

доза активного ила во всех вариантах уменьшилась: стоки «Грузавтосервиса» – 1,04 г/дм³, «Санты» – 1,74 г/дм³, «Евротрейда» – 0,76 г/дм³. Седиментационные свойства, как и в прошлых повторностях, улучшились во всех пробах и объем осадка после 30 мин составлял: «Грузавтосервис» – 17 %, «Санта» – 27 %, «Евротрейд» – 28 %. В результате иловый индекс слабо изменился и почти приблизился к норме на стоках первых двух предприятий: «Грузавтосервис» – 163,5 см³/г, «Санта» – 155,2 см³/г. Но на стоках «Евротрейда» произошло значительное увеличение этого индекса – до 368,4 см³/г, что было связано с малой дозой ила. Эти цифры подтвердили визуальные показатели. На стоках «Грузавтосервиса» ил был темный, но хорошо структурированный и быстро оседающий, на стоках «Санты» – светло-коричневый, хлопьевидный, а на стоках с «Евротрейда» – вспухший с низкой плотностью, в надосадочной жидкости много мелкой трудно оседающей мути.

Видовой состав в первых двух пробах изменился незначительно, количество видов почти не изменилось. Но на стоках «Евротрейда» произошло значительное ухудшение. Количество видов уменьшилось до 8, началось развитие нитчатых бактерий. Увеличилось количество аспидиск, арцеллы, бесцветных жгутиконосцев и зооглей, что указывает на неблагоприятные условия для жизнедеятельности активного ила.

По результатам исследований можно сделать следующие выводы:

1. На жизнедеятельность гидробионтов и качество активного ила наиболее негативное влияние оказали сточные воды «Евротрейда» и «Брестского пива».

2. В пробах сточных вод «Евротрейда», по данным химических исследований, содержалось значительное количество растворимых органических соединений, в том числе β-нафталол, резорцин, бензол, а «Брестского пива» – идентифицирован только толуол.

3. Для достоверной оценки влияния сточных вод на активный ил необходимо проведение исследований хотя бы в четырехкратной повторности, а затем подробные химические анализы только наиболее токсичных стоков.

Литература

1. Голубовская Э.К. Биологические основы очистки воды. – М.: Высшая школа, 1978. – 268 с.
2. ГОСТ 17.4.4.02-84. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа. – Введ. 01.01.86. – М.: Изд-во стандартов, 1986. – 11 с.
3. Жмур Н.С. Технологические и биохимические процессы очистки сточных вод на сооружениях с аэротенками. – М.: АКВАРОС, 2003. – 512 с.
4. Методика проведения технологического контроля работы очистных сооружений городских канализаций. – М.: Изд-во литературы по строительству, 1971. – 229 с.
5. Определитель пресноводных беспозвоночных европейской части СССР. – Л.: Гидрометеоздат, 1976.
6. Фауна аэротенков (Атлас) / Под ред. Л.А. Кутиковой. – Л.: Наука, 1984. – 264 с.

НАУЧНО-МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ КУЛЬТУРЫ ТКАНИ РАСТЕНИЙ ДЛЯ КСЕНОФИТОФИЗИОЛОГИИ

В.В. Карпук

Белорусский государственный университет, г. Минск, Беларусь
VKarpuk@tut.by

Под термином "культура тканей растений" принято понимать выращивание *in vitro* (в стерильных искусственных условиях) изолированных клеток, тканей, органов и их частей. Метод культуры тканей возник как экспериментальная биологическая модель, позволяющая изучать физиологические, биохимические и другие процессы на уровне автономных клеток, освобожденных от регулирующего влияния целого растительного организма.

Благодаря фундаментальным исследованиям Ф. Уайта (США), Р. Готре (Франция), Р.Г. Бутенко (Россия) и их последователям во многих лабораториях мира, стало возможным длительное выращивание недифференцированных растительных клеточных масс – каллусов, затем был разработан метод выращивания растительных клеток в суспензионной культуре и получения биомассы от единичных клеток, что позволило выделять однородный в генетическом и физиологическом отношении материал.

Первоначально разрабатываемый как чисто теоретическое направление метод культуры тканей, начиная с середины 60-х годов XX века, входит в арсенал особой научно-производственной деятельности, известного под названием биотехнологии. Технологии, основанные на методе культуры тканей, помогают создавать новые сорта сельскохозяйственных растений и получать промышленным путем продукты растительного происхождения, находящие фармакологическое применение. Способность некоторых культур к образованию соединений, не обнаруженных в исходных растениях, позволила рассматривать их как продуценты принципиально иных, нетрадиционных биологически активных веществ. Это указывает на возможность направленного синтеза природных соединений в культуре ткани путем введения в состав питательной среды простых, доступных соединений для их трансформации ферментной системой культур тканей в фармакологически ценные продукты.

Метод культуры растительных тканей и клеток *in vitro* имеет большой потенциал для изучения и решения ряда фундаментальных проблем фитобиологии. В настоящее время, после расшифровки генома растения *Arabidopsis* и человека, представления В.И. Вернадского об общности всех компонентов биосферы воспринимаются, конкретизируясь, прежде всего, в совокупность геномов всех организмов и видов. Теперь становится возможным изучение функциональной геномики: степени удовлетворения генетически детерминированных потребностей клеток, организмов и видов в среде их обитания; характера и специфики взаимодействия геномов на уровне веществ, субклеточных структур, клеток, тканей и органов, организмов, популяций, видов, ценозов; расшифровка молекулярно-генетических и физиолого-биохимических механизмов таких явлений как биологическая адаптация к условиям существования, цитодифференцировка и органогенез, жизненные формы, иммунитет и т.д. Мы находимся сейчас в начале этих исследований.

В 80-е годы XX века на базе метода культуры ткани возникли новые направления биотехнологии, важнейшим из которых была клеточная инженерия. Изучалось поведение отдельных изолированных клеток в культуре, воздействие на клетки мутагенных факторов и условий внешней среды для получения новых форм растений, получение гибридных растений с помощью протопластов (частей клеток, лишенных оболочки).

Способность клеток в культуре тканей при изменении условий культивирования давать начало целому организму-растению привела к созданию промышленных клеточных технологий микроклонального размножения растений, позволяющих в короткие сроки (в течение месяцев, а не лет, затрачиваемых при использовании обычных методов) размножать ценные генотипы.

До начала 70-х годов прошлого века спектр соединений, образуемых культурами тканей в количествах, характерных для целого растения, был очень ограничен. Экспериментальные данные, накопившиеся к этому периоду, указывали, что биосинтез многих соединений в недифференцированных тканях (каллусах) сильно репрессирован, а появление вторичных продуктов во многих случаях связано с регенерацией корней, побегов и других морфологических структур, т.е. с процессом дифференцировки тканей. Возникла необходимость научиться управлять наследственным потенциалом клеток и тканей растений и использовать его скрытые возможности, активировать спящие гены, которые могут составлять более половины генов, заключенных в хромосомах ядер. Наряду с культурами клеток и тканей растений стали развиваться способы культивирования органов растений *in vitro* – побегов и

"волосатых" корней, трансформированных *Agrobacterium*, в качестве альтернативного источника продуктов жизнедеятельности растений.

Как правило, клеточные культуры характеризуются низким содержанием искомым веществ. Для многих культур попытки ученых определить условия накопления продуктов, характерных для родительских растений, оставались неудачными. Нередко культуры тканей продуцируют вещества иной природы, чем интактные растения: так, коробочки мака снотворного – источники сырья для получения морфина, но культура ткани этого растения под влиянием элиситоров образуют сангвинарин. Клетки *Cinchona ledgeriana* Moens ex Trimen в культуре накапливают не алкалоиды, а антрахиноны.

Тем не менее, в настоящее время способность каллусных культур к накоплению вторичных продуктов является уже установленным фактом. Процессы, происходящие в культивируемых тканях, в принципе не отличаются от процессов, идущих в тканях целого растения. Сохраняющаяся в каллусных клетках способность к синтезу специфических вторичных метаболитов: алкалоидов, стероидов (карденолидов, сапонинов), терпеноидов (эфирных масел) и других, – определяет практическую ценность культур растительных тканей для создания технологий промышленного выращивания биомассы клеток в качестве принципиально нового вида лекарственного сырья.

Чтобы служить лекарственным сырьем, в котором содержание ценных веществ было предсказуемо и достаточно велико, культуры тканей растений должны быть изучены и отобраны высокопроизводительные штаммы.

Проведенные в конце 20 – начале 21 века исследования показали, что на выход вторичных продуктов в культуре ткани влияют такие факторы как:

- Происхождение ткани. Обычно для введения в культуру ткани проводят поиск наиболее продуктивных растений в надежде, что эта способность будет перенесена и в культуру. Этот вопрос обсуждается до сих пор, т.к. экспериментальные данные довольно противоречивы. Например, культуры тканей барвинка розового, полученные из высокоалкалоидных растений, проявляли тенденцию к синтезу большего количества алкалоидов, чем культуры, полученные от малопродуктивных растений. В то же время клеточные культуры *Duboisia myoporoides* R. Br., наиболее богатого тропановыми алкалоидами растения (5,0 %), не накапливали значительных количеств алкалоидов.

- Условия культивирования. Питание. В среде, где все питательные вещества присутствуют в избытке, увеличение концентрации сахарозы, как правило, приводит к пропорциональному увеличению биомассы. В некоторых случаях увеличение концентрации сахарозы может оказать положительный эффект и на выход действующих веществ. Так, при увеличении концентрации сахарозы в 4 раза, концентрация алкалоидов в клетках *Eschscholtzia* увеличивалась в 7 раз. Но содержание фенольных соединений, продуцируемых этими клетками, не изменялось, что указывает на независимую регуляцию различных биосинтетических путей.

Важнейшим фактором создания эффективной биотехнологической системы является разработка питательной среды, обеспечивающей потребности продуцента в химических компонентах, необходимых для оптимального биосинтеза целевого продукта. Для некоторых культур разработаны способы двухэтапного выращивания. В этих случаях ткани после накопления достаточной биомассы переносятся в продукционные среды, способствующие максимальному синтезу действующих веществ. Примером эффективной продукционной среды является среда J. Berlin e.a. (1983), содержащая 8 % сахарозы, без фитогормонов с уменьшенным содержанием фосфора, обеспечивающая в 4–8 раз более высокую продукцию алкалоидов клетками суспензионной культуры *Eschscholtzia*, чем целого растения.

- Стрессовые факторы. Образование вторичных продуктов в культуре ткани может резко возрастать под влиянием некоторых стрессовых факторов (продуктов жизнедеятельности микроорганизмов, осмотического шока, токсических ионов тяжелых металлов и т.д.). Вто-

ричные продукты некоторых растений являются фитоалексинами, и их синтез в растительной клетке происходит в ответ на действие продуктов жизнедеятельности микроорганизмов для защиты от фитопатогенов. При добавлении к культуре ткани элиситоров (компоненты стенок грибного мицелия или какие-либо другие продукты жизнедеятельности микроорганизмов) интенсивность синтеза клетками растений некоторых фармакологически ценных веществ возрастает. Поэтому институт биотехнологии (г. Саскачеван, Канада) с целью уменьшения себестоимости конечного продукта предложил промышленный способ получения сангвинарина из клеточных культур мака путем элиситации алкалоида грибным гомогенатом из *Pythium aphanidermatum* (Edson.) Fitzp.

Кроме элиситоров грибного и микробного происхождения биосинтез вторичных продуктов могут стимулировать химические вещества. Так, сульфат ванадия способствует увеличению почти в 2 раза содержания индольных алкалоидов аймалицина и катарантина в культивируемых клетках *Catharanthus roseus* (L.) G. Donf. Вероятно, сульфат ванадия взаимодействует с клеточными рецепторами барвинка розового, с теми, с которыми связываются грибные элиситоры (или с иными рецепторами, но обладающими сходными цитоплазматическими посредниками передачи сигнала в геном). В настоящее время не известен ни механизм воздействия $VaSO_4$ на синтез вторичных продуктов, ни место его аккумуляции. Тем не менее, обработка клеток ванадием способствует сокращению периода роста, увеличению выхода индольных алкалоидов и, в отличие от грибных элиситоров, не требует выращивания грибов и получения из них элиситора.

Способы выращивания. В большинстве микробных систем продукты, синтезируемые микроорганизмами, продуцируются из клетки непосредственно в среду, в связи с чем эффект обратного ингибирования продуктом реакции очень мал. В культуре ткани, как правило при увеличении концентрации продукта в клетке выше пороговой, срабатывает эффект обратного ингибирования, вследствие чего дальнейшее накопление вещества прекращается. Данное явление часто обуславливает низкое содержание искомым веществ в клетках культуры. Чтобы избежать этого эффекта, рядом исследователей неоднократно предпринимались попытки удалять продукт реакции по мере его синтеза из клетки. Так, для увеличения проницаемости клеток *Cinchona ledgeriana* Moens ex Trimen в культуре и ускорения выхода внутриклеточных алкалоидов применяют диметилсульфоксид (ДМСО). Однако, даже при высокой концентрации ДМСО, высвобождение алкалоидов протекает медленно и большинство обработанных мембран не восстанавливается.

Для некоторых суспензионных культур весьма экономичным оказался способ выращивания в виде двухфазной системы. Такая культура, состоит из водной фазы (питательная среда с растущими клетками) и нетоксичной липофильной фазы (триглицериды или парафины). В результате липофильные вещества, синтезируемые клетками в процессе их роста, переходят, соответственно, в липофильную фазу.

• **Клеточная дифференциация *in vitro*.** В настоящее время большое число экспериментальных данных свидетельствует о том, что образование и накопление вторичных продуктов в растениях – сложный, пространственно организованный процесс, который часто в той или иной форме включает транспорт этих соединений на клеточном и субклеточном уровнях. В целом ряде случаев показано резкое разграничение мест первичного синтеза и накопления алкалоидов. Установлено, что эти два процесса могут быть локализованы в пределах одного и того же органа или даже одной и той же ткани, но в различных клетках, что говорит об эпигенетическом контроле процесса пространственного разобщения синтеза и накопления конечного продукта.

В культурах тканей растений, также как и в растениях, накопление вторичных метаболитов зачастую тесно связано со степенью тканевой дифференциации. Исследователи, работающие с культурами тканей, часто наблюдают, что при образовании в каллусной ткани морфологических структур (побегов, корней, эмбриоидов и т.п.) содержание нужных про-

дуктов в культуре увеличивается. В частности, сердечные гликозиды в культуре ткани наперстянки синтезировались только при образовании эмбриоидов.

В культурах ткани обычно формируются секреторные каналы, млечники, слизевые клетки, железки или специализированные клетки, где накапливаются конечные продукты, т.е. наблюдается процесс разобщения синтеза и накопления вторичных метаболитов. Например, в культуре ткани женьшеня возникают секреторные каналы, типичные для интактных растений сем. *Araliaceae*. Обнаружена четкая корреляция между ультраструктурной организацией пластид (этиопластов и хлоропластов) и биосинтетической способностью каллусных культур чайного растения, что подчеркивает важную роль хлоропластов в образовании фенольных соединений. Кроме того, в продуцирующих клетках можно было наблюдать многочисленные везикулы, содержащие в цитоплазме электронно-плотный осадок.

• **Селекция культур.** Известно, что культивирование клеток *in vitro* может сопровождаться значительным генетическим разнообразием. Соматональные варианты, возникающие при длительном культивировании каллуса, сохраняя основные свойства прототипа, часто значительно отличаются от него устойчивостью к вирусам, болезням, экологическим стрессам, а иногда несколько измененной биосинтетической способностью и более высокой продуктивностью – т. е. могут затрагивать хозяйственно ценные признаки. Для увеличения спектра изменчивости используют обработку мутагенными веществами, а также селективные условия культивирования клеток.

Спонтанно возникшие или индуцированные мутанты в популяции отбираются на устойчивость к созданным жестким условиям: высоким концентрациям солей, экстремальным температурам, гербицидам, токсинам и др. Цель: в результате экспериментов отобрать устойчивые линии и получить растения-регенеранты из стабильной клеточной линии, гарантирующей стандартность лекарственного сырья.

Клеточная селекция – одна из наиболее перспективных клеточных технологий для создания сортов не только важнейших сельскохозяйственных, но и лекарственных растений. В настоящее время с большим ускорением развиваются исследовательские работы по созданию высокопродуктивных штаммов и растений-регенерантов методами и гибридизации соматических (неполовых) клеток путем слияния протопластов и генной инженерии.

Хотя методы соматической гибридизации и генной инженерии пока еще не получили промышленного развития, однако несомненно, что они несут огромные возможности и станут широко востребованными в будущем: при создании новых нужных человеку лекарственных растений – продуцентов фармакологически ценных веществ, а также сортов хлопчатника и многих других сельскохозяйственных и древесных растений, представляющих источники сырья для промышленной переработки и использования в различных отраслях народного хозяйства.

ПОЛИМОРФИЗМ МОНООКСИГЕНАЗНОЙ СИСТЕМЫ И ЕГО РОЛЬ В МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВАЦИИ БЕНЗ(а)ПИРЕНА

П.А. Киселев¹, Н.А. Бовдей¹, Д. Шварц²

¹Институт биоорганической химии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь
kiselev@iboch.bas-net.by

²Центр молекулярной медицины им. М. Дельбрюка, г. Берлин, Германия
schunck@mdc-berlin.de

В настоящее время считается, что индивидуальная предрасположенность к химическому канцерогенезу, по крайней мере частично, может быть обусловлена генетической вариабельностью ферментов, участвующих в метаболических превращениях физиологически ак-