациллы*... Я никогда не находил антагонистический микроб у нормальных субъектов».

«Я никогда не получал активность против других микробов: тифозные и паратифозные *бациллы*, стафилококки и т.д.».

«Антагонистический микроб никогда не культивировался в среде в отсутствие дизентерийной палочки... Это указывает на то, что антагонистический дизентерийный микроб является облигатным бактериофагом» [58].

Автор в 1949 году дал интересную эмоциональную оценку своему открытию: «На следующее утро, открыв термостат, я пережил один из тех редких моментов сильного волнения, которое вознаграждает исследователя за все его старания: я сразу же увидел, что бульонная культура, которая накануне ночью была мутной, была совершенно прозрачной: все бактерии исчезли... Что касается распространения агара, то он лишен роста, и что вызвало мое волнение — это было то, что мгновенно я понял: то, что вызывает мои пятна, было фактически невидимым микробом, филь-

трующимся вирусом, но вирусом, паразитирующим на бактериях. Другая мысль пришла ко мне также. Если это действительно так, то точно такая же вещь будет, вероятно, происходить у больного человека. В его кишечнике, так же, как в моей тест-трубке, дизентерийные палочки будут также растворяться под действием их паразита. Теперь он должен быть вылечен» (см. Библиографию № 75).

Д'Эрель разработал метод титрования бактериофага, исследовал фазы его взаимодействия с бактерией (прикрепление, проникновение внутрь, размножение и лизис клетки-хозяина с выходом дочерних фагов в среду). Свои результаты он изложил в уже отмеченном объемистом (около 300 стр.) произведении 1921 года [53], где подробно описал указанные процессы. Важно также указать на то, что он в этой книге постулировал идею внутриклеточного размножения вируса.

Это направление работ поддерживалось директором Пастеровского института Эмилем Ру, и в соответствии с традициями данного учреждения начались экспериментальные исследования с практической ориентацией на терапевтическую ценность (рис. 4).

С этой целью были проведены полевые испытания фагов при тифе у кур, вызванном *сальмонеллой* (*Salmonella gallinarum*), и лабораторные исследования дизентерии на кроликах (возбудитель — *Shigella dysenteriae*). Далее последовали первые попытки применить фаготерапию при дизентерии у человека — у 12-летнего мальчика — с положительным эффектом. Известно также, что д'Эрель для проверки эффективности фаготерапии (пероральное и парентеральное введение фага) ставил опыты на себе, коллегах и членах семьи [60].

Следует вообще указать на долговременную, подвижническую деятельность д'Эреля по внедрению фаготерапии для лечения и профилактики инфекционных болезней в различных странах и континентах. Он много сделал в плане внедрения, проявив разумный прагматизм здравого смысла, умение доводить дела до конца, сконцентрировав собственную волю на огромную активность в отношении практической реализации своего открытия, создав и апробировав направления фаготерапии при разных нозологиях и в различных точках земного шара (со всевозможными модификациями, включая «коктейли фагов» и т.д.). Д'Эрель не тратил время на бессмысленное теоретизирование или бесконечные дискуссии о приоритете. Он сразу, без колебаний оценил истинность обнаруженного им факта, найдя соответствующий

термин «бактериофагная частица», «ультрамикроб», «невидимый микроб», «антагонистический микроб», «микроорганизм» [13, 53] (см. также Библиографию № 67) (задолго до демонстрации действительного ультрамикроскопического агента) и стал лично повсеместно распространять знания о нем. Это была настоящая пропаганда нового метода самим перво-

открывателем, нередко не в госпиталях, а в реальных полевых условиях, в очагах эпидемий особо опасных инфекционных заболеваний (чума, холера и др.). Кстати, именно доктрина работы с инфекционными агентами в очаге эпидемии, в естественных условиях всегда была центральной у д'Эрелля при отстаивании целесообразности применения бактериофагов.



Рис. 4. Д'Эрелль с сотрудниками в Пастеровском институте (© Институт Пастера — Музей Пастера)

Необходимо также подчеркнуть, что противником теоретических взглядов д'Эрелля на корпускулярную (воспроизводимую, паразитирующую) природу бактериофагов долгое время был такой классик микробиологии, как Борде [31–33], который придерживался мнения о примате ферментативных аутолитических процессов бактерий. Борде и другие оппоненты считали, что фаги являются неодушевленными (неживыми) химическими веществами, особыми ферментами, которые предсуществуют в бактериях и лишь запускают механизм высвобождения специальных белков, убивающих клетки-хозяева. Д'Эрелль с честью и непоколебимостью выдержал прессинг 20-летней критики и безосновательных нападок до тех пор, пока работы Ruska H. (1940) [89] и других авторов [81, 82] с применением электронного микроскопа не разрешили противоречия, продемонстри-

ровав реальную биологическую сущность бактериофагов. Таким образом, в итоге французско-канадский ученый оказался прав в споре с бельгийским ученым и его многочисленными единомышленниками.

Последующий цикл молекулярно-биологических исследований фагов, главным образом, так называемой «фаговой группы»: Дельбрюк М., Лурия С., Херши А. [6, 8, 10, 68] — и других ученых: Львов А., Жакоб Ф., Моно Ж. [9], — четко определил место и значение бактериофагов в системе биологических знаний. Указанные группы ученых были удостоены Нобелевской премии в 1965 и 1969 годах. Известно также, что Дж. Уотсон выполнил диссертационную работу (Ph.D.) на фагах в лаборатории Сальвадора Лурия. Что здесь важно: абсолютные лидеры и фактические создатели молекулярной биологии взяли за основу не первое упоминание Туорта о

«литическом феномене», а верную и выстраданную автором концепцию д'Эрелля о бактериофагии как широком биологическом явлении.

Нельзя сказать, что в отношении признания справедливости идеи бактериофагии (даже вне личностного фактора) все и всегда шло гладко. Скорее, наоборот, большей частью было непризнание, забвение или противодействие. Даже после триумфальной серии классических работ «фаговой группы» они выпали из поля зрения Нобелевского комитета в реальное время совершения ее открытий, и понадобилось еще 20 лет, чтобы после работ по структуре ДНК и генетическому коду «заметили» ее вклад в общий прогресс молекулярной биологии. При этом потребовалось еще провести 60-летний юбилей Макса Дельбрюка, напечатать в 1966 году книгу в его честь [39], выстроить в ней в исторической последовательности весь «фаговый» материал, чтобы научное сообщество 1960-х годов, оборачиваясь назад, воочию убедилось в значимости совершенного и, как венец всему делу, состоялось присуждение в 1969 году заслуженной, но запоздалой награды. Что уж говорить о д'Эрелле, действовавшем в 1920–1930-е годы фактически в одиночку против бесчисленных противников.

Вопрос о приоритете. Вопрос о приоритете (или паритете) открытия бактериофагии остро не стоял, несмотря на более раннюю, по сравнению с Ф. д'Эреллем, публикацию английского бактериолога Фредерика Туорта [100]. Обычно исторический контекст преподносится с упоминанием о наблюдениях антимикробной активности священных вод реки Ганг в Индии (Hankin, 1896) [71] и об описании Н.Ф. Гамалея (1898) лизиса бактерий (возбудителя сибирской язвы) под действием фильтрата этого микроорганизма, названного им бактериолизин [11]. Что касается Туорта, то его статья [100] является как бы знаковой преамбулой к тому длительному, непрерывному циклу работ о бактериофагах, который генерирован д'Эреллем. Туорт независимо от последнего описал явление «стекловидного» перерождения стафилококков и микрококков при длительном их культивировании на питательной среде. Фактор, вызывавший лизис колонии, переносился с зараженной колонии на незараженную и сохранял активность, был фильтрующимся и самореплицирующимся. Он придерживался взгляда о ферментативной природе литического агента [65, 99]. Такая позиция Туорта импонировала Борде, который поддерживал англичанина в его отстаивании приоритета. Несмотря на глубокое содержание, особенно проявляющееся при ретроспекции, сообщение Туорта не привлекло внимания его современников, а сам автор, служивший в то время в

армии и также из-за отсутствия средств, был вынужден прекратить систематическое изучение этой проблемы. К тому же шел второй год мировой войны, были нарушены нормальные связи ученых; поэтому можно считать, что работа д'Эрелля выполнялась совершенно независимо от английского автора. Для многих исследователей истории остается загадкой, почему Туорт в стратегическом плане не стал развивать свое открытие, переключившись на другую тематику. Далее практические следствия — он не поставил вопрос о возможности фаготерапии. В общем, скорее всего он, в отличие от д'Эрелля, недооценил значимость своего открытия. Он, по сути, стал соавтором обнаружения феномена, но не разработчиком проблемы. Позднее он возобновил исследования по бактериофагам, даже пытался выращивать вирусный фактор в искусственной среде, периодически выступал с отдельными публикациями [101, 102]. С 1929 года его имя номинировалось в нобелевских списках кандидатов на премию, однако в целом размах его работ по теме бактериофагии был не широк. Туорт прожил долгую жизнь и умер примерно в один год с д'Эреллем (в 1950 году).

Другое дело — д'Эрелль. Он был носителем и неутомимым пропагандистом идей биологического значения и лечебно-профилактического применения бактериофагов, и поэтому его первопроходческая роль в общем историческом зачете не подлежит сомнению. Из-под его пера выходили десятки статей. Его идеологии придерживались многие последователи. Он всячески помогал инициаторам фаготерапии по всему миру морально и материально, в том числе и из собственных средств. Фактически это было делом всей его жизни. Да и простое сравнение общих вкладов того и другого в решение рассматриваемой проблемы явно в пользу французской бактериологической школы: д'Эрелль — более 100 преемственных целенаправленных публикаций, тогда как Туорт — 5–7 разрозненных работ, разорванных по времени и с большим перерывом после обнаружения первичного факта. Причем, уже на старте, к 1922 году, пока в течение 7 лет Туорт молчал, д'Эрелль выпустил 20 принципиальных работ, включая монографию.

Однако теоретические взгляды д'Эрелля были предметом наиболее острых дискуссий [34], особенно по проблеме иммунитета. Он рассмотрел эту тему подробно в главе 4 «Бактериофаг и иммунитет» (часть II) своей книги 1921 г. [53]. Он считал, что суспензия фага обладает сильным иммунизирующим действием (вследствие прямого влияния растворенной субстанции бактерии). В случае отсутствия бактериолитического эффекта фаг вызывал, по его мнению, бактериальные мутации, спо-

собствующие активности иммунной системы. Многие его рассуждения не укладывались в общепринятые в то время концепции Мечникова, Эрлиха. Больше того, от иммунного аспекта д'Эрелль перешел к построению общей теории выздоровления [13], что также не разделялось его оппонентами. Однако в настоящее время иммунологические аспекты применения бактериофагов приобретают должную оценку и внимание исследователей [46].

Спорность ряда теоретических положений об иммунитете д'Эрелля стимулировала его противников к критике по всем фронтам, где самыми уязвимыми, согласно их взглядам, были вопросы о приоритете открытия фага и о его литической функции. К тому же остроту дискуссии придавало затронутое самолюбие одного из лидеров этой эпопеи — Борде. Можно понять увенчанного мировой славой бельгийского ученого, мнение которого в споре с начинающим ученым было оценено последним «как цепь ошибок» (1924) (см. Библиография № 44).

Были и другие его субъективные мнения: так, он восставал против лабораторного экспериментирования при изучении инфекций, отдавая предпочтение работе в естественной среде их возникновения [13].

Вообще для решения вопроса о приоритете требуется объективная процедура рассмотрения фактов и соответствующая методология, принятая в среде историков науки. Здесь выделяется два главных аспекта: 1) сочетание предметного и личностного подхода; 2) применение метода отдаленной (поздней) и ближней (ранней) ретроспекции с включением анализа взглядов современников. Это особенно важно при возникновении противоречий и споров. Первый аспект сравнительно полно уже рассмотрен в настоящей работе. В отношении ретроспекции целесообразно привести мнения наиболее авторитетных специалистов, которые сработали корректно в историческом плане, то есть признавали большую полноту и правоту взглядов д'Эрелля. Было проанализировано большое количество литературных источников [4, 16, 19, 27, 34, 50, 64, 66, 79, 88, 91, 97, 98]. Приведем некоторые из них как буквально, так и в обобщении.

Вот слова 1925 года, принадлежащие Дж. Бронфенбреннеру, крупному американскому ученому, знатоку бактериофагии, учителю Нобелевского лауреата Алфреда Херши, человеку, который был крайне удивлен, увидев хвост на электронно-микроскопическом снимке фага: «...Именно д'Эрелль провел первые систематические исследования и разработал эту концепцию [спонтанного трансмиссивного лизиса бактерий]. Он

приписывал литическую функцию живому, фильтрующемуся, ультрамикроскопическому микроорганизму, паразитирующему и быстро размножающемуся за счет активно растущих бактерий» [36]. Есть еще мнение выдающегося генетика, лауреата Нобелевской премии Германа Меллера, высказанное им в 1922 году: «Если бы эти тельца д'Эрелля были действительно генами, фактически как гены наших хромосом, то они дали бы нам абсолютно новый угол, под которым можно атаковать проблему гена. Они — фильтрующиеся, до некоторой степени изолированные, с ними можно манипулировать в тест-трубках, и их свойства, как показали их эффекты на бактерии, можно затем изучать после обработки. Было бы очень поспешно назвать эти тельца генами, и в настоящее время мы все еще должны считать, что нет общепризнанного различия между генами и ими. Поэтому мы не можем категорически отрицать, что, вероятно, мы можем растирать гены в ступке и обрабатывать их в мензурке после всего. Должны ли мы, генетики, стать бактериологами, физиологическими химиками и физиками одновременно с зоологами и ботаниками. Позвольте нам надеяться на это» [84]. Такой вывод задним числом выглядит как бы объявленным с опережением времени. В указанное время, кстати, Меллер уже стал высказывать свои соображения о химической структуре гена. Можно ряд подобных цитат продолжать. Работа бельгийского исследователя Gruynoghe R. (1921) — первая успешная фаготерапия при лечении стафилококковых инфекций кожи — свидетельствовала также в пользу д'Эрелля [37].

Что касается более позднего времени, то оно совпало с эпохой преобладания химиотерапии, а затем антибиотикотерапии, и поэтому практический аспект фаготерапии отошел на второй план (последний метод был более сложен, неоднозначен и экономически проигрывал фармбизнесу), хотя ниша ее применения достаточно четко была очерчена. Относительно теоретического значения бактериофагов упоминалось выше — они заняли прочное место в фундаменте молекулярной биологии [39]. К тому же современные специалисты находятся в лучшем положении, чем научные работники предыдущих поколений, не знавшие элементарного строения обсуждаемого предмета. Сейчас они могут позволить себе представить базирующееся на неоспоримых фактах интегральное, коллективное, консолидированное суждение огромного сообщества ученых, для которых на отдалении 100 лет фигура Феликса д'Эрелля выглядит все-таки предпочтительнее. Поэтому в более поздних высказываниях по существу вопроса, в том числе в отношении общей значимости феномена бак-

териофагии с сравнении с другими явлениями и методами, звучат более емкие определения. Исследователь Норкин Л. (2010) [87] четко разделяет события в отношении авторства и первенства, утверждая, что Туорту принадлежит открытие бактериолитического эффекта, а не бактериофагии, оставляя последнее д'Эреллю. Оптимальную формулировку находит французский автор Берже Савен [30], подчеркивая, что Туорт продолжил исследования Хэнкина и Гамалеи по феномену бактериолиза, высказав ряд гипотез. Имеется еще очень значимое свидетельство в контексте снижения интереса к бактериофагам во 2-й половине XX века в связи с господством антибиотиков. Так, Этьен Вольф, профессор из Страсбурга, сказал, что «...Бактериофаг представляет собой научную революцию, тогда как пенициллин есть частный случай химиотерапии» [48]. Скорее всего, вряд ли стоит так противопоставлять. Интересно, что и А. Флеминг в 1928 году с пенициллином, и Э. Ваксман в 1943 г. со стрептомицином также имели дело первично не с химически чистыми кристаллическими формами антибиотиков, а продуктами естественной жизнедеятельности грибов и актиномицетов в их взаимодействии с другими видами, родами, семействами, отрядами, классами, типами, царствами живых существ [25]. То есть в русле дарвиновской борьбы за существование в натуральной среде, как и в случае фагов и бактерий, на что всегда указывал д'Эрелль. К тому же Флеминг перед обнаружением бактерицидного эффекта плесени на культуры стафилококка прошел в 1921–1927 гг. через цикл открытия и изучения антагонистического действия лизоцима из слезной жидкости и слюны. По-видимому, не случайно председательствовавший на I Международном конгрессе микробиологов в 1930 году Борде отметил значимость работ Флеминга по лизоциму [25]. Между прочим, неальтернативный подход к изучению сочетанного действия фагов и антибиотиков предпринимался уже в начале широкого применения антибиотиков в конце II Мировой войны, причем, знаменательно, что возник он в лаборатории Райта, где Флеминг сделал свое открытие, но потом это направление работ было оставлено [72, 83].

В связи со сказанным вопрос о приоритете в столкновении авторских прав д'Эрелля и Туорта в общем носит скорее схоластический характер и должен решаться примерно так же, как, например, при ретроспективном обсуждении справедливости присуждения Нобелевской премии именно Уотсону, Крику, Уилкинсу за открытие строения ДНК, где на 3 места, по словам участников дискуссии, могли бы претендовать около 50 человек (жи-

вых и почивших). А это уже проблема сослагательного наклонения для дел минувших дней.

И еще несколько слов в завершение дела, в порядке *post scriptum*. Видя, что в полемике разных групп ученых сторонники Туорта акцентировали внимание больше на его приоритет по времени высказывания (1915), д'Эрелль сообщал, что его концепция начала созревать с 1910 года — времени его наблюдений над диареей у саранчи в Мексике. Имеется еще немало-важный факт — это публикация д'Эрелля 1915 года по результатам изучения эпидемии у саранчи в Тунисе [52], когда он подметил факт реконвалесценции только при наличии двух факторов: коккобациллы и фильтрующегося патогенного агента. Есть, конечно, этический вопрос о неупоминании д'Эреллем предшественника (но ведь было военное время и прошло не более 2 лет). Правда, в своем первом фундаментальном труде 1921 года он в числе других исторических фигур упоминает Туорта [53]. К тому же главное в противоречии между этими двумя лицами не время, не последовательность событий, а суть. Д'Эрелль в 1917 году сформулировал и обосновал новый феномен в биологии, причем в достаточно завершённой и, как оказалось впоследствии, верной форме (в отличие от Туорта, который ошибался в теории, признавая аутолитическую функцию обнаруженного фактора). Больше того, именно эта ошибка Туорта консолидировалась с мнением других авторов, в их числе Борде, и ценилась как один из главных аргументов против наблюдений и выводов д'Эрелля. Фактически в 1920–1930-е годы в дискуссии с д'Эреллем предпринимались попытки навязывания неверной идеи, которая не могла быть исправлена по техническим возможностям того времени и считалась предпочтительной за счет объединения большого числа специалистов вокруг Борде с его суперавторитетом в бактериологии, закрепленным его открытиями и Нобелевской премией.

И, завершая рассмотрение вопроса о приоритете, нельзя не вспомнить о традиционной борьбе за интеллектуальное первенство между Парижем и Лондоном, «континентальными» и «островными» учеными, что нередко придавало больше эмоциональный оттенок, чем выяснение истины.

Нобелевские номинации. Данный раздел сформирован специально, чтобы внести дополнительные аргументы в противостояние авторских интересов двух ученых. В нынешнее время, когда нобелевские архивы общедоступны, это нетрудно сделать. Нами проведено сопоставление номинантов и номинаторов за 1925–1937 годы [74, 85, 86] (табл. 1).

Обычно биографы любят подчеркивать, что д'Эрель номинировался 8 раз на Нобелевскую премию, но ведь примерно так же обстояло дело и с его соперником (того выдвигали 6 раз, причем 5 раз они конкурировали при голосовании друг с другом; правда, и оба, и порознь проигрывали). Так что простое упоминание о числе номинаций не дает исчерпывающей информации о фактической динамике указанного процесса выдвижения на премию.

Между тем при анализе данных таблицы 1 выясняется, что на протяжении почти всех 1920-х годов номинировали только одного д'Эреля, а Туорта стали выдвигать только с 1929 года и, начиная с этого времени, соперники по соисканию премии за работы по бактериофагии шли параллельным курсом до 1937 года, так и не удостоившись награды. Нужно подчеркнуть, что в числе номинаторов были такие известные имена, как Алексис Каррель, Дж. МакЛеод (лауреаты Нобелевской пре-

мии). Интересно отметить, что в 1931 году шансы Туорта на победу над д'Эрелем значительно повысились (причем в номинации с мотивацией «Открытие бактериофага») в связи с усилением коллективной оппозиции научных кругов идеям последнего, не смирявшегося перед авторитетами.

Почему же ни тот, ни другой не попали в число лауреатов? Скорее всего, из-за того, что час бактериофагии еще не пробил. Не была раскрыта структура литического агента, не получило массового распространения клиническое применение (хотя бы по сравнению с серотерапией или вакцинацией). Сказалось и противодействие со стороны Борде. Возможно, отрицательную роль сыграло отсутствие согласованной позиции самих конкурирующих авторов. Поэтому в калейдоскопе актуальных, но большей частью относительно мелких тем бактериофагия не выглядела как открытие высшего уровня.

Таблица 1

Список номинантов на Нобелевскую премию по физиологии и медицине в 1920–1930-х годах [85, 86]

№ п/п	Год	Номинант (по порядку)	Мотивация	Страна номинанта	Номинатор (страна)	Победитель
1	1924	Феликс д'Эрель (1)	Открытие бактериофага	Нидерланды	Фриц Верзар (Венгрия)	В. Эйнтховен
		Рудольф Магнус (2)	Работа по движениям кишечника, мышечному тону и позе	Нидерланды	Фриц Верзар (Венгрия)	
2	1925	Джон Дж. Абель (1)	Исследования эндокринных желез и избирательная экскреция красителей	США	Э. Либман (США)*	Премия зарезервирована для присуждения в следующем году
		Феликс д'Эрель (2)	Бактериофаг	Египет	Э. Либман (США)*	
		Бела Шик (3)	Работа по сывороточной болезни и предупреждению малярии	Австрия	Э. Либман (США)*	
3	1925	Феликс д'Эрель (1)	Бактериофаг	Египет	Р. ле Блаё (Франция)	— " —
4	1926	Феликс д'Эрель (1)	Открытие и работа по бактериофагу	Египет	Эдвард Бабак (Чешская Республика)	Перенесенная премия 1925 года переведена в специальный фонд секции, а премия 1926 года зарезервирована для присуждения в 1927 году
5	1926	Феликс д'Эрель (1)	Открытие и работа по бактериофагу	Египет	О. Фелкер (Чешская Республика)**	— " —
6	1926	Феликс д'Эрель (1)	Открытие и работа по бактериофагу	Египет	Рудольф Ванишек (Чешская Республика)	— " —

№ п/п	Год	Номинант (по порядку)	Мотивация	Страна номинанта	Номинатор (страна)	Победитель
7	1926	Феликс д'Эрелль (1)	Открытие и работа по бактериофагу	Египет	Фр. Берка (Чешская Республика)	— " —
8	1926	Феликс д'Эрелль (1)	Открытие и работа по бактериофагу	Египет	В. Нейманн (Чешская Республика)	— " —
9	1926	Феликс д'Эрелль (1)	Открытие и работа по бактериофагу	Египет	Хидейо Ногучи (США)	— " —
10	1926	Феликс д'Эрелль (1)	Открытие и работа по бактериофагу	Египет	Ричард Брюйног (Бельгия)	— " —
11	1929	Феликс д'Эрелль (1)	Открытие бактериофагов	США	Алексис Каррель (США). Лауреат Нобелевской премии 1912 г.	Х. Эйхман, Ф.Г. Хопкинс
		Фредерик В. Туорт (2)	Открытие бактериофагов	Великобритания		
12	1929	Феликс д'Эрелль (1)	Открытие и работа по бактериофагам	США	Шторм фон Левен (Германия)	— " —
13	1929	Феликс д'Эрелль (1)	Открытие и работа по бактериофагам	США	Марк Ромье (Франция)	— " —
14	1929	Феликс д'Эрелль (1)	Открытие и работа по бактериофагам	США	Р.Н. Чопр (Индия)	— " —
15	1929	Феликс д'Эрелль (1)	Открытие и работа по бактериофагам	США	Г.В. Эктон (США)	— " —
16	1930	Феликс д'Эрелль (1)	Открытие бактериофага	США	Алексис Каррель (США). Лауреат Нобелевской премии 1912 г.	К. Ландштейнер
		Фредерик В. Туорт (2)	Открытие бактериофага	Великобритания		
17	1930	Феликс д'Эрелль (1)	Открытие бактериофага	США	Иван К. Холл (США)	— " —
18	1930	Джон Дж. Абель (1)	Работа по эпинефрину, избирательной экскреции красителей и природе и идентификации главной функции гипофиза	США	Э. Либман (США)	— " —
		Фредерик В. Туорт (2)	Исследования по бактериофагу	Великобритания		
		Феликс д'Эрелль (3)	Исследования по бактериофагу	США		
19	1931	Феликс д'Эрелль (1)	Открытие бактериофага	США	Эйген Л. Опай (США)	О. Варбург
		Фредерик В. Туорт (2)	Открытие бактериофага	Великобритания		
20	1931	Феликс д'Эрелль (1)	Открытие бактериофага	США	Дж.Б. Рид (Канада)	— " —
21	1931	Феликс д'Эрелль (1)	Работа по бактериофагии	США	Эжен Глей (Франция)	— " —
22	1931	Фредерик В. Туорт (1)	Открытие бактериофага	Великобритания	Джон Джеймс МакЛеод (Канада). Лауреат Нобелевской премии 1923 года	— " —

№ п/п	Год	Номинант (по порядку)	Мотивация	Страна номинанта	Номинатор (страна)	Победитель
23	1931	Фредерик В. Туорт (1)	Открытие бактериофага	Великобритания	Алексис Каррель (США). Лауреат Нобелевской премии 1912 года	— " —
24	1931	Фредерик В. Туорт (1)	Открытие бактериофага	Великобритания	Джеймс МакИнтош (Великобритания)	— " —
25	1932	Феликс д'Эрель (1)	Работа по бактериофагам	США	Ж. Котт (Франция)	Ч.С. Шеррингтон, Э.Д. Эдриан
26	1932	Феликс д'Эрель (1)	Работа по бактериофагам	США	Карл Кискальт (Германия)	— " —
27	1932	Феликс д'Эрель (1)	Работа по бактериофагии	США	Р. Мюллер (Германия)	— " —
		Генрих Поль (2)	Работа по наследственным и приобретенным причинам заболеваний близнецов	Германия		
		Герман Сименс (3)	Работа по наследственным и приобретенным причинам заболеваний близнецов	Нидерланды		
28	1933	Фредерик В. Туорт (1)	Открытие бактериофага	Великобритания	Пьер Нольф (Бельгия)	Т.Х. Морган
29	1934	Феликс д'Эрель (1)	Открытие бактериофага	США	Э.В. Шульц (США)	Дж.Х. Уипл, Дж.Р. Майнот, У.П. Мерфи
		Фредерик В. Туорт (2)	Открытие бактериофага	Великобритания		
30	1937	Феликс д'Эрель (1)	Открытие бактериофага	США	К. Ландштейнер (США). Лауреат Нобелевской премии 1930 г.	А. Сент-Дьердьи
		Пейтон Раус (2)	Работа по фильтрующемуся вирусу как причине злокачественных опухолей	США		
		Фредерик В. Туорт (3)	Открытие бактериофага	Великобритания		

Примечание: * — Им также номинированы Х. Ногучи и Т. Морган; ** — Предварительная оценка Н. Bergstrand включала Ch. Nicolle и R. Pfeifer. Дальнейшая оценка была сделана Н. Bergstrand, F. Henschen, John Sjöqvist и J. Forsmann

Но что удивительно: за два года до визуализации строения бактериофага в электронном микроскопе при формировании списка номинантов на Нобелевскую премию 1937 года выдающийся ученый, первооткрыватель групп крови человека Карл Ландштейнер, сам Нобелевский лауреат 1930 года представил такой оказавшийся провидческим список (см. детали в табл. 1): Ф. д'Эрель, П. Раус, Ф. Туорт.

Что особенно интересно: эта группа оказалась объединенной на получение награды за работу с факторами (вирусами и фагами), не известными точно науке, но в будущем нашедшими подтверждение и ставшими основополагающими в биологии и медицине. Д'Эрель и Туорт уже хорошо рассмотрены, а вот фигура Рауса весьма показательна. Он был номинирован за свои исследования фильтрующегося вируса, причастного к опухолевому процессу (развитию саркомы у кур — она носит его имя). Свое базовое открытие

он совершил в 1911 году, но Нобелевскую премию в 1937 году он не получил, а был удостоен ее спустя 55 лет после открытия, в 1966 году (аналогичный случай с длительным отсроченным вручением произошел с генетиком Барбарой МакКлинток, получившей премию в 1980-х годах за открытие транспозонов 1940-х годов; поэтому долгожительство в науке может быть дополнительным гарантом признания). Так что остальные два соискателя, имеющие отношение к открытию невидимых в микроскопе и химически неидентифицированных в 1910-е годы бактериофагов, тоже могли бы стать награжденными, если бы прожили еще 15–20 лет после рубежа их ухода из жизни 1950-го года, — именно тогда состоялся триумф использования фагов в молекулярной биологии, благодаря чему были обнаружены многие фундаментальные вещи. И еще одно совпадение указанной «триады» исследователей — свои открытия они сделали примерно в одно время: Раус — в 1911 г., Туорт — в 1915

г., д'Эрель — в 1917 г. (рис. 5). Вот с каким счастливым концом мог бы разрешиться спор о приоритете, если бы удалось раздвинуть временные рамки! И Нобелевский комитет мог бы со спокойной совестью присудить премию этому триумvirату. Не надо забывать также, что 1937 год является годом обнаружения рибонуклеопротеидной (РНК) природы вируса табачной мозаики (Боуден Ф.).

И последнее знаковое совпадение в этой истории с номинациями. Сам Карл Ландштейнер, столь дальновидно объединивший вирусологов, на многие годы опередивших свое время, был в числе конкурентов д'Эреля и Туорта по премии 1930 года, причем с положительным результатом (он ее получил в тот год). То есть тема бактериофагии была на виду в то время, и Карл Ландштейнер хорошо понимал это.

Грузинская эпопея. Есть в обсуждаемом предмете жизни и деятельности д'Эреля одно немаловажное

обстоятельство. Это — взаимоотношения с грузинским микробиологом Г.Г. Элиавой. Информация по этому вопросу может быть неполной и неоднозначной, но достоверные факты имеются и целесообразно привести их в настоящем сообщении [26, 42, 43, 90].

В конце 1910-х — начале 1920-х годов д'Эрель общался в Пастеровском институте с молодым российским стажером из Тифлиса, выпускником Московского университета Г.Г. Элиавой [28]. У них установились дружеские отношения, причем со стороны д'Эреля покровительственные (он был старше Элиавы на 20 лет). Стажер проявлял интерес к бактериофагам [62]. Имелись у них и совместные научные публикации [51]. По совету и при поддержке д'Эреля Элиава создал в Тифлисе первую в Советском Союзе лабораторию по изучению бактериофагов. В 1923 году ее преобразовали в Институт бактериофагов.

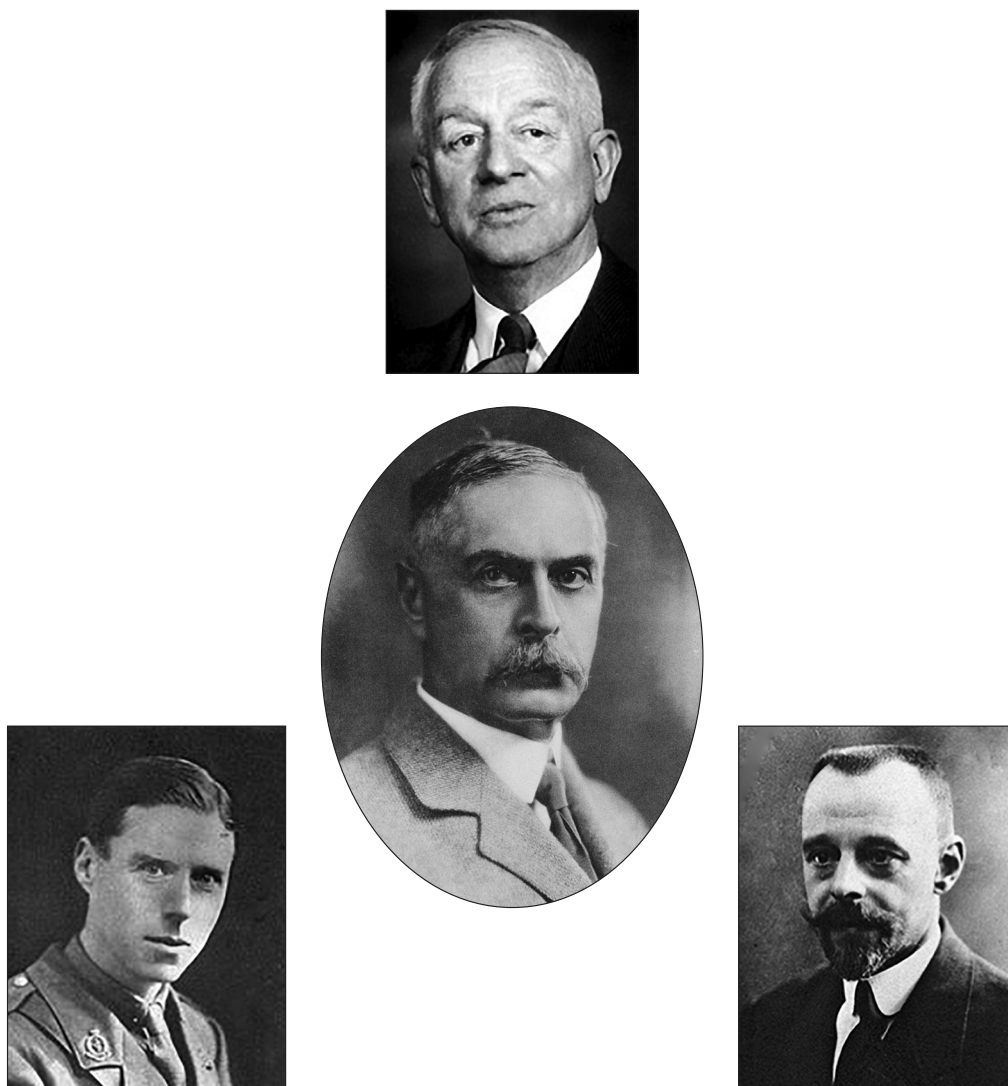


Рис. 5. Номинанты на Нобелевскую премию 1937 г.: П. Раус (вверху), Ф. Туорт (внизу слева), Ф. д'Эрель (внизу справа). В центре — их номинатор К. Ландштейнер

В дальнейшем события разворачивались следующим образом. Правительство СССР одобрило создание центров по изучению бактериофагов, кроме Тбилиси, еще в Киеве и Харькове. Грузинским энтузиастам исследования бактериофагов и фаготерапии удалось получить поддержку Наркома тяжелой промышленности Серго Орджоникидзе. Развернулось строительство нового здания института, а в институтском парке был возведен специальный коттедж для д'Эрреля и Элиавы. Французский куратор в основном безвозмездно поставлял в Грузию оборудование и книги для библиотеки, а в 1934—1935 годах сам приезжал в город на Куре, где трудился бесплатно в течение двух полугодий. Есть сведения, что д'Эррель в это время посещал Москву, где у него были контакты с Наркомом здравоохранения Г.Н. Каминским. Казалось бы, замечательная идея вот-вот ждет своего победоносного завершения. Д'Эррель даже собирался окончательно переехать в Грузию и посвятил Сталину свою книгу «Бактериофаг и феномен выздоровления», вышедшую в свет в 1935 году на русском языке в переводе с французского Г.Г. Элиавы [13] (впоследствии книга оказалась под запретом, попав в список «Для служебного пользования») (рис. 6).

Но наступил зловеющий 1937 год с его массовыми репрессиями, который не пощадил многих, в том числе грузинскую интеллигенцию. Умер мощный благодетель — Орджоникидзе. В июле 1937 года Георгий Элиава вместе со своей красавицей-женой Амелией, знаменитой оперной певицей, были расстреляны по «шпионскому делу».

Д'Эррель тяжело переживал это событие и в своих воспоминаниях никогда не рассказывал о Тбилисском институте. Однако труд первооткрывателя бактериофагов не пропал даром. Такие прецеденты, когда выдающиеся исследователи «работали на коммунистический режим», были: вспомнить хотя бы Германа Меллера, много сделавшего в 1920—1930-е годы для развития генетики в СССР (правда, все завершилось печальным концом). Аналогичную миссию выполнил и Феликс д'Эррель, что ему, конечно, припомнили на Западе.

Несмотря на указанные драматические события, тем не менее идеи парижского ученого прижились в Советской России, возвращенные на благодатной грузинской земле. Тбилисский институт бактериофагов, созданный трудами Элиавы и д'Эрреля, был объединен с Институтом микробиологии и эпидемиологии под эгидой Наркомата здравоохранения Грузии.

Впоследствии в 1951 году он был переименован в Тбилисский НИИ вакцин и сывороток всесоюзного под-

чинения со штатом из более 100 исследователей и сотен сотрудников производственного сектора, что способствовало обеспечению бактериофагами для терапии и бактериального типирования в масштабах всей страны. Все это сыграло огромную роль в сохранении идущего от самого основателя уникального научно-практического направления и одного из создателей специального учреждения по изучению бактериофагов и фаготерапии и в превращении его в мировой центр терапевтических исследований фагов.

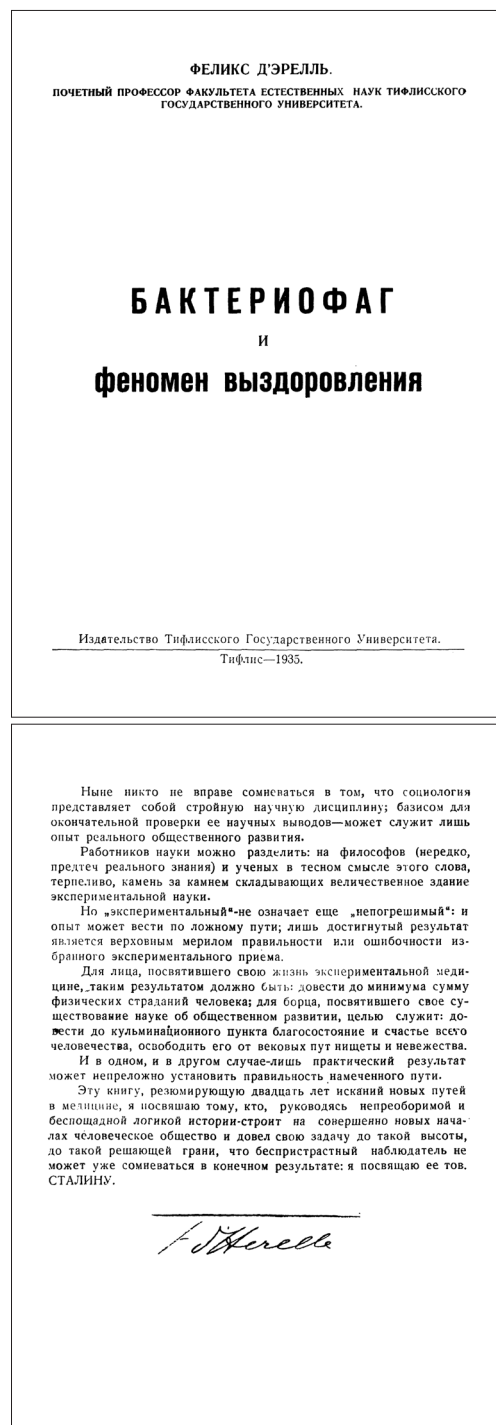


Рис. 6. Титул книги д'Эрреля (1935) с посвящением Сталину [13]

Нужно особо подчеркнуть значение применения бактериофагов во время Великой Отечественной войны для лечения ран и предотвращения эпидемий инфекционных заболеваний, что было существенным подспорьем в доантибиотиковую эру [20].

Тбилисский институт к 1990-м годам обладал крупной библиотекой бактериофагов с более 3000 клонов. В 1988 году в Тбилиси было создано НПО «Бактериофаг» с производственными площадками в Горьком, Уфе, Хабаровске. В 1998 году институту было присвоено имя его основателя — Георгия Григорьевича Элиавы.

Надо также заметить, что эта «грузинская история» продолжается до настоящего времени. Сотрудники института активно работают, включая международное сотрудничество. В начале 2000-х годов исследователь из Университета Мэриленд (США) Гленн Моррис совместно с сотрудниками Тбилисским НИИ бактериофагов, микробиологии и вирусологии провели испытания фаговых препаратов с целью их лицензирования в США [92]. В 2007 году бактериофаги были одобрены для использования в США.

Известно также, что в 1920–1930-е годы фаготерапия была широко распространена в США, но, начиная с 1940-х годов, главным образом, после внедрения антибиотиков, ее популярность пошла там на убыль. Сейчас и в США, и в других государствах наблюдается некоторая историческая переоценка значения фаготерапии [45, 76, 93, 97], чего никогда не происходило в нашей стране [1, 15, 17, 18, 22] — эта проблема всегда относилась к числу приоритетных.

И в заключение данного раздела следует сказать, что прививка занятий бактериофагами, сделанная в Тбилиси самым родоначальником этого направления, оказалась добротной и жизнеспособной и выдержала испытание временем и социальным неустroением.

Особенности характера. В литературе приводятся мнения о том, что у д'Эрелля был сложный, неуживчивый характер, в результате чего у него появлялось много противников и недоброжелателей. Он был человеком увлекающимся, мог сутками работать в лаборатории. Нередко трудился без оплаты, мог безвозмездно передавать оборудование своим коллегам. О его страсти к путешествиям, умении переносить тяготы кочевой жизни уже сообщалось. Но в общем зачете это сработало не в чисто приключенческом аспекте, а как уникальное предназначение и помощь в профессии. Благодаря глобальному осмыслению он постоянно отстаивал идею изучения инфекций вообще и особо опасных инфекций, в частности, в естественных условиях. Когда его спрашивали, как и когда он осваивал микробиологию, он отвечал, что во время долгих плаваний.

Д'Эрелль был горячим поклонником таланта Пастера, особенно его интуиции и предвидения в экспериментах, где требовались относительно простые, нестандартные первопродходческие решения, а не изысканная эрудиция, идущая по проторенным путям. Почитая его память, он, конечно, ценил высокоинтеллектуальную обстановку учреждения, носящего его имя и в котором он работал 10 лет, но по разным причинам покинул.

Есть у него особая черта — постоянный интерес к философскому осмыслению фактов и событий. Но все заметки его на этот счет остались неопубликованными: скорее всего, это были мысли для себя, для внутреннего употребления и составляют предмет сокровенной личной тайны.

Были у него и серьезные просчеты, как, например, с иммунологическими объяснениями, но это, вероятно, было следствием профессионального самообразования.

Д'Эрелль внимательно относился к начинающим сотрудникам. Так, например, известно, что он оказал содействие брату писателя Михаила Булгакова — Николаю Афанасьевичу Булгакову, предоставив ему рабочее место в парижской лаборатории [26, 78].

Наверное, небезразлично для его характеристики упомянуть о необычной внешности (особенно в молодые годы) — удивительная фотогения, напоминающая персонажей картин Веласкеса.

Награды и посмертное признание. Наградной список Ф. д'Эрелля сравнительно скромнен: медаль Левенгука (1925), Шаудинна (1930), малая медаль Французской академии наук (1948).

Особенно дорожил ученый медалью Левенгука, памятуя то, что ею был награжден сам Пастер. Получил тот ее в зените славы в 1895 году, незадолго до кончины. По ее статуту, эта медаль вручается Нидерландской Академией искусств и наук 1 раз в 10 лет за самый значительный вклад в микробиологию за предыдущую декаду. Так вот: по прошествии этих циклов, через 30 лет после Пастера ее вручили д'Эреллю. Было от чего гордиться человеку, державшему в те годы оборону от критики почти всех лидеров микробиологии начала XX века. Вообще он боготворил этого великого человека. Быть может, втайне, наедине с собой, вероятно, осознавая собственную одаренность, он усматривал некоторые параллели с объектом своего почитания и неизменного восхищения. Как и Пастер, начал с изучения процессов виноделия и бродильного производства. Так что к микробиологии он подошел через практику, а уже потом, пройдя школу Пастеровского института, сумел профессионально войти в суть всего спектра проблем этой науки.

Он был также почетным доктором Лейденского (1924), Йельского и Монреальского университетов, иностранным членом-корреспондентом «Société de biologie» (1926).

Ради исторической достоверности не следует забывать, что он состоял почетным профессором факультета естественных наук Тифлисского государственного университета (в литературе об этом редко упоминают).

Помнит ученого Франция, где его именем названо одно из авеню в 16-м округе Парижа. Чтут его и канадцы: в Университете Лавала хранится коллекция бактериофагов Феликса д'Эрелля, приют для больных СПИДом в Монреале носит его имя [67].

В связи со 100-летием открытия д'Эрелля научная общественность проводит памятные конференции. Главным образом откликнулись во Франции (Институт Пастера). Кстати, Пастеровский институт и в 1947 году отмечал 30-летие открытия д'Эрелля, проведя конференцию «Бактериофаг в природе».

Публикации. Список работ Ф. д'Эрелля существует в разрозненном виде. Среди наиболее цитируемых — уже упоминавшиеся две первоначальные ключевые публикации 1917 и 1921 годов на французском языке и в переводах [35, 53, 58]. В англоязычном информационном пространстве чаще всего фигурируют две основополагающие книги:

- D'Herelle F. The Bacteriophage: Its Role in Immunity. — Williams and Wilkins Co./Waverly Press, Baltimore, 1922. — 287 p. [59].
- D'Herelle F. The Bacteriophage and Its Behavior. — Baltimore, MD: Williams & Wilkins, 1926. — 629 p. [60].

Упоминаются еще две его книги: «Защита организма» (1923) [56] и «Феномен выздоровления от инфекционных болезней» (1938) [55].

Считается, что он является автором 113 статей и 5 книг по бактериофагам. В его книге 1935 года [13], переведенной на русский язык, приведено около 30 его работ. Учитывая разбросанность отдельных печатных работ ученого и отсутствие обобщающих (и особенно полных) списков, авторы настоящей статьи постарались провести некоторую их систематизацию и сформировать по возможности более полную библиографию его трудов с акцентом на наиболее значимые (см. Приложение).

Биографическая литература довольно обширно представлена в печатных изданиях и Интернет-источниках, хотя большей частью она носит справочно-информационный характер. Не хватает работ аналитического плана. Ясно, что по «Эроусмиту» изучать жизнеописание

ученого недостаточно, и поэтому исследователям жизни и творчества д'Эрелля приходится прорабатывать большой объем чисто информационного материала. Пока редкое исключение из массива литературы об ученом представляет обстоятельная книга В. Саммерса (Summers W.C. Felix d'Herelle and the Origins of Molecular Biology. — New Haven and London, Yale University Press, New Haven, CT, 1999. — 230 p. [94].

Ученые ранга д'Эрелля часто оставляют автобиографии, которые помогают выстраивать достоверную линию жизни. В случае отсутствия таковой остается простор для неоднозначностей, неточностей и мифотворчества. Особенно молодые годы д'Эрелля с его путешествиями, приключениями и перемещениями по разным континентам открывают такую возможность. Известно, что он оставил после себя воспоминания. Его автобиографические записки «Les pérégrinations d'un microbiologiste. 1940–1945» («Странствия микробиолога») [57] лежат в виде рукописи уже 75 лет, а жаль. Они пригодились бы при воспроизведении информации для новых поколений исследователей или хотя бы стали авторской переработкой и продолжением романа «Эроусмит», которым в свое время зачитывались тысячи молодых людей, желающих вступить в науку. Правда, отрывки из указанной рукописи напечатаны в книге Haessler T. «Viruses versus superbugs — A solution to the antibiotics crisis?» (2006) [70].

Закключение. Данный раздел в случае анализа такой сложной личности, как д'Эрелль, нельзя сводить к традиционным нескольким резюмирующим фразам. Потребуется дать некоторые обобщения, дополнения и пояснения. Юбилейная дата ключевой публикации столь экстраординарного первооткрывателя дает формальный повод для этого, чтобы определить главные предметные и личностные направления его развития. В историческом образе д'Эрелля много нестандартного, иногда парадоксального, непредсказуемого, порой «авантюрного», что требует большого такта и осторожности при составлении его биографии. В настоящем сообщении делается такая попытка собрать воедино разные аспекты его жизни и деятельности, по возможности избежав субъективизма или использования непроверенной информации.

Выдающаяся роль главным образом д'Эрелля и отчасти Туорта (а также их предшественников Хэнкина и Гамалеи) состояла в том, что они в канун и в начале XX века обратили внимание человечества (фактически в нужное время и в нужном месте) на существование находящихся за пределами разрешения приборов тех лет живых, размножающихся, лизирующих ультраструктур (фильтрующихся вирусов), выполняющих важную функ-

цию поддержания равновесия биоценозов на уровне бактериальной микрофлоры. Понадобилось еще не менее 50 лет, чтобы эти существа (их называли бактериофагами или просто фагами) заняли прочную нишу в теоретической и практической биологии и, соответственно, в медицине и сельском хозяйстве. Для этого в среде специалистов должен был пройти период дискуссий, борьбы, сомнений, обоснования экономической целесообразности и т.д., чтобы истина воспринималась как должное и не нуждалась в постоянных доказательствах.

Помимо первооткрывателей, о которых так подробно говорилось в данной статье, много замечательных имен должно быть названо в обсуждаемом контексте применительно к разработке вопросов теории. Прежде всего, нужно отметить научный подвиг «фаговой группы» в составе Нобелевских лауреатов Макса Дельбрюка, Сальвадора Луриа, Алфреда Херши (о них уже упоминалось), заложивших теоретические основы «фагологии» и вместе с тем всей молекулярной биологии. Между прочим, один из лидеров изучения фагов в 1940-е годы Макс Дельбрюк придерживался взгляда д'Эрелля на биологическую (а не аутолитическую, чисто химическую, ферментативную) функцию бактериофага [47, 63]. Конечно, нельзя пройти мимо изящного остроумия «французской группы» (если можно так выразиться) в лице тоже Нобелевских лауреатов Андре Львова, Франсуа Жакоба и Жака Моно, также действовавших в пандан с ведущими первопроходцами в изучении фагов и представивших уникальные данные о лизогении и регуляции генной активности [9, 23]. Работали с фагами и другие знаковые фигуры молекулярной биологии: Дж. Ледерберг; А. Корнберг; Ф. Сенгер [7]; П. Берг и др. Многие известные микробиологи и иммунологи прошлого также не обходили вниманием проблему бактериофагии: Ж. Борде; К. Круз; А. Флеминг; К. Левадити; К. Пранусниц; Ф. Бернет [38]; М. Шлезингер и др. Среди лиц, специально изучавших бактериофаги, следует отметить Дж. Бронфенбреннера [36]; И. Ашешова; П.К. Флу; Э. Вольмана и Э. Вольмана (старшего); А. Грация [69]; В.Дж. МакНила и др. Современные исследователи этой тематики представляют собой как коллективы и группы, так и отдельных ученых. Среди них есть ряд специалистов с большим опытом и авторитетом (Слопек С.; Куттер Э. [75–77]; Аккерман Г.-В. [29]; Сулаквелидзе А. [92]; Чанишвили Н. [41–44]; Красильников И.В. [21] и др.). Высокопрофессиональную нишу в рассматриваемой теме занимают исторические исследования Саммерса У., представителя Йельского университета (о нем уже говорилось), где трудился д'Эрелль в 1920–1930-е годы [93–97].

Самостоятельным блоком в проблеме бактериофагов является фаготерапия как сфера их практического использования. Метод фаготерапии, берущий начало от д'Эрелля, пережил за 100 лет различные фазы востребованности — от восторженного одобрения до полного неприятия. Причем, это время от времени отмечалось как в Европе, так и США. Существенную конкуренцию ей составила антибиотикотерапия, однако проблема устойчивости к ним периодически возвращает врачебное сообщество к бактериофагам. Этот вопрос очень сложный и неоднозначный и требует отдельного глубокого рассмотрения [40, 70, 93, 97]. При общем анализе тенденций на Западе надо констатировать, что ряд исследователей наиболее остро осознал, что там исторически произошла долговременная недооценка фаготерапии (Kutter E.) [76, 77]. Отрицательную роль сыграла критическая экспертиза Eaton M.D. а. Wayne-Jones S. (1934) [61]. А в науке это не проходит бесследно, причем, всегда в отрицательную сторону, как, например, это случилось в СССР с генетикой, психологией, учением Фрейда, кибернетикой и т.д. Так что сейчас в западной литературе отмечается реанимация интереса к клиническому применению бактериофагов.

Наоборот, наиболее последовательную позицию по отношению к бактериофагам как лечебно-профилактическому средству всегда занимали отечественные специалисты советского и постсоветского периодов. Фактически СССР всегда лидировал в области производства и применения лечебно-профилактических бактериофагов, а Российская Федерация преемственно продолжила эту традицию, восходящую к основополагающей созидательной миссии д'Эрелля на территории Советского Союза [14, 15, 18, 22]. Надо указать на то, что при анализе некоторыми западными исследователями развития фаготерапии в СССР и конкретно — в Грузии часто акцент ставится на негатив: Сталина, Берию, любовную интригу, «Советский позор», репрессии и т.д., и поэтому нередко происходит отход от рассмотрения по существу вопроса о применении фаготерапии в Советском Союзе. Сказывается, по-видимому, сложившееся у западных ученых-биологов стереотипное представление о советской науке и ее правопреемнице российской науке как о поле для восхваления псевдоидеи Лысенко, фабрикация дела Роскина — Ключевой и т.д. — все это почти вошло в их «генетическую» память. Кроме того, зарубежные ученые, признавая несомненные достижения советских исследователей в клиническом применении фагов, никогда не прерывавших своих работ, иногда указывают на их недостаточную доказательную базу и отсутствие

контролируемых экспериментов. Часть западных авторов ссылается на языковой барьер и недоступность информации на русском языке.

Что касается содержания работ в России, то особенно эффективной следует признать деятельность НПО «Микроген» и его филиалов в Уфе, Перми и Нижнем Новгороде. В настоящее время в РФ и странах СНГ препараты бактериофагов используются для лечения и профилактики таких заболеваний, как инфекции желудочно-кишечного тракта, урогенитальные инфекции, ожоговые раны, гнойно-воспалительные заболевания, хирургические и внутригоспитальные инфекции и др. [17, 21]. Ведущие эпидемиологи страны уделяют проблеме бактериофагов должное внимание (Покровский В.И. и др.) [2].

В рамках юбилейной статьи целесообразно отметить вообще вклад отечественных ученых советского периода (кроме уже рассмотренных тбилисских), которые продвигали тему бактериофагов. Одним из научных центров, проводивших разработку теории, методологии и практики бактериофагии, является Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени академика И.Н. Блохиной. Именно под руководством И.Н. Блохиной, возглавлявшей почти полвека этот институт (1955–1999), тема бактериофагов была всегда в числе приоритетов [3, 5]. Она вписывалась в главное направление деятельности данного учреждения — оптимизация микрофлоры организма, результаты которой высоко ценятся и востребованы на региональном и федеральном уровнях. Научная база института создала предпосылки для успешного функционирования Нижегородского предприятия по производству бактериальных препаратов «ИмБио», производящего бактериофаги. Аналогичными производителями являются НПО «Иммунопрепарат» (Уфа), МП «Биофон» (Саратов), НПО «Биомед» (Пермь). Их продукция выпускается в жидком виде, в таблетках, мазях и других формах. Идет разработка новых препаратов, например, против энтеробактерий, серраций и др. В целом можно считать, что рассматриваемое научно-практическое направление в нашей стране преимущественно развивается. Это дает возможность обеспечивать потребность здравоохранения и других отраслей (ветеринария и др.) современными лечебно-профилактическими бактериофагами, представляющими собой комплекс поликлональных, высоковирулентных бактериальных вирусов, специально подобранных против наиболее распространенных групп возбудителей инфекционных заболеваний.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Библиография трудов Ф. д'Эрелля (неполная)

1901

1. *D'Herelle F.* De la formation du carbone par les végétaux // *Le Naturaliste canadien.* — 1901.

1911

2. *D'Herelle F.* Sur une épizootie de nature bactérienne sévissant sur les sauterelles au Mexique // *Compt. Rend. Soc. Sci.* — 1911. — Т. 152. — Р. 1413–1415.

1912

3. *D'Herelle F.* Sur la propagation, dans la République Argentine, de l'épizootie des sauterelles du Mexique // *Compt. Rend. Soc. Sci.* — 1912. — Т. 154. — Р. 623–625.

1914

4. *D'Herelle F.* Le Coccobacille des Sauterelles // *Ann. Institut Pasteur.* — 1914. — Т. 28. — Р. 280.

1915

5. *D'Herelle F.* La campagne contre les sauterelles en Tunisie en 1915 // *Bulletin de la Société de Pathologie exotique.* — 1915. — Т. 8. — Р. 629–633.

1916

6. *D'Herelle F.* Contribution à l'étude de la dysenterie. Nouveaux bacillus dysentériques, pathogènes pour les animaux d'expérience // *Bulletin de l'Académie de Médecine.* — 1916. — Т. 76. — Р. 425–428.
7. *D'Herelle F.* Sur un bacille dysentérique atypique // *Ann. Inst. Pasteur.* — 1916. — Т. 30. — Р. 145–147.

1917

8. *D'Herelle F.* Sur un microbe invisible antagoniste du bacille dysentérique // *C. R. Acad. Sci. (Paris).* — 1917. — Т. 165. — Р. 373–375.

1918

9. *D'Herelle F.* Sur le rôle du microbe filtrant bactériophage dans la dysenterie bacillaire // *Compt. Rend. Acad. Sci.* — 1918. — Т. 167. — Р. 970–972.
10. *D'Herelle F.* Technique de la recherche du microbe filtrant bactériophage (*Bacteriophagum intestinale*) // *Compt. Rend. Soc. Biol.* — 1918. — Т. 81. — Р. 1160–1162.

1919

11. *D'Herelle F.* Du rôle du microbe filtrant bactériophage dans dysenterie bacillaire // *Compt. Rend. Acad. Sci.* — 1919. — Т. 168. — Р. 631.

12. *D'Herelle F.* Sur une épizootie de typhose aviaire // *Compt. Rend. Acad. Sci.* — 1919. — Т. 169. — P. 817.
13. *D'Herelle F.* Sur le rôle du microbe bactériophage dans la typhose aviaire // *Compt. Rend. Acad. Sci.* — 1919. — Т. 168. — P. 932.
14. *D'Herelle F.* Sur le microbe bactériophage // *Compt. Rend. Acad. Biologie.* — 1919. — Т. 82. — P. 1237.
- 1920**
15. *D'Herelle F.* Sur la résistance des bactéries à l'action du bactériophage // *Compt. Rend. Soc. Biol.* — 1920. — Т. 83. — P. 97.
16. *D'Herelle F.* Le processus de défense contre les bacilles intestinaux et l'étiologie des maladies intestinales // *Compt. Rend. Acad. Sci.* — 1920. — Т. 170. — P. 72.
17. *D'Herelle F.* Sur le microbe bactériophage // *Compt. Rend. Soc. Biol.* — 1920. — Т. 83. — P. 247.
18. *D'Herelle F.* Sur le microbe bactériophage // *Compt. Rend. Soc. Biol.* — 1920. — Т. 83. — P. 1318.
19. *D'Herelle F.* Sur la nature du principe bactériophage // *Compt. Rend. Soc. Biol.* — 1920. — Т. 83. — P. 1320.
20. *D'Herelle F.* Sur le principe bactériophage de d'Herelle // *Compt. Rend. Soc. Biol.* — 1920. — Т. 83. — P. 1322.
- 1921**
21. *D'Herelle F.* Le bactériophage // *La Nature (Paris).* — 1921. — Т. 49. — P. 219–222.
22. *D'Herelle F.* Le bactériophage: son rôle dans l'immunité // *La Presse Médicale.* — 1921, 11 juin. — Т. 29. — P. 463.
23. *D'Herelle F.* Le bactériophage: Son rôle dans l'immunité. — Paris: Masson et Cie, 1921. — 227 p. (Книга вышла в серии «Les Monographies de l'Institut Pasteur»; переведена на английский, немецкий, голландский и русский языки).
24. *D'Herelle F.* Le microbe bactériophage, agent d'immunité dans la peste et la barbone // *C. R. Acad. Sci. Ser. D.* — 1921. — Т. 172. — P. 99.
25. *D'Herelle F.* Phénomènes coincident avec l'acquisition de la résistance des bactéries à l'action du bactériophage // *Compt. Rend. Soc. Biol.* — 1921. — Т. 84. — P. 382.
26. *D'Herelle F.* Rôle du bactériophage dans l'immunité // *Compt. Rend. Soc. Biol.* — 1921. — Т. 84. — P. 538.
27. *D'Herelle F.* Sur la nature du bactériophage (Bacteriophagum intestinale de d'Herelle, 1918) // *Compt. Rend. Soc. Biol.* — 1921. — Т. 84. — P. 339.
28. *D'Herelle F.* Sur l'histoire du bactériophage // *Compt. Rend. Soc. Biol.* — 1921. — Т. 84. — P. 863.
29. *D'Herelle F.* Sur la nature du bactériophage // *Compt. Rend. Soc. Biol.* — 1921. — Т. 84. — P. 908.
30. *D'Herelle F. et Eliava G.* Sur le serum antibactériophage // *C. R. Soc. Biol.* — 1921. — Т. 84. — P. 719–721.
31. *D'Herelle F. et Eliava G.* Sur la lysine du Bactériophage // *C. R. Soc. Biol.* — 1921. — Т. 85. — P. 701–702.
32. *D'Herelle F.* The nature of bacteriophage // *British Medical Journal.* — 1921. — Vol. 2. — P. 289–293.
33. *D'Herelle F., LeLouet G.* Sur la vaccination antibarbone par virus atténué // *C. R. Soc. Biol.* — 1921. — Т. 85. — P. 1011–1013.
- 1922**
34. *D'Herelle F.* The Bacteriophage: Its Role in Immunity. — Williams and Wilkins Co./Waverly Press, Baltimore, 1922. — 287 p.
35. *D'Herelle F.* Der Bakteriophage und seine Bedeutung fuer die Immunitaet; nach einem erweiterten und verbesserten. — F. Vieweg & Sohn, Braunschweig, 1922.
36. *D'Herelle F.* Sur les anti-lysines d'origine bactérienne // *Compt. Rend. Soc. Biol.* — 1922. — Т. 86. — P. 360.
37. *D'Herelle F., Twort F.W., Bordet J. and Gratia A.* Discussion on the Bacteriophage (Bacteriolysin) from the Ninetieth Annual Meeting of the British Medical Association, Glasgo, July, 1922 // *British Medical Journal.* — 1922. — Vol. 2. — P. 289–297 (Reproduced in: Stent G. Papers on Bacterial Viruses. Second edition. — Little, Brown and Co., Boston, 1965).
- 1923**
38. *D'Herelle F.* Sur l'autonomie du bactériophage // *Compt. Rend. Soc. Biol.* — 1923. — Т. 87. — P. 25.
39. *D'Herelle F.* Sur l'état physique du bactériophage // *Compt. Rend. Soc. Biol.* — 1923. — Т. 87. — P. 27.
40. *D'Herelle F.* Les défenses de l'organisme. — Paris: E. Flammarion, 1923. — 229 p.

41. *D'Herelle F.* Sur la présence du bactériophage dans les leucocytes // *Compt. Rend. Soc. Biol.* — 1923. — Т. 87. — Р. 477.

42. *D'Herelle F.* Le Bactériophage // *Revue de pathologie comparée.* — 1923. — Т. 23. — Р. 11.

1924

43. *D'Herelle F.* Drie Voordrachten over het Verschijnsel der Bacteriophagie. — J.B. Groningen, 1924.

44. *D'Herelle F.* Immunity in Natural Infectious Disease. Transl. by G.H. Smith. — Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1924. — 399 p.

1925

45. *D'Herelle F.* Essai de la traitement de la peste bubonique par le bactériophage // *Presse Med.* — 1925. — Т. 33. — Р. 1393–1394.

46. *D'Herelle F.* Les Ultra-Virus // *Nederl. Maandsch. v. Geneek.* Leiden. — 1925. — Vol. 13. — Р. 69.

47. *D'Herelle F.* Le traitement de la Peste bubonique // *La Presse Médicale.* — 1925. — Р. 1393.

1926

48. *D'Herelle F.* Sur la théorie de l'autolyse transmissible de Bordet et Ciuca // *Compt. Rend. Soc. Biol.* — 1926. — Т. 94. — Р. 973.

49. *D'Herelle F.* The Bacteriophage and Its Behavior. Transl. by G.H. Smith. — Baltimore, MD: Williams & Wilkins, 1926. — 629 p.

50. *D'Herelle F.* Le bactériophage et son comportement. — Paris: Masson et Cie, 1926. — 560 p. (translated in English, published by Williams & Wilkins, Baltimore).

1927

51. *D'Herelle F., Maloine R.H.* A preliminary report of work carried out by the cholera bacteriophage enquiry // *Ind. Med. Gaz.* — 1927. — Vol. 62. — Р. 614.

52. *D'Herelle F. & Malone.* Treatment of cholera with bacteriophage // *Indian Medical Qazette.* Calcutta, — 1927 November 11.

1928

53. *D'Herelle F.* Le Cholera asiatique. — Masson, 1928.

1929

54. *D'Herelle F., Malone & Lahiri.* Etudes sur le cholera. — Conseil Sanitaire, Maritime et Quarantenaire d'Egypte. Impr. A. Serafini, Alexandrie, 1929. — 192 p.

1930

55. *D'Herelle F.* The Bacteriophage and its Clinical Applications. Transl. by G.H. Smith. — Charles C. Thomas, Publisher, Springfield, Mass., Illinois, 1930. — 254 p.

56. *D'Herelle F., Malone R.H., Lahiri M.* Studies on Asiatic cholera // *Indian Med. Res. Mem.* — 1930. — Vol. 14. — Р. 1–161.

57. *D'Herelle F.* The Carrier Problem // *Yale Journal of Biology and Medicine.* — 1930 October. — Р. 21.

1931

58. *D'Herelle F.* Le phénomène de Twort et la bactériophagie // *Ann. Inst. Pasteur.* — 1931. — Т. 47. — Р. 241 [Т. 46. — Р. 618].

59. *D'Herelle F.* Bacteriophage as a treatment in acute medical and surgical infections // *Bull. New York Academy of Medicine.* — 1931. — Vol. 7. — Р. 329.

60. *D'Herelle F.* Bacterial mutations // *Yale Journal of Biology and Medicine.* — 1931. — Vol. 4. — Р. 55.

1932

61. *D'Herelle F.* Prophylaxie collective du cholera par le bactériophage / *Congres internat. d'Hygiène méditerranéenne.* — Marseille, 1932. — Т. 1. — Р. 485.

62. *D'Herelle F. & Beecroft R.* Bacterial mutations // *Journ. Lab. and Clinical Medicine.* — 1932. — Vol. 17. — Р. 667.

1933

63. *D'Herelle F.* Le Bactériophage et ses applications thérapeutiques // *La Pratique Médicale Illustrée.* — Paris, G. Doin & Cie, 1933. — 30 p.

64. *D'Herelle F.* Le Bactériophage dans ses relations avec l'immunité. — Convegno Volta, Rome, 1933.

65. *D'Herelle F. & Pakietien M.* The susceptibility of hemolytic Staphylococci to Bacteriophage // *J. of American Medical Association.* — 1933. — Vol. 100. — Р. 1014.

1934

66. *D'Herelle F. & Rakieten T.L.* Mutations as governing bacterial characters and serological reactions // *Journal of Infectious Diseases.* — 1934. — Vol. 54(3). — Р. 313–338.

1935

67. Д'Эрелль Ф. Бактериофаг и феномен выздоровления. Пер. с франц. — Тифлис: Издательство Тифлисского государственного университета, 1935. — 262 с.

1936

68. D'Herelle F. Le bactériophage dans ses relations avec l'immunité. Le bactériophage. Applications thérapeutiques // La médecine. — 1936. — Т. 17(Suppl. 2). — Р. 11–20.

69. D'Herelle F. Traitement et prophylaxie par le bactériophage des maladies épidémiques de nature bactérienne. Le bactériophage. Applications thérapeutiques // La médecine. — 1936. — Т. 17(Suppl. 2). — Р. 23–32.

1938

70. D'Herelle F. Le phénomène de la guérison des maladies infectieuses. — Paris: Masson et Cie, 1938.

1940

71. D'Herelle F. Les pérégrinations d'un microbiologiste. 1940–1945. — Paris (non publiée). — 800 р.

72. D'Herelle F. The value of experiment. — Paris, 1940–1945.

1946

73. D'Herelle F. L'étude d'une maladie. Le cholera. — Lausanne, 1946.

1948

74. D'Herelle F. Le bactériophage // Atoms. — 1948. — Т. 3. — Р. 339–403.

1949

75. D'Herelle F. The bacteriophage // Science News (Penguin). — 1949. — Vol. 14. — Р. 44–59.

2011

76. On an invisible microbe antagonistic to dysentery bacilli. Note by M.F. d'Herelle, presented by M. Roux. Comptes Rendus Académie des Sciences 1917; 165: 373–375 [Transl. by Hans-W. Ackermann] // Bacteriophage. — 2011. — Vol. 1(1). — Р. 3–5. DOI:10.4161/bact.1.1.14941. [Электронный ресурс]: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/bact.1.1.14941>. См. также: <https://archive.org/details/MilestonesInMicrobiology>. Appendix. — Р. 273–274.

Кроме того, у д'Эрелля есть совместные публикации со следующими авторами: Géry L., Hauduroy P., Eliava G.,

Lahire M., Le Louet G., Malone R., Peyre E., Pozerski E., Beecroft R., Seidelin H., Sertic V., Rakiétien M.

Литература

1. Акимкин В.Г., Дарбеева О.С., Колков В.Ф. Бактериофаги: исторические и современные аспекты их применения: опыт и перспективы // Клиническая практика. — 2010. — № 4. — С. 48–54.
2. Акимкин В.Г., Покровский В.И. Нозокомиальный сальмонеллез взрослых. — М.: Издательство РАМН, 2002. — 136 с.
3. Антибиотики или бактериофаги? [Бактериофаги в нашей жизни] [Электронный ресурс] https://vk.com/topic-20052178_23539428.
4. Бактериофаг [Электронный ресурс] <https://ru.wikipedia.org/wiki/Bacteriophage>.
5. Блохина И.Н., Голубева С.А. Производство вакцин, бактериофагов и препаратов, нормализующих микрофлору человека // В кн. Промышленная микробиология: Учеб. пособие для вузов по спец. «Микробиология» и «Биология» / Э.А. Аркадьева, А.М. Безбородов, И.Н. Блохина и др. Под ред. Н.С. Егорова. — М.: Высш. шк., 1989. — 688 с. — Глава 29. — С. 570.
6. Воробьева О.В. К 100-летию со дня рождения Алфреда Херши, одного из основателей молекулярной биологии // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2008. — Т. 4. — № 3. — С. 64–68.
7. Воробьев В.С. Двойной нобелевский триумф Фредерика Сенгера: к 90-летию со дня рождения ученого // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2008. — Т. 4. — № 3. — С. 54–63.
8. Воробьев В.С. К 100-летию со дня рождения выдающегося молекулярного биолога Сальвадора Луриа // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2012. — Т. 8. — № 3. — С. 65–73.
9. Воробьев В.С. К 100-летию со дня рождения выдающегося французского молекулярного биолога Жака Моно // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2010. — Т. 6. — № 1. — С. 65–69.
10. Воробьев В.С. Макс Дельбрюк — путь от физики к биологии: к 100-летию со дня рождения и 25-летию со дня смерти // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2006. — Т. 2. — № 3. — С. 68–77.
11. Гамалея Н.Ф. Бактериальные лизины: ферменты, разрушающие бактерии // Русский архив патологии и клинической медицины. — 1898. — № 6. — С. 607–613.
12. Д'Эрелль Ф. [Электронный ресурс] https://ru.wikipedia.org/wiki/Д'Эрелль_Феликс.

13. Д'Эрелль Ф. Бактериофаг и феномен выздоровления. Пер. с франц. — Тифлис: Издательство Тифлисского государственного университета, 1935. — 262 с.
14. Д'Эрелль Ф. БМЭ. 3-е изд. — 1977. — Т. 7. — С. 538.
15. Ермольева В.В. О бактериофаге и его применении // Ж. микробиол., эпидемиол., иммунол. — 1939. — № 9. — С. 9–17.
16. Захаренко С.М. Бактериофаги: современные аспекты применения, перспективы на будущее [Электронный ресурс] <http://www.remedium.ru/drugs/detail.php?ID=64539>.
17. Зурабов А.Ю., Каркищенко Н.Н., Попов Д.Н. и др. Создание отечественной коллекции бактериофагов и принципы разработки лечебно-профилактических фаговых препаратов // Биомедицина. — 2012. — Т. 1. — № 1. — С. 134–138.
18. Изменчивость микроорганизмов и бактериофагия / Под ред. В.Д. Тимакова. — М., 1960.
19. История открытия бактериофагов [Электронный ресурс] <https://www.studfiles.ru>.
20. Кокин Г.А. Фаготерапия и фагопрофилактика при газовой гангрене / В книге: «Опыт советской военной медицины в Великой Отечественной войне 1941–1945». Т. 3. — М.: Медгиз, 1946. — С. 56–63.
21. Красильников И.В., Лобастова А.Л., Лыско К.А. Краткий обзор современного состояния и перспективных направлений развития производства и применения лечебно-профилактических препаратов бактериофагов // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2010. — Т. 6. — № 2. — С. 28–33.
22. Крестовникова В.А. Фаготерапия и фагопрофилактика и их обоснование в работах советских исследователей // Ж. микробиол. — 1947. — № 11. — С. 56–65.
23. Лизогения и ее биологическое значение [Электронный ресурс] <http://infopedia.su/8ха512.html>.
24. Льюис С. Эроусмит. — М.: Гос. изд-во худ. лит-ры, 1956. — 520 с.
25. Моруа А. Жизнь Александра Флеминга. — М.: «Молодая гвардия», 1964. — 336 с. — Серия «ЖЗЛ».
26. Под знаком бактериофага: Париж — Тбилиси // Наука из первых рук: 26 Окт 2016 / Бактериофаги: враги наших врагов. — Т. 70. — № 4 [Электронный ресурс] <https://scfh.ru/papers/pod-znakom-bakteriofaga-parizh-tbilisi/>.
27. Фаговая терапия: бактериофаги как антибиотики (обзор литературы) / Кюттер Э. Перевод с англ. — СПб.: НИИ детских инфекций, 2001. — 41 с.
28. Элиава Г.Г. [Электронный ресурс] https://ru.wikipedia.org/wiki/Элиава,_Георгий_Григорьевич.
29. Ackermann H.-W. D'Herelle F. Découvreur des bactériophages // Med. Sci. — 1997. — Т. 8. — Р. 3–6.
30. Berger Savin M.Ch.E. La phagothérapie: historique et potentielle utilisation contre les infections à bactéries multirésistantes. Thèse pour le doctorat vétérinaire. — La faculté de médecine de Creteil, 2014. — 156 p.
31. Bordet J., Ciuca M. Remarques sur l'histoire des recherches concernant la lyse microbienne transmissible // Compt. Rend. Soc. Biol. — 1921. — Vol. 84. — Р. 745–747.
32. Bordet J. Croonian Lecture — Theories of bacteriophage // Proc. Roy. Soc. London. Ser. B. — 1931. — Vol. 107. — Р. 398–417.
33. Bordet J. La théorie de l'autolyse transmissible et les objections de l'Herelle // Compt. Rend. Soc. Biol. — 1924. — Т. 90. — Р. 86–98.
34. Bourne Sh. Phage as an antimicrobial agent: d'Herelle's heretical theories and their role in the decline of phage prophylaxis in the West // Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol. — 2007. — Vol. 18(1). — Р. 19–26.
35. Brock T.D. Milestones in Microbiology. — Prentice-Hall International Inc., 1961. — Р. 157–159. См. также: Full text of «Milestones in Microbiology» — Internet Archive [Электронный ресурс] <https://archive.org/details/MilestonesInMicrobiology.Appendix>. — Р. 273–274.
36. Bronfenbrenner J.J., and Korb Ch. Studies on the bacteriophage of d'Herelle. I. Is the lytic principle volatile? // J. Exp. Med. — 1925. — Vol. 41(1). — Р. 73–79.
37. Bruynoghe R., Maisin J. Essais de thérapeutique au moyen du bactériophage du staphylocoque // C. R. Soc. Biol. — 1921. — Vol. 85. — Р. 1120–1121.
38. Burnet F. Recent work on the biological nature of bacteriophages // Trans. Royal Soc. of Trop. Med. and Hyg. — 1933. — Vol. 26. — Р. 409–416.
39. Cairns G., Stent G. and J. Watson (eds.). Phage and the Origins of Molecular Biology. — Cold Spring Harbor Laboratory Press, CSH, Long Island, N.Y., 1966. — 340 p. (переиздано в 2000 и 2006 гг.).
40. Carlton R.M. Phage therapy: Past history and future prospects // Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis. — 1999. — Vol. 47. — Р. 267–274.
41. Chanishvili N. A Literature Review of the Practical Application of Bacteriophage Research. — Nova Publishers, NY, USA, 2012.
42. Chanishvili N. Bacteriophages as therapeutic and prophylactic means: Summary of the Soviet and post Soviet experiences // Curr. Drug Deliv. — 2016. — Vol. 13(3). — Р. 309–323.
43. Chanishvili N. Phage therapy — history from Twort and d'Herelle through Soviet experience to current approaches // Advances in Virus Research. — 2012. — Vol. 83. — Р. 3–40.
44. Chanishvili N. et al. Phages and their application against drug-resistant bacteria // J. Chem. Technol. Biotechnol. — 2001. — Vol. 76(7). — Р. 689–699.
45. Cisek A.A. et al. Phage therapy in bacterial infections treatment: One hundred years after the discovery of bacteriophages // Curr. Microbiol. — 2017. — Vol. 74(2). — Р. 277–283.
46. Criscuolo E., Spadini S. et al. Bacteriophages and their immunological applications against infections threats // J.

- Immunol. Res. — 2017. — Vol. 2017, Article ID 3780697, 13 pages. <https://doi.org/10.1155/2017/3780697>.
47. *Delbrueck M.* Bacterial viruses or bacteriophages // *Biol. Rev.* — 1946. — Vol. 21. — P. 30–40.
48. *Dennehy J.* The Evolutionary Biologist: The Week's Citation Classic. — 2007. June 8. [Электронный ресурс] <http://evolutionarybiologist.blogspot.ru/2007/06/this-weeks-citation-classic.html>.
49. *Dublanchet A.* La vraie vie de Felix d'Herelle avant la découverte du bactériophage // Association des anciens élèves de l'Institut Pasteur. — 2003. — No. 175. — P. 80–82.
50. *Duckworth D.H.* Who discovered bacteriophage? // *Bacteriol. Rev.* — 1976. — Vol. 40. — P. 793–802.
51. *D'Herelle F. et Eliava G.* Unicité du bactérie sur la lysine du bactériophage // *C. R. Soc. Biol.* — 1921. — T. 85. — P. 701–702.
52. *D'Herelle F.* La campagne contre les sauterelles en Tunisie en 1915 // *Bulletin de la Societe de Pathologie exotique.* — 1915. — T. 8. — P. 629–633.
53. *D'Herelle F.* Le bactériophage: Son rôle dans l'immunité. — Paris: Masson et Cie, 1921. — 227 p.
54. *D'Herelle F.* Le bactériophage et son comportement. — Paris et Cie, 1926.
55. *D'Herelle F.* Le phénomène de la guérison des maladies infectieuses. — Paris: Masson et Cie, 1938.
56. *D'Herelle F.* Les défenses de l'organisme. — Paris: E. Flammarion, 1923.
57. *D'Herelle F.* Les pérégrinations d'un microbiologiste. 1941–1945. — Paris (non publiée).
58. *D'Herelle F.* Sur un microbe invisible antagoniste du bacille dysentérique // *C. R. Acad. Sci. (Paris).* — 1917. — T. 165. — P. 373–375.
59. *D'Herelle F.* The Bacteriophage: Its Role in Immunity. — Williams and Wilkins Co./Waverly Press, Baltimore, 1922. — 287 p.
60. *D'Herelle F.* The Bacteriophage and Its Behavior. — Baltimore, MD: Williams & Wilkins, 1926. — 629 p.
61. *Eaton M.D. and Bayne-Jones S.* Bacteriophage therapy: Review of the principles and results of the use of bacteriophage in the treatment of infections // *JAMA.* — 1934. — Vol. 103. — P. 1769–1776, 1847–1853 and 1934–1939.
62. *Eliava G. et Pozerski E.* Sur les caractères nouveaux présentés par le Bacille de Shiga ayant résisté à l'action du bactériophage de d'Herelle // *Compt. Rend. Soc. Biol.* — 1921. — T. 84. — P. 708–710.
63. *Ellis E.L., Delbrueck M.* The growth of bacteriophage // *J. Gen. Physiol.* — 1939. — Vol. 22. — P. 365–384.
64. Félix d'Herelle (1873–1949). Biographie. Archives de l'Institut Pasteur [Электронный ресурс] <https://webext.pasteur.fr/archives/her0.html>.
65. Felix d'Herelle, the discovery of bacteriophages, and phage therapy / Leonard Norkin Virology Site [Электронный ресурс] <https://norkinvirology.wordpress.com/2015/05/20/felix-dherelle-the-discovery-of-bacteriophages-and-phage-therapy>.
66. Felix d'Herelle [Электронный ресурс] http://en.citizendium.org/wiki/Félix_d%27Hérelle.
67. Félix Haerens d'Hérelle. Patrimoine Beauceville [Электронный ресурс] <http://www.patrimoine-beauceville.ca/felix-haerens-d-herelle.+>
68. *Fischer E.P., Lipson C.* Thinking About Science: Max Delbrück and the Origins of Molecular Biology. — W.W. Norton & Co Inc., 1988. — 334 p.
69. *Gratia A.* Studies on the d'Herelle phenomenon // *J. Exp. Med.* — 1921. — Vol. 34(1). — P. 115–126.
70. *Häusler T.* Viruses versus superbugs — A solution to the antibiotics crisis? — Palgrave Macmillan, UK, 2006. — XIV, 298 p.
71. *Hankin M.E.* L'action bactéricide des eaux de la Jumna et du Gange sur le microbe [д'Эрелль в книге 1921 г. приводит «vibron»] du cholera // *Ann. Inst. Pasteur.* — 1896. — T. 10. — No. 9. — P. 511–523.
72. *Himmelweit F.* Combined action of penicillin and bacteriophage on Staphylococci // *Lancet.* — 1945. — Vol. 246(6361). — P. 104–105.
73. <http://www.pasteur.fr/ip/portal/action/WebdriveActionEvent/oid/01s-00002q-016>.
74. <https://www.nobelprize.org/nomination/archive/list.php> (Nobel Prize in Physiology or Medicine).
75. *Kutter E., Sulakvelidze A. (eds.).* Bacteriophages: Biology and Applications: Molecular Biology and Applications. — SRC Press, Boca Raton, Fla., 2005. — 528 p.
76. *Kutter E.M., Kuhl S.J., Abedon S.T.* Re-establishing a place for phage therapy in western medicine // *Future Microbiology.* — 2015. — Vol. 10(5). — P. 685–688.
77. *Kutter Elisabeth.* Phage Therapy: Bacteriophages as Antibiotics. — Evergreen State College, Olympia, WA 98505, 1997. [Электронный ресурс] <http://eric.langevin.free.fr/bibliop/evergree.htm>.
78. *Lépine P., Bonet-Maury P., Bulgakov N., Giuntini J.* Recherches sur la taille et la structure du bactériophage phi.X.174: ultracentrifugation // *C. R. Soc. Biol. Paris.* — 1944. — T. 138. — P. 728–729.
79. *Lépine P.* Félix d'Herelle (1873–1949) // *Ann. Institut Pasteur.* — 1949. — T. 76. — P. 457–460.
80. *Lewis Sinclair.* Arrowsmith. — New York: Harcourt Brace and Co., 1925.
81. *Luria S.E., and Anderson T.F.* The identification and characterization of bacteriophages with the electron microscope // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1942. — Vol. 28. — P. 127–130.
82. *Luria S.E., Delbrueck M., and Anderson T.F.* Electron microscope studies of bacterial virus // *J. Bacteriol.* — 1943. — Vol. 46. — P. 57–76.

83. MacNeal W.J., Filak L., Blevins A. Conjoined action of penicillin and bacteriophages // *J. Lab. Clin. Med.* – 1946. – Vol. 31. – P. 974–981.
84. Mueller H.J. Variation due to change in the individual gene // *The American Naturalist.* – 1922. – Vol. 56. – P. 48–49.
85. Nomination Database. Felix d’Herelle / «Nomination Database». Nobelprize.org. Nobel Media AB 2014. [Internet] http://www.nobelprize.org/nomination/archive/show_people.php?id=2649.
86. Nomination Database. Frederick W. Twort. «Nomination Database». Nobelprize.org. Nobel Media AB 2014. [Internet] http://www.nobelprize.org/nomination/archive/show_people.php?id=9414.
87. Norkin L.C. *Virology: Molecular Biology and Pathogenesis.* – ASM Press, Washington, D.C., 2010. – Chapter 1.
88. Phage therapy literature [Электронный ресурс] <http://www.bacteriophage-therapy.info/ECF40946-8E2F-4890-9CA6-D390A26E39C1/Phage%20therapy%20literature.html>.
89. Ruska H. Ueber die Sichtbarmachung der bakterio-phagen Lyse im Uebermikroskop // *Naturwissenschaften.* – 1940. – Bd. 28. – S. 45–46.
90. Shryver D.P. Felix d’Herelle in Russia // *Bull. Inst. Pasteur.* – 1996. – Vol. 94. – P. 91–96.
91. Stent G.S. *Molecular Biology of Bacterial Viruses.* – San Francisco and London: W.H. Freeman, 1963. – P. 8–9.
92. Sulakvelidze A., Alavidze Z., and Morris J.G., Jr. Bacteriophage therapy // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2001. – Vol. 45. – P. 649–659.
93. Summers W.C. Bacteriophage therapy // *Ann. Rev. Microbiol.* – 2001. – Vol. 55. – P. 437–451.
94. Summers W.C. *Felix d’Herelle and the Origins of Molecular Biology.* – New Haven and London, Yale University Press, New Haven, CT, 1999. – 230 p.
95. Summers W.C. Felix Hubert d’Herelle (1873–1949): History of a scientific mind // *Bacteriophage.* – 2016. – Vol. 6(4):e1270090. doi: 10.1080/21597081.2016.1270090. eCollection 2016.
96. Summers W.C. On the Origins of the Science in «Arrowsmith»: Paul de Kruit, Felix d’Herelle, and Phage // *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences.* – 1991. – Vol. 46(3). – P. 315–332.
97. Summers W.C. The strange history of phage therapy // *Bacteriophage.* – 2012. – Vol. 2(2). – P. 130–133.
98. Taylor M.W. The Discovery of Bacteriophage and the d’Herelle Controversy / In: *Viruses and Man: A History of Interactions*, 2014. – P. 53–61.
99. Twort F. [Электронный ресурс] https://en.wikipedia.org/wiki/Frederick_Twort.
100. Twort F.W. An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses // *The Lancet.* – 1915. – Vol. 186(4814). – P. 1241–1243.
101. Twort F.W. Filter-passing transmissible bacteriolytic agents (bacteriophage) // *The Lancet.* – 1930. – Vol. 216(5594). – P. 1064–1067.
102. Twort F.W. The bacteriophage; the breaking down of bacteria by associated filter passing lysins // *British Medical Journal.* – 1922. – Vol. 2. – P. 293–296.

TO THE 100TH ANNIVERSARY OF THE PUBLICATION OF THE FUNDAMENTAL WORK OF F. d’HERELLE ABOUT BACTERIOPHAGY

V.S. VOROBYEV, O.V. VOROBYEVA

Yu.A. Ovchinnikov Society of Biotechnologists of Russia, Moscow

On the occasion of the 100th anniversary of the discovery by F. d’Herelle of the phenomenon of bacteriophage, a historical analysis of his life and creativity was carried out. Particular attention is paid to the problem of the priority of the discovery of bacteriophage and the longstanding discussion that arose in this connection between F. d’Herelle and F. Twort and their supporters and opponents. The question of the direct influence of F. d’Herelle on the development of bacteriophage studies in the USSR and Russia is also considered.

Keywords: bacteriophage, history of discovery, history of microbiology, F. d’Herelle.

СОБЫТИЯ ПЕРВОЙ ПОЛОВИНЫ 2017 ГОДА

ПУБЛИКАЦИИ

Миронова Л.Н., Падкина М.В., Самбук Е.В. РНК. Синтез и функции. Учебное пособие / Ред. Инге-Вечтомов С.Г. — СПб.: Эко-Вектор, 2017. — 287 с.

Аннотация. Настоящее издание представляет собой учебное пособие, предназначенное для студентов и аспирантов, специализирующихся в области молекулярной биологии и генетики. В нем освещены проблемы, связанные с биогенезом и функциями одного из основных биологических полимеров — РНК. Неослабевающий интерес биологов к этому типу макромолекул обусловлен многообразием функций РНК, перечень которых продолжает расширяться. Совмещение способности к хранению и воспроизведению генетической информации с каталитическими и регуляторными способностями, наблюдаемое только у РНК, позволяет думать, что именно с этих молекул началась эволюция жизни на нашей планете. В книге подробно рассмотрены процессы синтеза и деградации РНК, известные к настоящему моменту свойства РНК, а также клеточные процессы, в которых молекулы РНК играют ту или иную роль.

Фаллер Дж.М., Шилдс Д. Молекулярная биология клетки. Руководство для врачей. — М.: БИНОМ, 2017. — 256 с.

Аннотация. Предлагаемая вниманию читателей книга американских специалистов посвящена изложению основ молекулярной биологии клетки. Особое внимание уделено строению клеточных мембран, внутриклеточных органелл, цитоскелета и митохондрий. Подробно рассматриваются процессы клеточного деления на молекулярном уровне и процессы межклеточного взаимодействия, механизмы межклеточной и внутриклеточной передачи сигнала. Достоинством книги является увязывание этих сведений с механизмами развития разнообразных врожденных, наследственных и приобретенных заболеваний и с современными методами их лечения. Книга предназначена для студентов медицинских институтов, аспирантов, научных работников и врачей-клиницистов разных специальностей.

Тейлор Д., Грин Н., Стаут У. Биология. В 3-х томах. — М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2017. — 1352 с.

Аннотация. Очередное (9-е) издание всемирно известного учебника, одного из самых полных и

авторитетных изданий по общей биологии, созданное ведущими учеными из разных стран. Содержание руководства отражает последние данные современной науки. Простота и удачное расположение материала делают его доступным для более широкого круга читателей. В первый том вошли темы, посвященные разнообразию форм живого на Земле, основам биохимии, гистологии, питанию и использованию энергии живыми организмами, экологии. Для студентов-биологов, преподавателей биологии в школе, абитуриентов и биологов всех специальностей.

Каплан И.Г. Межмолекулярные взаимодействия. Физическая интерпретация, компьютерные расчеты и модельные потенциалы. — М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2017. — 394 с.

Аннотация. Книга, написанная нашим соотечественником, профессором Автономного национального университета Мехико, содержит описание взаимодействий между молекулами на больших, средних и малых расстояниях, а также в многоэлектронных системах. Некоторые теоретические построения опубликованы впервые. Дан сравнительный анализ модельных потенциалов, используемых в современных квантово-химических расчетах и при компьютерном моделировании в физике, химии и молекулярной биологии. Рассмотрены многочастичные системы, для которых характерна неаддитивность силовых эффектов. В приложении приведены сведения из теории групп, векторного и тензорного исчисления и обзор методов неэмпирического исследования многоэлектронных систем. Для химиков, молекулярных физиков и молекулярных биологов — научных сотрудников, преподавателей и студентов.

Козлов Н.Н. Математический анализ генетического кода. — М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2017. — 215 с.

Аннотация. В монографии на основе изучения генов установлены новые свойства генетического кода и вычислены важнейшие его интегральные характеристики; выделены две группы таких характеристик. Установлена взаимосвязь полученных характеристик в этих группах. Проанализирован известный к настоящему времени набор генов, в том числе человеческого генома; получен ряд неизвестных ранее эффектов. Для научных работников, преподавателей и студентов, специали-

рующихся в области математического моделирования в науках о живом.

Охрименко О. Основы биохимии сельскохозяйственной продукции. Учебное пособие. — СПб.: Лань, 2016. — 448 с.

Аннотация. Пособие содержит 4 главы. Материал первых трех формирует теоретическую часть дисциплины. Первая глава посвящена вопросам статической биохимии. Во второй — раскрываются вопросы динамической биохимии, в третьей приводятся сведения по частной биохимии сельскохозяйственной продукции: молока, мяса, растительных масел. Четвертая глава представляет собой практикум по дисциплине. В практикуме рассмотрены важнейшие биохимические методы исследования сельскохозяйственного сырья и продукции; подробно изложены теоретические основы инструментальных методов исследования; раскрыты химические и физико-химические механизмы процессов, лежащих в основе приведенных методик; показаны логические и упрощенные формулы обработки результатов исследований.

В приложениях приведены способы приготовления реактивов, таблицы химического состава сельскохозяйственной продукции. Все главы пособия иллюстрированы уравнениями реакций и рисунками, литературные сведения обобщены в виде таблиц. Для проверки качества полученных знаний разработаны вопросы и задания для самоконтроля, которые приводятся в конце каждой темы. Учебное пособие предназначено для бакалавров, обучающихся по направлению подготовки «Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции», профиль: «Организация предпринимательской деятельности в агропромышленном комплексе (АПК)». Его можно рекомендовать студентам пищевых вузов и колледжей, изучающих аналогичные дисциплины. Пособие может оказаться полезным широкому кругу читателей, интересующихся вопросами производства и потребления сельскохозяйственной продукции.

Шредингер Э. Что такое жизнь с точки зрения физики? — М.: РИМИС, 2015. — 176 с.

Резюме. Эрвин Шредингер — австрийский физик-теоретик, лауреат Нобелевской премии по физике 1933 года. Является одним из разработчиков квантовой механики и волновой механики. В 1944 году Шредингер опубликовал книгу «Что такое жизнь с точки зрения физики?», оказавшую существенное влияние на развитие

биофизики и молекулярной биологии и привлекающую к этим направлениям большое количество специалистов. В данной книге рассмотрено несколько ключевых проблем биологии, к решению которых могут быть применены физические подходы.

Нано- и биоконпозиты. Ред.: Кин-Так Лау Алан, Хуссейн Фарзан, Лафди Халид. — М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015. — 390 с.

Аннотация. Книга представляет собой обзор исследований последних лет, посвященных изучению усиленных нанонаполнителями композиционных материалов — нанокомпозитов и бионанокомпозитов. Затронуты темы получения, переработки, оценки свойств этих усовершенствованных материалов, которые разрабатывают для решения самых разных задач, в том числе получения продуктов медико-биологического назначения. Рассмотрены достижения тканевой инженерии, в которой активно используются биоразлагаемые полимерные композиционные материалы. Приведены результаты изучения биосовместимости полимерных наноматериалов в условиях *in vitro* и *in vivo*. В отдельной главе книги рассмотрены способы оценки токсичности наноматериалов и подходы для разработки методов этого анализа. Для студентов и аспирантов, специализирующихся в области химической технологии, нанотехнологий и биотехнологий, а также специалистов, связанных в своей профессиональной деятельности с материалами биологического назначения.

Левинсон У. Медицинская микробиология и иммунология. — М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015. — 1181 с.

Аннотация. Книга призвана обеспечить читателя источником краткой современной информации. Охватывает как теоретические основы, так и практические вопросы бактериологии, вирусологии, микологии, паразитологии и иммунологии. Авторы сделали упор на клиническое применение базовых знаний по микробиологии и иммунологии при лечении инфекционных заболеваний. Все наиболее важные аспекты микробиологии охвачены в более чем 600 практических вопросах, общих или касающихся клинических ситуаций, которые для диагностики требуют знания научных основ. Представлены множество микротографий микроорганизмов и описание основных лабораторных тестов, а также современная информация об антимикробных препаратах и вакцинах. Для студентов медицинских и биологических специальностей.

Захаров-Гезехус И.А. Моя генетика. — М.: Наука, 2014. — 133 с.

Аннотация. Книга посвящена генеалогии, генетике и некоторым проблемам философии. Обсуждается проблема рода как генетической и духовной общности: с генетических позиций рассмотрены происхождение и судьбы русской интеллигенции, а также представлена история предков и семьи автора. Показан путь автора в генетике и наиболее важный его вклад в науку. Представлен взгляд генетика на вечные философские проблемы — проблему судьбы и проблему свободы воли.

Для биологов-генетиков, историков науки и всех интересующихся генеалогией и философскими проблемами.

Конопатов Ю.В., Васильева С.В. Основы экологической биохимии. Учебное пособие. 2-е издание, испр.— СПб.: Лань, 2017. — 136 с.

Аннотация. В пособии рассматриваются вопросы, связанные с эколого-биохимическими аспектами

жизнедеятельности живой клетки у автотрофных и гетеротрофных организмов. В связи с этим детально описаны процессы фотосинтеза и энергетического метаболизма, а также синтез белка. Затронуты вопросы адаптации животных к условиям зимней спячки и аноксии, а также адаптации ферментных систем и дыхательных белков. Описана циркуляция важнейших пластических элементов, образующих живую материю всех уровней в природе - углерода и азота. Большое внимание в данном пособии уделено изучению вопроса биотрансформации ксенобиотиков в живых организмах. Учебное пособие предназначено для студентов, обучающихся по направлениям: «Биология», «Биоэкология», «Водные биоресурсы и аквакультура», «Ветеринарно-санитарная экспертиза» и специальности «Ветеринария», а также аспирантов и специалистов в указанных научных направлениях. Авторы выражают надежду, что книга окажет помощь в изучении экологической биохимии всем заинтересованным данной дисциплиной.

1. Рукописи статей и других материалов представляются в редакцию на бумажном носителе (формат А4) или в электронном виде (на дискете или по электронной почте с обязательным уведомлением).
2. Текст набирается в Microsoft Word, шрифт — Times New Roman, размер шрифта — 12, межстрочный интервал — полуторный. Размещение на листе формата А4 со стандартными полями. Кроме текста статьи, добавляются сведения об авторе (ах): Ф.И.О., место работы, должность, научные степень и звание, адреса для переписки и электронной связи, номера факсов и телефонов). Необходимо сопроводительное письмо из учреждения.
3. Объем рукописи: оригинальные статьи — не более 12–14 стр. (в среднем 22000 знаков), не более 25 цитированных авторов; обзоры — не более 20–24 стр. (в среднем 40000 знаков), список литературы — не более 50 авторов. Требования к композиции рукописи: 1) оригинальные статьи — УДК, название, автор (ы), место работы, резюме на русском и английском языках, ключевые слова, введение, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение (выводы), литература, список сокращений; 2) краткие сообщения и обзоры строятся в виде сплошного текста, без вышеуказанных рубрикаций, со списком литературы, резюме на русском и английском языках; 3) остальные материалы (письма в редакцию, хроникальные сообщения, рецензии и т.д.) представляются в произвольной форме.
4. Требования к оформлению содержания рукописи (таблицы, графики, формулы, фотографии, рисунки и др.). Рисунки прилагаются отдельно к тексту рукописи в бумажном и электронном виде в формате TIF или JPEG. Таблицы помещаются по ходу текста или прилагаются отдельно. Порядок оформления иллюстративного и иного дополнительного (пояснений, примечаний, благодарностей и т.д.) материала к текстам обычный.
5. Требования к цитированной литературе: Список литературы оформляется или в алфавитном порядке (вначале — литература на русском языке, затем — на иностранных), или по порядку упоминания и ссылок в тексте при использовании цифр. В последнем случае номер цитированного источника берется в тексте в квадратные скобки. Оформление отдельного источника литературы осуществляется в соответствии с общепринятыми

для научных изданий библиографическими требованиями, включая международные правила.

6. Не допускается публикация работ, уже напечатанных или посланных в редакции других изданий.
7. При несоблюдении указанных правил статьи редакцией не принимаются.
8. Принятые к публикации рукописи проходят рецензирование, после чего принимается окончательное решение о возможности печатания. Отклоненные рукописи не возвращаются.
9. Редакция не несет ответственности за достоверность фактов, выводы и суждения, приведенные в представленном к печати и опубликованном материале авторов.
10. Редакция оставляет за собой право делать научную и литературную правку, в том числе сокращать объем статей.
11. Адрес редакции указан на титульном листе журнала.
12. Журнал является безгонорарным. Редакция резервирует для автора статьи по 1 экземпляру журнала. По вопросам приобретения отдельных номеров журнала следует обращаться в редакцию.
13. Имеется электронный архив журнала на сайте Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова (www.biorosinfo.ru).



Подписано к печати 27.06.17
Формат 60/90¹/₈. Бумага офсетная № 1.
Печать офсетная. Гарнитура Академия.
Печ. л. 5,0. Тираж 1000 экз.

ООО «Издательство «БИОСФЕРА»
109147 Москва, ул. Марксистская, 20, стр. 8
Тел.: +7 (495) 763-18-41; E-mail: biosphere@biorosinfo.ru

ОБЩЕСТВО БИОТЕХНОЛОГОВ РОССИИ ИМ. Ю.А. ОВЧИННИКОВА

Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова (ОБР) создано в 2003 г., зарегистрировано Минюстом России.

Главными целями деятельности ОБР являются:

- содействие развитию биотехнологии в России как приоритетного направления научно-технического прогресса, основы повышения уровня жизни и благосостояния ее граждан;
- содействие сохранению научного и научно-технологического потенциала биотехнологии в различных отраслях народного хозяйства, достижению приоритета российской науки;
- обеспечение обмена научными идеями и научно-техническими достижениями, передовым производственным опытом;
- содействие развитию сотрудничества ученых, инженеров, специалистов с мировым научным и общественно-политическим сообществом;
- создание условий для творческой работы, роста профессионализма и компетентности, более полного использования интеллектуального потенциала членов организации в интересах развития науки и производства.

Для достижения этих целей ОБР осуществляет различные мероприятия, в том числе проводит конференции, симпозиумы, рабочие совещания. Регулярно проводится Съезд Общества биотехнологов России.

Издается журнал «Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова» совместно с Информационно-аналитическим центром медико-социальных проблем.

ОБР имеет отделения в 57 регионах России и объединяет свыше 3000 членов.

ОБР является членом Европейской федерации биотехнологии.

ОБР тесно сотрудничает с Союзом биотехнологов и другими общественными и государственными организациями, научными и образовательными учреждениями по профилю.

Основой организационной деятельности ОБР являются региональные отделения, тесно взаимодействующие с Центральным Правлением и Секциями (экспертными группами).

Членство в ОБР является бесплатным для физических лиц.

Контакты: Адрес: 119071 Москва, Ленинский пр-т, 33

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: obr@biorosinfo.ru; www.biorosinfo.ru