

УДК 579.873.6.017.7

БИОХИМИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ ПОЛИАРОМАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИМИ БАКТЕРИЯМИ В ЖИДКОЙ СРЕДЕ

© 2016 г. Д. А. Филатов¹, Е. А. Ельчанинова^{1,2}, В. С. Овсянникова¹, Л. К. Алтунина¹

¹Институт химии нефти СО РАН, Томск

²Томский политехнический университет Институт природных ресурсов

E-mail: Filatov@ipc.tsc.ru

Поступила в редакцию 28.07.2015 г.

Показана возможность биохимического окисления смеси полиароматических углеводородов (ПАУ) в отсутствие других источников углерода и энергии ассоциацией углеводородоокисляющих микроорганизмов (УОМ) видов *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus cereus* и *Arthrobacter globiformis*. Численность микроорганизмов в процессе культивирования увеличивалась от 0.25×10^4 до 11×10^8 КОЕ/мл среды, что сопровождалось увеличением их оксигеназной активности. Все идентифицированные ПАУ подвергались окислению: степень деструкции би-, три-, тетра-, пента-, гексааренов и их метилзамещенных гомологов варьировала от 11.3 до 100 %.

Ключевые слова: полиароматические углеводороды, биохимическое окисление, углеводородоокисляющие микроорганизмы, ферменты.

DOI: 10.7868/S0028242116040067

Среди веществ-экоотоксикантов полиароматические соединения занимают одно из первых мест по урону, наносимому окружающей среде. Спектр этих веществ чрезвычайно разнообразен, их токсичность, канцерогенность и мутагенность общеизвестна. Кроме того, они липофильны, малорастворимы в воде и летучи [1, 2]. Многие из этих соединений относятся к супер-экоотоксикантам 1-го класса опасности (диметилбенз(а) антрацена, бенз(а)пирен и др.) [3]. Основной источник попадания ПАУ в окружающую среду – хозяйственная деятельность человека, включающая сжигание топлива, различных отходов и органических материалов, разливы нефтепродуктов [4]. Утилизация их сводится в основном к захоронению на специальных полигонах. В природных условиях полиароматические соединения могут разлагаться под воздействием микробной деструкции, фотодеструкции и др. [5], но для их полной деструкции требуются годы.

К настоящему времени имеется множество сведений о механизме биодеструкции ПАУ разного строения: стадиях, промежуточных продуктах и участвующих ферментах [6, 7]. Известно, что их активными деструкторами являются бактерии родов *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter* и разрушающие лигнин грибы (*Trichoderma lignorum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Coriolus versicolor*, *Chaetomium globosum*). Деструкция ПАУ в основном возможна в условиях соокисления с более доступ-

ным для микробного окисления органическим субстратом, однако есть данные, что микроорганизмы в чистых культурах и в ассоциациях способны окислять индивидуальные ПАУ [8].

Сегодня ведутся работы по использованию штаммов-деструкторов экоотоксикантов в очистных сооружениях, но вопросы биодеградации токсичных веществ непосредственно в природных биоценозах (биоремедиации) и создания промышленных технологий, позволяющих очищать природные ландшафты от техногенных загрязнений ПАУ, разработаны недостаточно.

Основная масса работ по деструкции ПАУ посвящена изучению окислению одного вещества или смеси ПАУ, содержащей не более 5 компонентов [4, 5, 9]. Однако в реальных условиях спектр ПАУ-экоотоксикантов гораздо шире.

Цель данной работы – исследование окисления многокомпонентной смеси ПАУ ассоциацией углеводородоокисляющих микроорганизмов (УОМ) в жидкой минеральной среде.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объект исследования – фракция ПАУ, выделенная из битумо-насыщенного песка, отобранного из углубления на поверхности грунта в песчаном карьере месторождения Тимано-Печорской нефтегазовой провинции. Методом горячей экстракции смесью хлороформ : метанол (93 : 7)

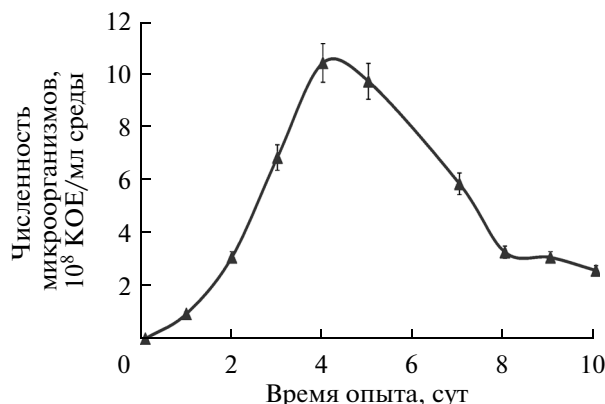


Рис. 1. Динамика численности ассоциации УОМ при биодеструкции полиароматических соединений в жидкой среде.

выделили битум, экстрагент удалили на вакуумном роторном испарителе. Далее образец освободили от смол и асфальтенов на колонке с оксидом алюминия IV-й степени активности, элюируя его гексаном.

В работе исследовали возможность биоокисления ПАУ ассоциацией УОМ, представленной видами *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus cereus* и *Arthrobacter globiformis*, ранее выделенными из нефтезагрязненных почв [10].

Биоокисление ПАУ проводили в условиях периодического культивирования на жидкой минеральной среде Раймонда в стеклянных колбах объемом 300 см³. ПАУ вносили в концентрации 0.5% (1 г на 200 см³ среды). Ассоциацию УОМ готовили путем совместного культивирования. Инокулят вносили в культуральную среду в объеме 1 мл, при содержании ассоциации УОМ 0.5×10^6 КОЕ/см³. Соотношение УОМ в инокуляте было следующим: *Arthrobacter globiformis* — 20%; *Bacillus cereus* — 25%; *Pseudomonas stutzeri* — 30%; *Ps. Putida* — 25%.

В качестве дополнительного минерального питания в культуральную среду добавляли нефтewытесняющую композицию в объеме 1 мл, содержащую 16% NH₄NO₃, 32% карбамида и ПАВ — неонол и волгонат в концентрации 1.5 и 0.5 мас. % соответственно, способствующие диспергированию углеводов (УВ) и увеличению площади их контакта с микробными клетками. Колбы со средой, ПАУ и УОМ термостатировали в течение 10 сут при +20°C при постоянной аэрации перемешиванием на магнитной мешалке со скоростью 800 об/мин. Эксперимент проводили в 5-ти кратной повторности.

В ходе опыта определяли численность микроорганизмов и активность ферментов. Численность клеток определяли посевом на плотные агаровые среды [11].

Ферментативную активность определяли в минеральной среде без отделения клеток от среды: каталазную активность — газометрическим методом по скорости распада H₂O₂, выраженной в мл O₂ на 1 мл среды/мин, активность дегидрогеназы, пероксидазы и полифенолоксидазы — фотокolorиметрическими методами [12].

Остаточное содержание ПАУ в культуральной среде определяли в конце эксперимента (на 10-ые сут) гравиметрическим методом после извлечения их хлороформом в делительной воронке и освобождения от растворителя [13].

Индивидуальный состав ПАУ в исходной и подверженной биодеструкции фракции, анализировали методом хроматомасс-спектрометрии (ГХ–МС) на магнитном хромато-масс-спектрометре фирмы “Thermo Scientific DFS” (Германия). Хроматограф оборудован кварцевой капиллярной колонкой “Thermo Scientific” 0.25 мм × 30 м, толщина фазы 0.25 мкм, неподвижная фаза — TR-5MS; газ-носитель — гелий. Программа хроматографа — 80°C — 2 мин — 4°C/мин — 300°C — 30 мин.

Масс-спектрометр: метод ионизации — электронный удар; энергия ионизирующих электронов — 70 эВ; температура ионизационной камеры — 270°C, температура интерфейса — 270°C.

Хроматограммы органических компонентов получены по общему ионному току (TIC) и характеристическим фрагментным ионам (SIM). Идентификацию индивидуальных УВ проводили компьютерным поиском в библиотеке Национального Института Стандартов NIST-05, по литературным данным и реконструкцией структур по характеру ионной фрагментации при электронном ударе. Содержание компонентов определяли по площади соответствующих пиков на хроматограммах с использованием внутреннего стандарта (дейтероацетонафта C₁₂D₁₀) по формуле: $C_i = (S_i M_{st}) / (S_{st} m_i)$, где C_i — содержание искомого компонента, мкг/г; M_{st} — масса стандарта, мкг; S_i и S_{st} — площади хроматографических пиков искомого компонента и стандарта; m_i — масса сухого осадка, г [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследуемая ассоциация УОМ на минеральной жидкой среде с ПАУ в качестве единственного источника углерода начала активный рост уже в первые сутки опыта без периода адаптации. Максимальная численность микроорганизмов достигла 10–11 × 10⁸ КОЕ/мл на 4–5 сут культивирования, т.е. рост составил 5 порядков (начальная численность была 0.25 × 10⁴ КОЕ/мл) (рис. 1). Это свидетельствует о том, что внесенные УОМ сразу начинают окислять входящие в состав смеси ПАУ. Вероятно, существенную роль в процессах биоокисления сыграли внесенные ПАВ, которые выполняют роль “посредников” между клеткой и аро-

Таблица 1. Активность ферментов при биодеструкции ПАУ ассоциацией УОМ в жидкой минеральной среде

Сутки опыта	Ферменты			
	каталаза, мл O ₂ /мл	дегидрогеназа, мг/мл	пероксидаза, мг/мл	полифенолоксидаза, мг/мл
2	4.10 ± 0.2	0.48 ± 0.02	0.31 ± 0.03	0.16 ± 0.02
5	6.90 ± 0.3	0.76 ± 0.03	0.47 ± 0.02	0.29 ± 0.03
9	3.90 ± 0.2	0.55 ± 0.01	0.27 ± 0.02	0.16 ± 0.02

матическими соединениями, способствуя адгезии клеток и гидрофобного субстрата и обеспечивая его транспорт внутрь клетки [15, 16].

Следовательно, ароматические УВ в концентрации 0.5% не являются токсичными и могут ассимилироваться используемыми микроорганизмами. В конце эксперимента первоначально примерно равное соотношение численности используемых УОМ нарушается, и доминируют культуры *Arthrobacter globiformis* – 40% и *Bacillus cereus* – 40%, *Pseudomonas stutzeri* и *Ps. putida* по 10% соответственно. Это может свидетельствовать о том, доминирующие культуры адаптируются к окислению более тяжелых и труднодоступных ароматических УВ.

Микробиологическое окисление УВ представляет собой серию окислительно-восстановительных ферментативных реакций, часть которых осуществляется оксидоредуктазами [17]. Например, каталаза осуществляет распад пероксидов с выделением высокоактивного кислорода, который в дальнейшем используют микроорганизмы. Дегидрогеназы осуществляют введение одного атома кислорода из его молекулярной формы в концевую метильную группу углеводорода и отвечают в основном за окисление нормальных алканов и алифатической цепочки в сложных молекулах. Фенолоксидазы (пероксидазы и полифенолоксидазы) играют важную роль в процессах разложения соединений ароматического ряда [18].

Изменение активности вышеперечисленных ферментов при биодеструкции смеси ПАУ приведено в табл. 1. Показано, что увеличение активности всех исследованных ферментов начинается сразу после начала культивирования, их максимальная активность отстает на 5 сут опыта, а в дальнейшем, на 7–9 сут опыта, снова снижается. Изменение активности ферментов происходило в соответствии с динамикой численности микрорфлоры. Снижение активности изучаемых ферментов и скорости роста УОМ предположительно может быть связано с недостатком субстрата, т.е. утилизацией большей части углеводов входящих в состав ПАУ. А также это может быть следствием высокой плотности бактериальной популяции, или по причине накопления токсичных продуктов обмена.

ГХ-МС анализ показал, что в составе смеси ПАУ до и после биодеструкции присутствуют би-, три-, тетра-, пента- и гексациклические ароматические УВ. Идентифицированы также гетероатомные соединения – дибензтиофены и бензнафтотиофены. Моноароматические УВ обнаружены не были.

В исходном образце в составе аренов преобладают полиарены: фенантрены, флуорантены с пиренами и нафталины, высоко содержание тетрааренов (бензапирены с периленом) Все группы аренов в той или иной степени были подвержены биодеструкции. Общая деструкция биароматических УВ – нафталинов, бифенилов и флуоренов – составила 69.1, 50 и 40% соответственно. Окисление триаренов: фенантронов и терфенилов прошло на 18.2 и 52.6% соответственно. Концентрация тетрааренов – флуорантены + пирены и бензантрацены + хризены – составила 32.3 и 56.1% соответственно. Биотрансформация аренов, содержащих гетероатомы, – дибензтиофенов и бензонафтотиофенов – составила 43.5 и 36.1% соответственно. Деструкция более высокомолекулярных соединений с 5 и 6 кольцами в молекуле – бензперилены + перилен и дибензохризены + инденопирен – прошла на 54.2 и 64.9% соответственно.

Скорость окисления органических веществ определяется не только их строением, но и характером протекающих процессов. Анализ экспериментальных данных по деструкции ПАУ показал, неоднозначную зависимость степени деструкции ПАУ от их строения и молекулярной массы (табл. 2). Ранее было показано, что деструкция ПАУ идет последовательно и начинается с гидроксирования только одного ароматического кольца. Поэтому доступность для биоокисления должна снижаться по мере увеличения числа бензольных колец. В данном опыте деструкция нафталина составила 100%, а деструкция более высокомолекулярных соединений – фенантрена, антрацена, флуорантена, пирена и хризена – не превышала 15–34%. Однако деструкция веществ еще более сложного строения – перилена, инденопирена и дибензохризена – составила от 62 до 85%, что не соответствует ранее установленным закономерностям. Возможно, в молекулах ПАУ с тремя и более кольцами могут подвергаться окислению одновременно более одного кольца, за счет чего в итоге сте-

Таблица 2. Состав ароматических соединений в исходной фракции ПАУ и подверженной биодеструкции

Углеводороды	Формула	ПАУ исх, мкг/г	ПАУ био, мкг/г	Деструкция, %
Биарены				
Нафталин	$C_{10}H_8$	342.31	0.00	100.00
Метилнафталины	$C_{11}H_{10}$	717.35	54.93	92.34
Диметилнафталины	$C_{12}H_{12}$	1208.72	459.00	62.02
Триметилнафталины	$C_{13}H_{14}$	1073.93	492.11	54.17
Тетраметилнафталины	$C_{14}H_{16}$	214.45	92.84	56.70
Дибензотиофен	$C_{12}H_8S$	267.96	212.28	20.77
Метилдибензотиофены	$C_{13}H_{10}S$	440.53	340.21	22.77
Диметилдибензотиофены	$C_{14}H_{12}S$	356.67	181.87	49.00
Бифенил	$C_{12}H_{10}$	285.73	97.34	65.93
Метилбифенилы	$C_{13}H_{12}$	613.10	538.20	12.21
Диметилбифенилы	$C_{14}H_{14}$	826.62	732.69	11.36
Флуорен	$C_{13}H_{10}$	470.81	381.13	19.04
Метилфлуорены	$C_{14}H_{12}$	864.53	663.00	23.31
Диметилфлуорены	$C_{15}H_{14}$	955.19	596.68	37.53
Триарены				
Фенантрен	$C_{14}H_{10}$	567.19	409.87	27.73
Антрацен	$C_{14}H_{10}$	156.96	103.54	34.03
Метил-фенантрены и антрацены	$C_{15}H_{12}$	1691.66	1545.46	8.64
Диметил-фенантрены и антрацены	$C_{16}H_{14}$	2940.77	2319.49	21.12
Терфенилы	$C_{18}H_{14}$	72.54	34.33	52.67
Тетраарены				
Флуорантен	$C_{16}H_{10}$	483.41	387.59	19.82
Пирен	$C_{16}H_{10}$	439.64	366.47	16.64
Метил-флуорантены и пирены	$C_{17}H_{12}$	1830.36	1400.69	23.47
Диметил-флуорантены и пирены	$C_{18}H_{14}$	1924.53	937.32	51.29
Бензантрацен	$C_{18}H_{12}$	235.07	149.79	36.27
Хризен	$C_{18}H_{12}$	276.26	232.17	15.95
Метил-бензантрацены и хризены	$C_{19}H_{14}$	825.19	348.01	57.82
Диметил-бензантрацены и хризены	$C_{20}H_{16}$	315.50	138.93	55.96
Бензонафтодиофены	$C_{16}H_{10}S$	310.08	225.97	27.12
Пентаарены				
Бенз(е)аценафтрилен	$C_{20}H_{12}$	262.42	134.01	48.93
Бенз(б)флуорантен	$C_{20}H_{12}$	83.24	48.79	41.38
Бенз(к)флуорантен	$C_{20}H_{12}$	77.57	46.44	40.13
Бенз(а)пирен	$C_{20}H_{12}$	199.83	89.64	55.14
Бенз(е)пирен	$C_{20}H_{12}$	162.07	68.33	57.84
Перилен	$C_{20}H_{12}$	14.48	2.85	80.31
Метил-пентаарены	$C_{21}H_{14}$	940.85	476.09	49.40
Диметил-пентаарены	$C_{22}H_{16}$	467.38	244.56	47.67
Гексаарены				
Дибензохризен	$C_{22}H_{12}$	143.94	54.72	61.98
Бензперилен	$C_{22}H_{12}$	148.63	62.08	58.23
Инденопирен	$C_{22}H_{12}$	21.23	3.18	85.02

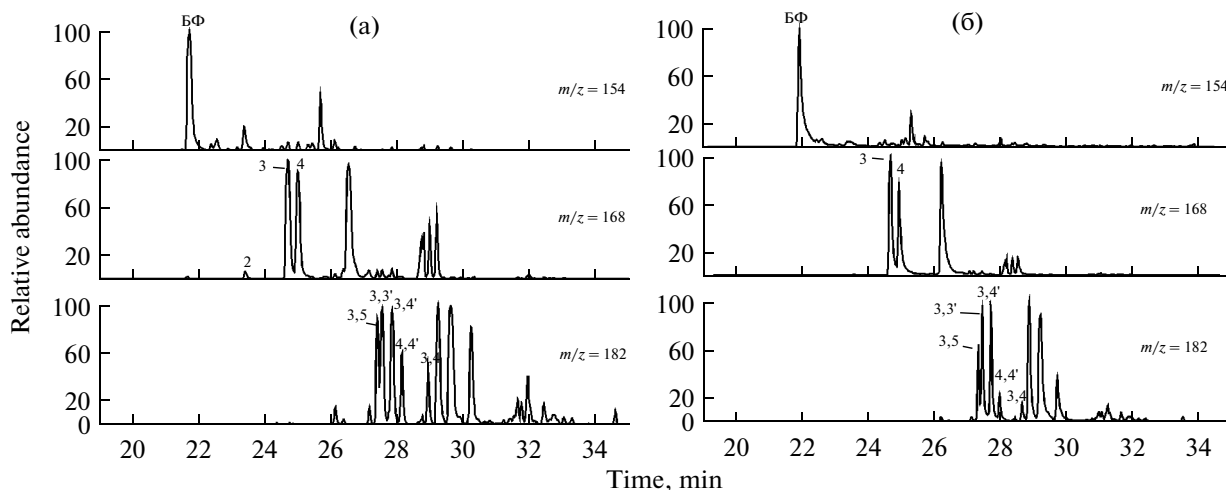


Рис. 2. Масс-фрагментограмма распределения бифенила (БФ) ($m/z = 154$) и его алкилзамещенных гомологов ($m/z = 168, 182$) в исходном (а) и подверженном биодеструкции (б) образцах.

пень деструкции более высокомолекулярных ПАУ выше, чем более низкомолекулярных.

Ранее было показано, что биодegradация алкилзамещенных ароматических соединений идет легче, чем голаядерных [19], т.к. окисление происходит главным образом по месту присоединения боковой цепи, а отсутствие открытых терминальных метильных групп осложняет первичное окисление. В данном опыте окисление некоторых голаядерных аренов — флуорена, пирена, хризена — составило 15–19%, а окисление их метилзамещенных гомологов — от 23 до 57% (табл. 2). Однако деструкция, например, голаядерного бифенила и перилена составила 65.9 и 80.3%, а деструкция их алкилзамещенных гомологов всего 11.3–12.2 и 47.6–49.4% соответственно (табл. 2). Это свидетельствует о неравномерности протекающих процессов биоконверсии ПАУ в культуральной среде.

Также отмечено, что при деструкции смеси ПАУ консорциумом УОМ не происходило накопления пента- и гексаароматических компонентов, следовательно, в процессе биоокисления не было конденсации продуктов частичной деструкции.

При биодеструкции произошли изменения в составе метил- и диметилзамещенных гомологов бифенила (БФ) (рис. 2). В биодegradированном образце (рис. 2б) снизилось содержание 4-метил-БФ по отношению к 3-метил-БФ ($m/z = 168$), полностью исчез 2-метил-БФ. В составе диметил-БФ ($m/z = 182$) уменьшилась концентрация 3,5-, 4,4'- и 3,4-диметил-БФ, а содержание 3,3'- и 3,4'-диметил-БФ осталось неизменным.

В составе гомологов триаренов также произошли изменения: значительно снизилась концентрация незамещенного антрацена (АН) и исчезли его метилзамещенные гомологи (2-МАН) (рис. 3б). Незначительные изменения произошли в группе ди-

метилзамещенных гомологов фенантрена (Ф). В образце после деструкции отмечено более низкое содержание 3-этил-Ф (3-Э), 9,2- и 3,6-, 2,3-, 1,9-диметил-Ф по сравнению с исходным образцом (рис. 3а).

Неравномерность окисления разных ПАУ связана с их различной доступностью для биоокисления, которая, как показано в данной работе, не всегда напрямую коррелирует со строением молекулы и молекулярной массой, а может зависеть от других факторов, возможно, от особенностей метаболизма конкретного штамма микроорганизмов. Таким образом, биодеструкция ПАУ протекает по различным механизмам, и зависит от различных факторов, как биотических (состав ассоциации микроорганизмов, промежуточные продукты окисления и т.д.) так и абиотических (содержания кислорода и макроэлементов, температуры и т.д.).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследован процесс микробной деструкции многокомпонентной смеси ПАУ в жидкой минеральной среде. В процессе деструкции численность внесенных УОМ в процессе культивирования увеличивается от 0.25×10^4 до 11×10^8 КОЕ/мл среды, а также значительно возрастает активность всех изучаемых ферментов.

Ассоциация исследуемых УОМ в большей или меньшей степени разрушает все компоненты смеси ПАУ. Общая биодеструкция би-, три-, тетра-, пента- и гексааренов в среднем составила 44.7, 28.8, 33.8, 52.6 и 68.4% соответственно.

Показана неоднозначная зависимость степени деструкции ПАУ от числа колец в них, молекулярной массы и расположения алкильных заместителей: некоторые пента- и гекса-арены подверга-

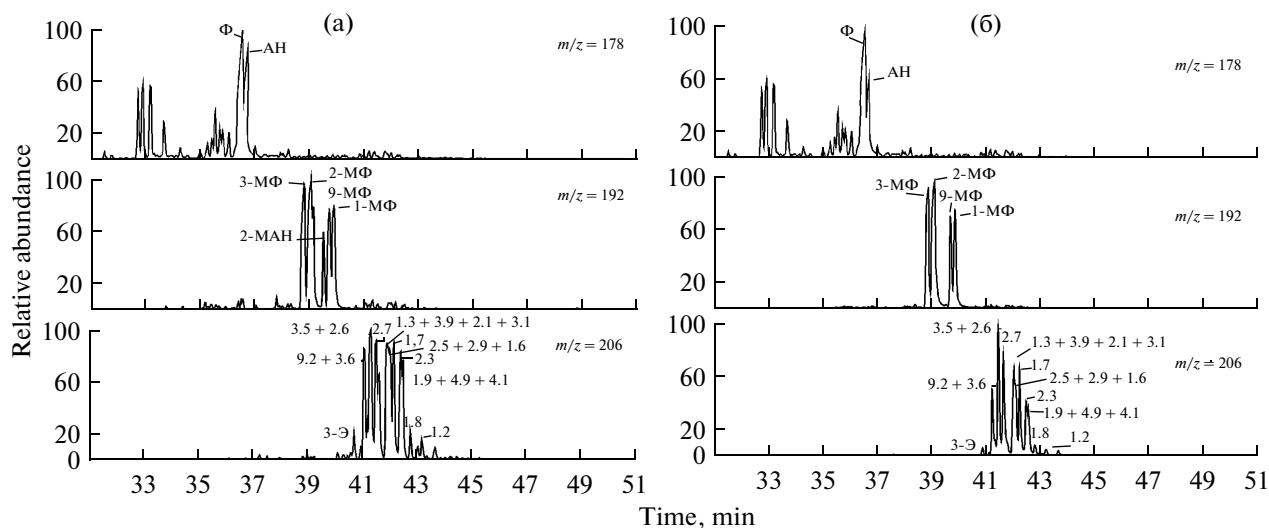


Рис. 3. Масс-фрагментограмма распределения фенантрена (Ф) и антрацена (АН) ($m/z = 178$) и их алкилзамещенных гомологов ($m/z = 192, 206$) в исходном (а) и подверженном биодеструкции (б) образцах.

лись большей конверсии, чем отдельные соединения с 2-мя, 3-мя и 4-мя кольцами в молекуле.

На основании экспериментальных и литературных данных нами было выдвинуто предположение о том, что скорость разрушения ПАУ, различающихся по своим свойствам, зависит не только от их строения, структуры и биодоступности, но и от состава консорциума углеводородокисляющих микроорганизмов и других факторов.

В целом, исследуемая ассоциация УОМ обладает высокой активностью по отношению к ПАУ разного строения и молекулярной массы и может быть использована в процессах очистки сточных вод и загрязненной почвы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации по Соглашению о предоставлении субсидии № 14.607.21.0022 от 05.06.2014, уникальный идентификатор – RFMEFI60714X0022 в рамках ФЦП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Оборин А.А., Хмурчик В.Т., Иларионов С.А., Назаров А.В. Нефтезагрязненные биоценозы. Пермь: Изд-во ПГУ, 2008. 511 с.
- Habe H., Omori T. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2003. V. 67. № 2. P. 225.
- Juhasz A.L., Naidu R. // Int. Biodeterioration and Biodegradation. 2000. V. 45. № 1. P. 57.
- Leneva N.A., Golovleva L.A., Kolomytseva M.P., Baskunov B.P. // App. Biochem. and Microbiol. 2009. V.45. № 2. P. 169.
- Kolomytseva M.P., Golovleva L.A., Rubashko G.E. // App. Biochem. and Microbiol. 2006. V. 42. № 4. P. 169.
- Rojas-Avelizapa N.G., Cervantes-Gonzalez E., Cruz-Camarillo R., Rojas-Avelizapa L.I. // Bulletin of environmental contamination and toxicology. 2002. № 69. P. 835.
- Solanas A.M., Pares R., Bayona J.M, Albaiges J. // Chemosphere. 1984. № 6.13. P. 593.
- Kanaly R.A., Harayama S. // J. Bacteriol. 2000. V. 182. № 8. P. 2059.
- Launen L., Pinto L., Wiebe C., Moore M. // Can. J. Microbiol. 1995. V. 41. № 6. P.477.
- Филатов Д.А., Сваровская Л.И., Кочетов В.Г., Се лявский В.Ю. // Биотехнология. 2013. № 6. С. 57.
- Звягинцев Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. М.: МГУ. 1991. 231 с.
- Хазиев Ф.Х. Методы почвенной энзимологии. М.: Наука, 2005. 252 с.
- Другов Ю.С., Родин А.А. Анализ загрязненной почвы и опасных отходов. Практическое руководство. М.: Бином, 2007. 263 с.
- Bushnev D.A. // Petrol. Chemistry. 2002. V. 42. № 5. P. 291.
- Karpenko E.V., Vil'danova-Martishin R.I., Shcheglova N.S., Pirog T.P., Voloshina I.N. // App. Biochem. and Microbiol. 2006. V. 42. № 2. P. 156.
- Филатов Д.А., Овсянникова В.С., Алтунина Л.К., Сваровская Л.И. // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2012. № 1(2). С. 106.
- Filatov D.A., Gulaya E.V., Svarovskaya L.I., Altunina L.K. // Petrol. Chemistry. 2013. V. 53. № 1. P. 59.
- Тимергазина А.Ф., Переходова Л.С. // Нефтегазовая геология. Теория и практика. 2012. № 1. С. 1.
- Filatov D.A., Gulaya E.V., Svarovskaya L.I., Altunina L.K. // Biotechnol. in Russia. 2012. № 4. P. 63.