

ISSN 0206-5657

ВІСНИК
ЛЬВІВСЬКОГО
УНІВЕРСИТЕТУ

СЕРІЯ БІОЛОГІЧНА

Випуск 76

2017

VISNYK | **ВІСНИК**
OF THE LVIV | **ЛЬВІВСЬКОГО**
UNIVERSITY | **УНІВЕРСИТЕТУ**

Series Biology | **Серія біологічна**

Issue 76 | **Випуск 76**

Scientific journal | Збірник наукових праць

Published 3–4 issues per year | Виходить 3–4 рази на рік

Published since 1962 | *Видається з 1962 року*

Ivan Franko | Львівський національний
National University of Lviv | університет імені Івана Франка

2017

Друкується за ухвалою Вченої ради
Львівського національного університету
імені Івана Франка
Протокол №43/12 від 6 грудня 2017 р.

Свідоцтво про державну реєстрацію серія
КВ №14810-3581Р від 28 жовтня 2008 р.,
перереєстровано як фахове видання України
(наказ МОН №528 від 12.05.2015 р.). Видання
включене до Thomson Scientific Master Journal
List (список ISI)

У “Віснику Львівського університету. Серія біологічна” опубліковані статті з актуальних проблем біології. Для наукових працівників, аспірантів і студентів старших курсів.

Papers on current problems in biology are published in the Visnyk. For scientific staff, Ph. D. students and Bachelors.

Редакційна колегія:

д-р біол. наук, проф. *В. Федоренко* – головний редактор; д-р біол. наук, проф. *В. Манько* – заступник головного редактора; *Н. Цимбалюк* – секретар; д-р біол. наук, проф. *С. Волгін* (Східноєвропейський національний університет імені Лесі Українки); канд. біол. наук, проф. *С. Гудзь*; д-р біол. наук *А. Бабський*; канд. біол. наук, доц. *І. Хамар*; д-р біол. наук *М. Козловський* (Інститут екології Карпат НАН України); канд. біол. наук, доц. *З. Мамчур*; д-р біол. наук, проф. *Н. Сибірня*; д-р біол. наук, проф. *Д. Санагурський*; канд. біол. наук, проф. *С. Гнатуш*; чл.-кор. НАН України, д-р біол. наук, проф. *Р. Стойка*; д-р біол. наук, проф. *Л. Тасенкевич*; д-р біол. наук, проф. *О. Терек*; д-р біол. наук, проф. *Н. Федірко*; д-р біол. наук, проф. *Й. Царик*; д-р біол. наук, проф. *Ю. Чорнобай* (Державний природознавчий музей НАН України); д-р біол. наук, проф. *Г. Антоняк*; д-р біол. наук *Б. Осташ*, канд. біол. наук *О. Головачов*; канд. біол. наук *М. Ватаманюк*; канд. біол. наук *О. Ватаманюк*; д-р біол. наук, проф. *М. Доліба*; д-р біол. наук *А. Лужецький*; канд. біол. наук, проф. *І. Медина*.

Dr. Biol. Sci., Professor *V. Fedorenko* – Editor-in-Chief

Dr. Biol. Sci., Professor *V. Manko* – Assistant Editor

N. Tymbalyuk – Managing Editor

Відповідальні за випуск: *В. Федоренко, Н. Цимбалюк*

Адреса редколегії:

Львівський національний університет
імені Івана Франка, біологічний факультет
вул. Грушевського, 4
Львів 79005, Україна
тел.: (032) 239-47-86

Editorial office address:

Ivan Franko National University
of Lviv, Biology faculty
4, Hrushevskiy St.
Lviv 79005, Ukraine
tel. (032) 239-47-86

E-mail: biovisnyk@franko.lviv.ua

<http://www.lnu.edu.ua/faculty/biologh/wis/wis.htm>

Редактор: *Л. СІДЛОВИЧ*

Комп'ютерна верстка: *В. ДЕМЧУК*

АДРЕСА РЕДАКЦІЇ, ВИДАВЦЯ І ВИГОТОВЛЮВАЧА:

Львівський національний університет
імені Івана Франка
вул. Університетська, 1, Львів 79000, Україна
Свідоцтво про внесення суб'єкта видавничої
справи до Державного реєстру видавців,
виготівників і розповсюджувачів видавничої
продукції. Серія ДК №3059 від 13.12.2007 р.

Формат 70x100/₁₆
Ум. друк. арк. 19,2
Тираж 100 прим. Зам.

© Львівський національний університет
імені Івана Франка, 2017

**РОЛЬ СТРУКТУРИ САРКОМЕРУ В СИНХРОНІЗАЦІЇ РОБОТИ
ПОПЕРЕЧНИХ МІСТКІВ: ТЕОРЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ СХІДЧАСТИХ ЗМІН
ДОВЖИНИ У ПРОСТОРОВО РОЗПОДІЛЕНІЙ СТОХАСТИЧНІЙ МОДЕЛІ**

А. Міщенко, Г. Тарадіна

*Донецький національний університет імені Василя Стуса
вул. Академіка Янгеля, 4, Вінниця 21007, Україна
e-mail: a.mishchenko@donnu.edu.ua*

Низка фізіологічних властивостей м'яза реалізується завдяки взаємозв'язку структури та функції. Однак багато аспектів цих взаємовідносин залишаються нез'ясованими. Приклад такого зв'язку – це стрибкоподібні зміни довжини саркомерів. У рамках просторово розподіленої стохастичної моделі півсаркомеру були відтворені стрибкоподібні зміни його довжини в ізотонічному режимі. Статистика сходинок у траєкторії зміни довжини, яка була отримана в моделі, подібна до такої, що спостерігається в експерименті. Проаналізовано молекулярний механізм формування сходинок. Сходинки, що спостерігаються у траєкторії, є проявом синхронної роботи поперечних містків півсаркомеру. В основі механізму, що синхронізує роботу окремих поперечних містків, лежать обмеження, які накладає структура ґратки півсаркомеру на взаємодію міозину з актином. Ключове обмеження стосується взаємних відстаней між поперечними містками та зв'язувальними центрами на актині. У дискретній ґратці, де поперечні містки та зв'язувальні центри розташовані періодично, ця відстань також буде дискретною величиною. Завдяки залежності кінетики від деформації всі містки півсаркомеру поділяють на низку дискретних груп із різними хімічними властивостями. Ще одна необхідна умова для виникнення синхронізації – нелінійність залежних від деформації констант швидкості переходів у механохімічному циклі, що сполучені з виконанням робочого ходу поперечного містка. Кількісно показано зв'язок параметрів стрибкоподібного руху з параметрами ґратки півсаркомеру, а саме, періодичністю розташування поперечних містків і зв'язувальних центрів на товстих і тонких філаментах, відповідно.

Ключові слова: саркомер, східчасті зміни довжини, просторово розподілена модель, геометрія ґратки саркомеру, молекулярний механізм

Головним компонентом скоротливого апарату м'язів є молекули міозину, що взаємодіють із молекулами актину, створюючи роботу. В поперечносмугастих м'язах молекули міозину є частиною структури саркомеру; це обмежує їхнє просторове положення, модулює їхню взаємодію з молекулами актину. Робота і властивості цих молекул як складової саркомеру можуть значним чином відрізнитися від таких для сукупності ізольованих молекул. Спільне функціонування в межах однієї структури створює колективні ефекти в роботі цих молекул. Прикладом цього є стрибкоподібні зміни довжини саркомерів [7–10]. На відміну від м'язового волокна, скорочення якого в стаціонарному режимі відбувається по лінійній траєкторії, на рівні саркомерів процес скорочення має стрибкоподібний характер: швидкі зміни довжини чергуються з паузами, де довжина саркомеру майже не змінюється. Розмір сходинок у такій траєкторії кратний значенню 2,7 нм. Це значення збігається з періодичністю розташування актинових мономерів уздовж тонкого філамента. Аналогічне

стрибокподібне ковзання також спостерігають на рівні окремих пар актинового та міозинового філаментів [6].

Такий характер скорочення означає, що містки півсаркомеру мають діяти синхронно. Однак молекулярний механізм такої синхронізації, роль структури саркомеру в ній, а також кількісний зв'язок із мікроскопічними параметрами окремих поперечних містків і параметрами структури залишаються нез'ясованими. Експериментальні дослідження механізму на такому рівні організації, зрозуміло, стикаються з об'єктивними труднощами.

Східчастий режим скорочення було отримано теоретично в деяких моделях [3, 9]. Характерною особливістю цих моделей був їхній дискретний характер, у сенсі дискретності значень відстаней між містками та зв'язуючими центрами на актині. У роботі [3] розмір сходинок приблизно дорівнював величині робочого ходу. Синхронізацію роботи містків пояснювали наявністю координації в їхній роботі, яка базується на механічній взаємодії зв'язаних поперечних містків через тонкий філамент. У роботі [9] розмір сходинок становив 7 нм, що, як зазначено в цій роботі, приблизно дорівнювало різниці періодичності розташування поперечних містків і зв'язувальних центрів на товстих і тонких філаментах [9]. Недоліком теоретичних досліджень у наведених роботах є: 1) відсутність кількісного збігу розміру сходинок з експериментальним значенням; 2) відсутність пояснення зв'язку між величиною сходинок і геометричними параметрами ґратки саркомеру; 3) відсутність аналізу механізму утворення сходинок, розмір яких у кілька разів більший, ніж розмір елементарної сходинок (2,7 нм).

Метою даної роботи було в рамках просторово розподіленої стохастичної моделі півсаркомеру відтворити режим східчастих змін довжини півсаркомеру, що є подібним до експериментального; запропонувати молекулярний механізм таких східчастих змін довжини, з'ясувати природу синхронізації роботи поперечних містків, знайти зв'язок між розміром сходинок та мікроскопічними параметрами, що характеризують структуру саркомеру чи/та властивості окремих поперечних містків.

Матеріали та методи

Модель. У роботі була використана раніше розроблена нами просторова розподілена модель півсаркомеру [1]. Ця модель була побудована в рамках підходу, запропонованого в роботі [2]. Модель розглядає роботу м'яза на рівні півсаркомеру, деталізуючи роботу останнього до рівня механохімічного стану окремих поперечних містків, однієї пари товстого й тонкого філаментів (рис. 1). Також модель враховує наявність еластичності скорочувальних філаментів. Параметри механічної частини моделі обирали на основі параметрів моделей [2, 4]. На відміну від моделі [2], в роботі [1] як кінетичну частину моделі було використано кінетичну частину моделі з роботи [4], що дає змогу, крім механіки скорочення, більш адекватно відтворити також і механіку розтягування м'язового волокна. З іншими деталями реалізації моделі та її параметрами можна ознайомитись у роботі [1]. Тут ми коротко розглянемо тільки ті моменти моделі [1], які є важливими з точки зору даного дослідження. Поперечні містки на товстому філаменті та зв'язувальні центри на тонкому розташовані з періодами $l_{mn} = 14,3$ нм та $l_{an} = 5,5$ нм, відповідно. Жорсткість товстого й тонкого філаментів становить $k_{mn} = 6060$ пН/нм і $k_{an} = 11818$ пН/нм для сегментів завдовжки l_{mn} та l_{an} , відповідно (рис. 1). Кожен поперечний місток має у своєму складі еластичний елемент, жорсткість якого $k_{cb} = 7,5$ пН/нм. Загалом налічується $N=20$ поперечних містків на товстому філаменті та $M=150$ зв'язувальних центрів на тонкому. За умови повного перекриття міозину актином, кожен із поперечних містків характеризується своєю відстанню до найближчого зв'язувального центра праворуч Δ , а також деформацією ϵ_i його еластич-

ного елемента. Величини Δ та ε_i лінійно пов'язані між собою, ε_i залежить від поточного i -го хімічного стану містка ($\varepsilon_i = \Delta - d$ для $i = 1, 2$ та $\varepsilon_i = \Delta$ для $i = 3, 4$). Сила, що генерується зв'язаним поперечним містком, дорівнює $k_{cb}\varepsilon_i$.

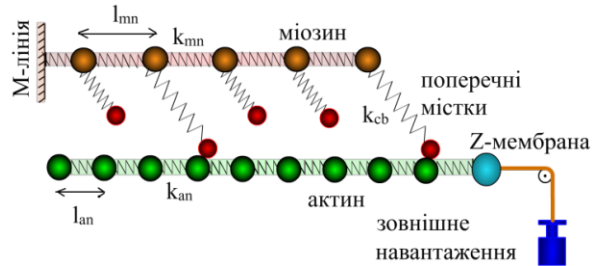


Рис. 1. Механічна модель півсаркомеру

Важливе припущення моделі – це залежність від деформації ε_i швидкості хімічних взаємодій між даним містком і актином. Механохімічний цикл поперечних містків (рис. 2) включає чотири стани: вільний стан 1 (об'єднує $M\cdot ATP$, $M\cdot ADP\cdot P$ та $M\cdot ADP$), слабозв'язаний стан 2 (або $A\cdot M\cdot ADP\cdot P$), перший сильнозв'язаний стан 3 (або $A\cdot M\cdot ADP$), другий сильнозв'язаний стан 4 (або $A\cdot M$). Якщо при зв'язуванні головка поперечного містка розташована точно над зв'язувальним центром ($\Delta = d$), то у слабозв'язаному стані місток не генерує сили, оскільки його деформація дорівнює нулю ($\varepsilon_2 = \Delta - d = 0$). Перехід у перший сильнозв'язаний стан пов'язаний з виконанням робочого ходу, який збільшує деформацію еластичного елемента поперечного містка на $d=4$ нм. Деформація поперечного містка, який має $\Delta = d$, після переходу $2 \rightarrow 3$ буде дорівнювати $\varepsilon_3 = \Delta = d$.

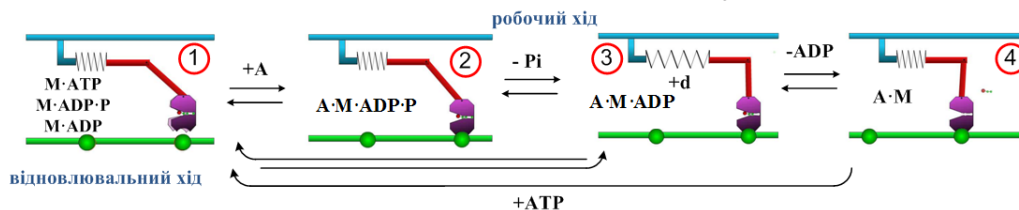


Рис. 2. Чотиристадійний механохімічний цикл поперечних містків. На схемі використано такі позначення: М – міозин, А – актин, Р – неорганічний фосфат, АТФ – АТФ, АДФ – АДФ

У подальшому як незалежну змінну на всіх графіках величин, що залежать від деформації еластичного елемента поперечного містка, ми будемо використовувати величину деформації містка у слабозв'язаному стані – ε_2 . Це спрощує візуальне порівняння величин, що залежать від ε_i з різними i . Далі для спрощення замість ε_2 ми також будемо використовувати позначення ε ($\varepsilon \equiv \varepsilon_2$). На відміну від деформацій у інших зв'язаних станах, ε_2 не включає в себе деформації завдяки внутрішнім конфірмаційним змінам містка (d).

Константи швидкостей k_{ij} переходів $i \rightarrow j$ у механохімічному циклі на рис. 2 в загальному випадку є функцією деформації ε_i . Залежності констант швидкостей $k_{ij}(\varepsilon)$ наведені на рис. 3, а (врахуйте, що, наприклад, крива $k_{34}(\varepsilon_3)$ може бути отримана з $k_{34}(\varepsilon)$ зміщенням її вправо на 4 нм).

Разом із графіками $k_{ij}(\varepsilon)$ для подальшого аналізу буде корисно представити стаціонарні заселеності поперечних містків для цих констант швидкостей при різних ε . Із рис. 3, б можна побачити, якими будуть в ізометричному режимі стаціонарні співвідношення між кількістю містків у різних хімічних станах, якщо всі вони мають деформацію ε .

Симуляція ізотонічного скорочення. У даній роботі в рамках моделі [1] проводили симуляцію ізотонічного скорочення. Скороченню передувала активація півсаркомеру в ізометричному режимі. Під час симуляції реєстрували траєкторію зміни довжини півсаркомеру, а також динаміку механохімічних станів окремих поперечних містків півсаркомеру. На основі динаміки стану популяції містків обчислювали динаміку розподілів $n_i(\varepsilon)$ заселеності поперечних містків у різних хімічних станах залежно від їхньої деформації.

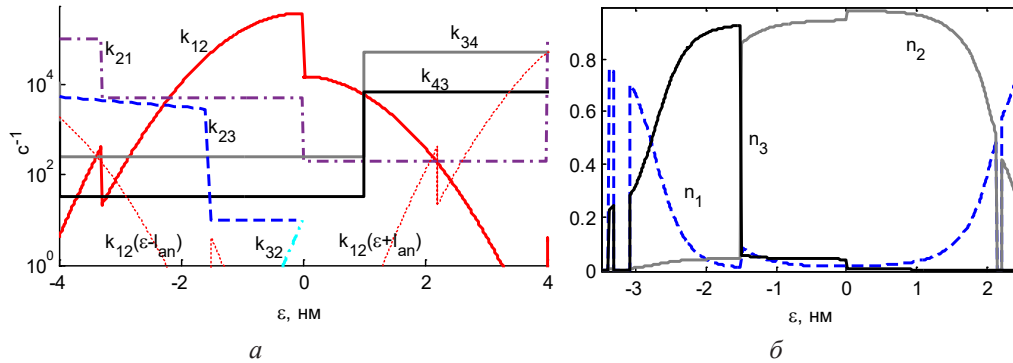


Рис. 3. Константи швидкостей k_{ij} деяких переходів $i \rightarrow j$ (а) і стаціонарні розподіли заселеності $n_i(\varepsilon)$ містків у вільному стані та двох перших зв'язаних, в ізометричному режимі (б). Заселеність стану n_4 не показана, оскільки він є малозаселеним

Аналіз траєкторій. Для автоматичної ідентифікації сходинок у траєкторії переміщення актину використовували два методи. Перший – це самостійно розроблена процедура, що використовує дискретне вейвлет перетворення. Другий метод був реалізований з використанням процедури, запропонованої в роботі [5]. Ідентифікацію повторно проводили для 500 реалізацій траєкторій (кожна тривалістю 0,5 с), що були отримані для певного значення ізотонічного навантаження. Результати представляли у вигляді нормованих гістограм розподілу розміру сходинок.

Чисельна реалізація. Для симуляції кінетичних переходів окремих поперечних містків у моделі півсаркомеру використовували метод Монте-Карло. Модель була реалізована у вигляді багатопоточного консольного додатку, написаного мовою C++ (Visual Studio 2008; Microsoft). Процедура для автоматичної ідентифікації сходинок траєкторій була реалізована в пакеті MATLAB (MathWorks).

Дискретність набору деформацій. Для подальшого аналізу результатів, отриманих у рамках моделі, також необхідно розглянути її деякі властивості, що впливають з її визначення. На відміну від моделей типу класичної моделі Хакслі, де відстань Δ є безперервною величиною, в моделях із дискретною ґраткою півсаркомеру відстань від поперечного містка до найближчого зв'язувального центру праворуч або ліворуч буде дискретною величиною (відповідно, деформації еластичних елементів містків також будуть дискретними величинами). Встановимо характеристики дискретної множини Δ .

Припустимо, що ми маємо безконечно довгі товстий і тонкий філаменти, які є абсолютно жорсткими. Якщо ми оберемо на товстому філаменті місток із номером i , то уздовж міозину можна знайти місток із номером $i + n_{cb}$, який буде мати таку ж відстань Δ до найближчого праворуч зв'язувального центру на актині, як i у i -го містка. Всі містки з i -го по $(i + n_{cb} - 1)$ -й будуть мати унікальні відстані Δ , далі (починаючи з містка $i + n_{cb}$) цей набір Δ (патерн) буде повторюватися.

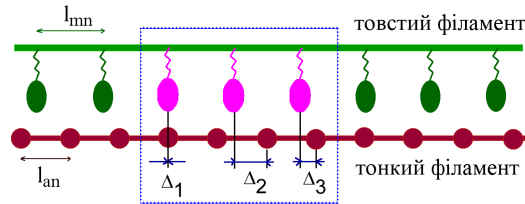


Рис. 4. Патерн можливих значень величини Δ . У прикладі на рисунку період патерну становить $n_{cb} = 3$ (містки, що виділені рамкою). У межах патерну всі містки мають різні відстані Δ_i . Містки праворуч або ліворуч від виділеного патерну будуть мати такі самі набори Δ_i

Величина періоду n_{cb} може бути отримана шляхом розв'язання рівняння:

$$l_{mn} n_{cb} = l_{an} n_{bs}, \quad (1)$$

де n_{cb} і n_{bs} – невідомі цілі числа, причому вони мають бути найменшими з можливих. Інакше кажучи, нам необхідно знайти, в яке мінімальне ціле число (n_{cb}) відстаней l_{mn} укладеться ціле число (n_{bs}) відстаней l_{an} . Усі n_{cb} унікальних відстаней будуть залежати від поточного взаємного зміщення $\Delta_{\chi_{hs}}$ між товстим і тонким філаментами, однак у будь-якому разі два будь-які найближчі значення в цьому наборі завжди відрізняються на s . Величина s дорівнює:

$$s = l_{mn} / n_{bs} = l_{an} / n_{cb} \quad (2)$$

У разі нашої моделі періодичність патерну поперечних містків становить $n_{cb} = 5$, можливі відстані Δ у дискретному наборі йдуть із кроком $s=1,1$ нм.

Також слід зазначити, що фактична структура множини дискретного набору деформацій може залежати від кількості поперечних містків і ступеня перекриття актину й міозину, якщо ця кількість не кратна n_{cb} .

Наслідком дискретності відстаней $\Delta \in (-d; l_{an} - d)$ буде дискретність деформацій та кінетичних властивостей поперечних містків. Оскільки константи хімічних переходів $k_{ij}(\epsilon_i)$ залежать від деформації еластичного елемента ϵ_i , ми будемо мати у півсаркомері скінченний набір груп містків, кожна з яких має однакові кінетичні властивості. При зсувах актину щодо міозину на величину $\Delta_{\chi_{hs}}$ деформації всіх зв'язаних містків змінюються на $\Delta_{\chi_{hs}}$ (це твердження є точним лише стосовно півсаркомеру з жорсткими філаментами, у разі еластичних філаментів воно має приблизний характер), а отже, й кінетичні властивості містків кожної з груп також змінюються. Яким чином будуть відбуватися ці зміни, можна оцінити з рис. 3. Із рис. 3, б видно, що весь діапазон ϵ можна умовно розділити на кілька інтервалів, при переході між якими будуть відбуватися різкі якісні зміни кінетичних властивостей поперечних містків із відповідними змінами в заселеності. Так, у групах містків, деформація яких лежить у діапазонах $\epsilon < -2,8$ нм та $\epsilon > 2,2$ нм, будуть переважати вільні містки. Причому при $\epsilon < -2,8$ нм наявні зв'язані містки представлені майже виключно слабозв'язаними містками, а при $\epsilon > 2,2$ нм – сильнозв'язаними у стані 3. У діапазоні $-2,8 < \epsilon < -1,5$ нм переважають сильнозв'язані містки 3, в діапазоні ж $-1,5 < \epsilon < 2,2$ нм – слабозв'язані.

Циклічний характер набору деформацій вільних містків. У моделі [1] передбачається, що вільні містки зв'язуються тільки з найближчим зв'язувальним центром праворуч або ліворуч. Якщо деформація, яку необхідно отримати містку для зв'язування з найближчим зв'язувальним центром праворуч $\epsilon_1 \in (0; l_{an})$, тоді деформація, яку йому треба отримати для зв'язування з найближчим центром ліворуч, дорівнює $\Delta - l_{an} \in (-l_{an}; 0)$. Якщо виконується умова

$$k_{12}(\epsilon_1) > k_{12}(\epsilon_1 - l_{an}), \quad (3)$$

відповідно [1], місток буде зв'язуватися з центром праворуч зі швидкістю $k_{12}(\epsilon_1)$, у протилежному разі – з лівим зі швидкістю $k_{12}(\epsilon_1 - l_{an})$. Виходячи з умови (3), можемо визначити

інтервал ε_1 , на якому вільний місток здатен зв'язуватися зі зв'язувальним центром праворуч або ліворуч. Якщо інтервал ε_1 , де місток зв'язується з правим зв'язувальним центром, становить $(0; \varepsilon_1^{\max} \leq l_{an})$ (інтервал зв'язування з лівим центром тоді буде $(\varepsilon_1^{\max} - l_{an}; 0)$), розподіл $n_1(\varepsilon_1)$ для вільних містків, що є функцією, визначеною в діапазоні $\varepsilon_1 \in (\varepsilon_1^{\max} - l_{an}; \varepsilon_1^{\max})$, буде підкорятися періодичним граничним умовам:

$$n_1(\varepsilon_1^{\max}) = n_1(\varepsilon_1^{\max} - l_{an}). \quad (4)$$

Розглянутий випадок, коли (3) виконується лише на одному інтервалі, можливий за умови монотонного зменшення $k_{12}(|\varepsilon_1|)$ при зростанні $|\varepsilon_1|$. Наприклад, якщо $k_{12}(\varepsilon_1)$ – парна функція (Гаусова крива), тоді з (3), $\varepsilon_1^{\max} = -l_{an}/2$. У загальному ж випадку може бути більш ніж один інтервал, на якому виконується нерівність. Так, у моделі [1] є кілька точок перетину $k_{12}(\varepsilon_1 > 0)$ з $k_{12}(\varepsilon_1 + l_{an})$, рис. 3, а, але один з інтервалів, на якому виконується (3), порівняно невеликий, і далі для простоти ми знехтуємо ним. Тож при подальшому аналізі будемо вважати, що в моделі [1] $\varepsilon_1^{\max} \approx 2,4$ нм, а граничні умови мають вигляд:

$$n_1(2,4 \text{ нм}) = n_1(-3,1 \text{ нм}). \quad (5)$$

Результати і їхнє обговорення

Східчасті траєкторії, статистика сходинок. На рис. 5 показано фрагменти траєкторій змін довжини півсаркомеру в ізотонічному режимі. У часовому масштабі хімічних перетворень окремих містків скорочення актину має стрибкоподібний характер, причому кожна зі сходинок виникає після хімічних перетворень окремих містків, усі сходинки мають малу амплітуду ($< 0,5$ нм; на рис. 5 ці миттєві зміни довжини виглядають як «шум») [1]. Але якщо розглянути ті самі траєкторії у більшому часовому масштабі, можна виявити інші сходинки, з величиною, що значно перевищує розмір елементарних сходинок ($< 0,5$ нм; на рис. 5 деякі з цих сходинок позначені стрілками, разом із зазначенням їхньої висоти). Ці великі сходинки (далі будемо називати їх великомасштабними) утворюються з безлічі елементарних сходинок однакового напрямку, що здійснюються синхронно у часі. Великомасштабні сходинки чергуються з ділянками траєкторії, де актин залишається майже нерухомим (рис. 5). Візуально отримані траєкторії схожі з траєкторіями, отриманими в експерименті, в якому реєстрували східчасті траєкторії ковзання ізольованої пари актинового та міозинового філаментів [6].

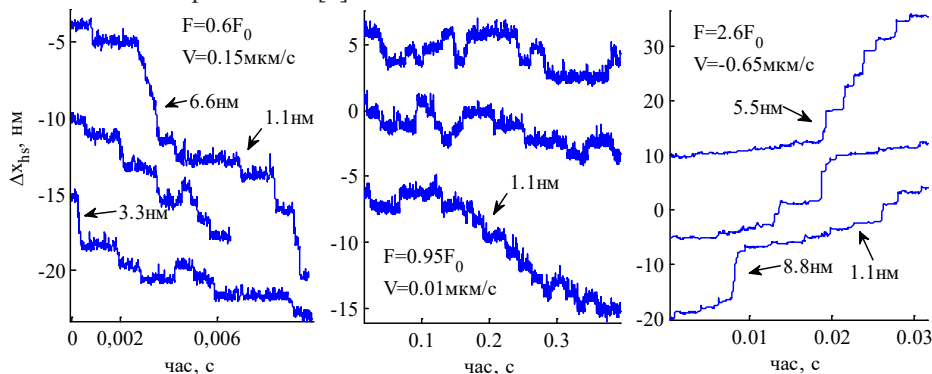


Рис. 5. Фрагменти траєкторій зміни довжини півсаркомеру (Δx_{hs}) в ізотонічному режимі для трьох різних значень зовнішнього навантаження F . Значення F (в одиницях ізометричної сили F_0), разом зі значенням середньої швидкості зміни довжини півсаркомеру V ($V > 0$ – скорочення, $V < 0$ – розтягування) зазначені на графіках. Стрілками показані деякі з великомасштабних сходинок із зазначенням їхньої приблизної висоти

Для отриманих траєкторій була виконана автоматична ідентифікація великомасштабних сходинок. Власний алгоритм ідентифікації з використанням вейвлет аналізу й алгоритм із роботи [5] дали аналогічні результати. На рис. 6 показані гістограми величини великомасштабних сходинок, які, аналогічно експериментальним [8], мають полімодальний характер. Величина сходинок залежно від зовнішнього навантаження може досягати 6,6 нм і більше, однак вона завжди кратна величині 1,1 нм, яка збігається зі значенням величини s нашої моделі. В експерименті величина найменшої сходинок становить 2,7 нм [8]. Як і в експерименті [8], при збільшенні швидкості ковзання відбувається збільшення кількості великих сходинок щодо малих (рис. 6). Сходінки у траєкторії спостерігаються як при скороченні, так і при розтягуванні півсаркомеру, однак їхній напрямок є протилежним рис. 6. При навантаженнях, що є близькими до ізометричного, крім сходинок прямого напрямку, також спостерігаються зворотні сходінки.

Також ми отримали гістограми великомасштабних сходинок, зробивши в моделі скорочувальні філаменти абсолютно жорсткими. Ці гістограми не відрізнялися від наведених на рис. 6.

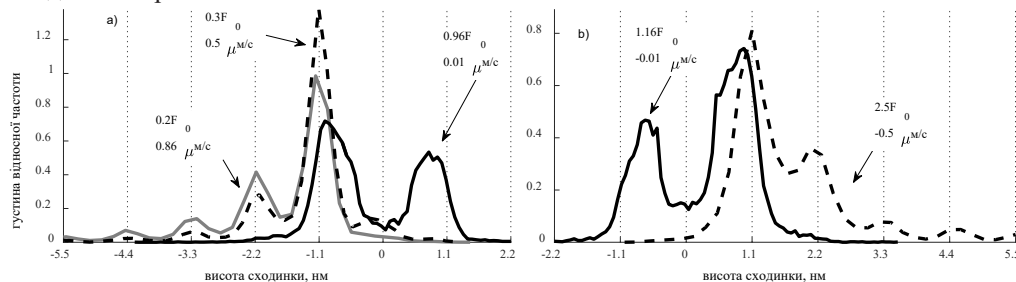


Рис. 6. Гістограми розподілу величини великомасштабних сходинок у траєкторії зміни довжини півсаркомеру при різних зовнішніх навантаженнях F . Для кожної кривої вказано значення F в одиницях ізометричної сили F_0 , а також середня швидкість ковзання. Негативні сходінки призводять до скорочення півсаркомеру, позитивні – до розтягування. Сходінки ідентифікувались автоматично за допомогою процедури, яка використовує вейвлет аналіз

Молекулярний механізм формування великомасштабних сходинок. Тепер розглянемо, які молекулярні події супроводжують формування великомасштабних сходинок у траєкторії. Для того щоби полегшити такий аналіз, було зменшено рівень випадкового шуму, що пов'язаний у моделі з випадковістю кінетичних переходів містків. Для цього кількість містків була збільшена до $N=10\ 000$. За відсутності шуму траєкторії складаються тільки з елементарних великомасштабних сходинок 1,1 нм. На рис. 7 показано фрагменти траєкторій такого півсаркомеру, на яких наявні великомасштабні сходінки.

Повна висота сходинок (плато і фази швидкої зміни довжини) на рис. 7 як при скороченні, так і при розтягуванні, становить 1,1 нм. Однак при скороченні амплітуда плато становить лише $\approx 5\%$ від загальної амплітуди сходинок, тоді як при розтягуванні вона вже сягає $\approx 45\%$.

Для того щоби пояснити спостережувані на рис. 7 зміни довжини, розглянемо динаміку стану півсаркомеру на рівні дискретних груп поперечних містків із різними деформаціями. На рис. 8 показана динаміка дискретних розподілів заселеності містків у вільному та двох перших зв'язаних хімічних станах (стан 4 є слабозаселеним, тому не розглядається). Відповідно до змін довжини півсаркомеру (див. врізання на рис. 8, *a-g*) відбувається зміщення розподілів заселеності вздовж осі деформації ϵ , при скороченні розподіли зміщуються вліво (рис. 8, *a-g*, тут зміщення всього розподілу можна бачити по зміні положення

однієї із груп містків, наприклад, групи 3), а при розтягуванні – вправо (рис. 8, *h-n*). Переміщуючись, кожна із груп містків проходить певний цикл перетворень, протягом якого відбувається перерозподіл заселеності між різними хімічними станами (при малих швидкостях ковзання це співвідношення при різних ε буде приблизно таким, як на рис. 3, *b*).

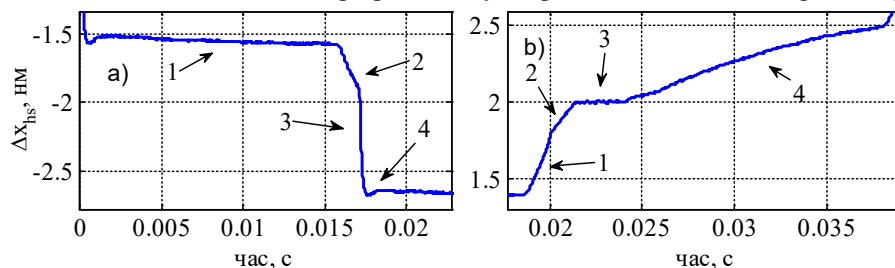


Рис. 7. Фрагменти траєкторії зміни довжини півсаркомеру ($N=20000$) в ізотонічному режимі: *a* – скорочення півсаркомеру: 1 – плато великомасштабної сходинок; 2 – перша більш повільна фаза скорочення; 3 – друга швидка фаза скорочення; 4 – перехідна фаза перед початком виходу на нове плато; *b* – розтягування півсаркомеру: 1 – фаза східчастого розтягування; 2 – уповільнення східчастого розтягування; 3 – плато; 4 – пришвидшення розтягування на плато

При скороченні діапазон можливих ε при таких переміщеннях праворуч обмежений границею ≈ 2.4 нм, саме тут у силу періодичних граничних умов (5) будуть з'являтися вільні містки, здатні зв'язуватися з правими зв'язувальними центрами. Величина границі ε ліворуч залежить від констант швидкостей, які відповідають за відрив зв'язаних містків із негативними ε , а також від швидкості скорочення.

При скороченні діапазон можливих ε ліворуч обмежений значенням $-3,1$ нм, нові групи містків з'являються на цій границі, потім рухаються вправо, проходячи зворотний цикл перетворень, поки повністю не відірвуться на правій границі діапазону ε .

Аналіз динаміки внутрішнього стану півсаркомеру під час східчастої зміни його довжини (рис. 8, *a-g*) дає таку картину формування великомасштабної сходинок та плато при скороченні на мікроскопічному рівні:

- Повільний дрейф на **плато** (рис. 8, *a-b*), обумовлений повільним збільшенням сили завдяки повільним зв'язуванням $1 \rightarrow 2$ у слабозв'язаний стан з $\varepsilon > 0$ нм (група містків 1 на рис. 8, *a-b*), а також повільним переходам $2 \rightarrow 3$ (виконання робочого ходу) для містків, що перебувають у діапазоні $-1,5 < \varepsilon < 0$ (група містків 2 і 3 на рис. 8, *a-b*).

- **Перша повільна фаза сходинок** починається з появи вільних містків на границі $\varepsilon \approx 2,4$ нм (група 6 на рис. 8, *c*, ця група виникає з групи містків 5, рис. 8, *a-b*, в силу граничних умов (5)). Зв'язуючись у слабозв'язаний стан, вони збільшують силу півсаркомеру та пришвидшують його скорочення. Також відзначимо, що містки групи 6, які вже перейшли у слабозв'язаний стан, можуть пришвидшувати ймовірність переходу $1 \rightarrow 2$ вільних містків своєї групи (позитивний зворотний зв'язок), бо, скорочуючи півсаркомер, вони зближують їх із правими зв'язувальними центрами (що, у свою чергу, збільшує для них $k_{12}(\varepsilon)$ (рис. 3, *a*)).

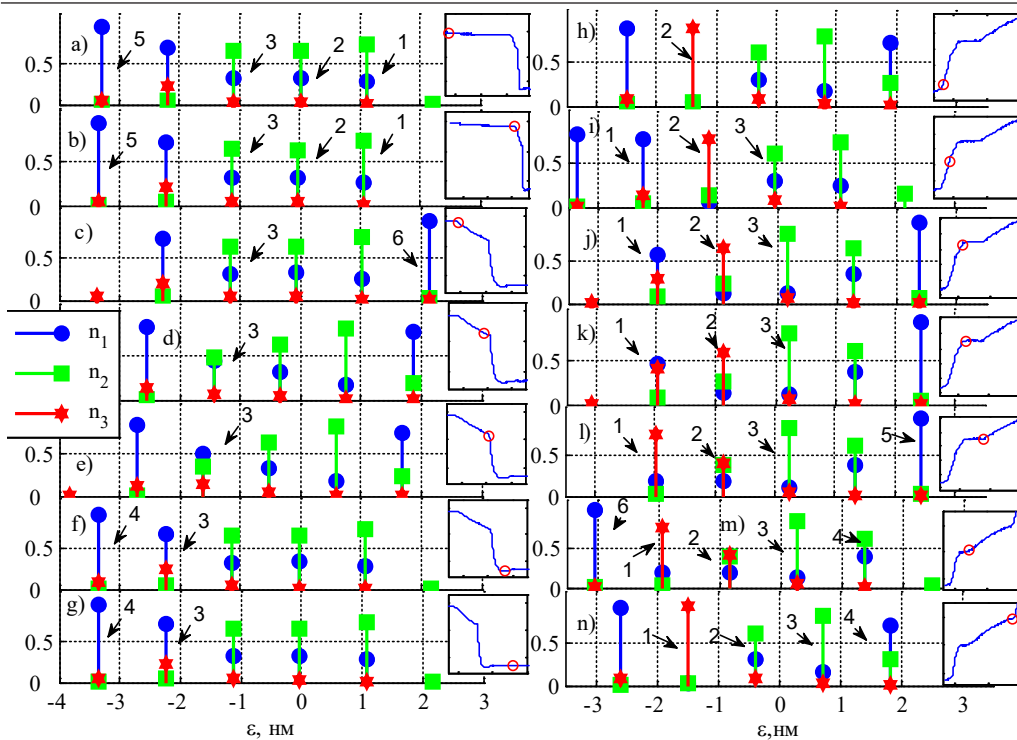


Рис. 8. Динаміка дискретних розподілів $n_i(t, \epsilon)$ заселеності поперечних містків у різних хімічних станах i , протягом здійснення півсаркомером великомасштабної сходимки при скороченні (a-g) та при розтягуванні (h-n). Розподіли, що показані на графіках (a-g), відповідають різним моментам часу. На врізаннях на кожному з графіків показано траєкторії з рис. 7. На кожній із цих траєкторій маркером вказано довжину півсаркомеру в той же момент часу, для якого побудований і розподіл. Заселеності для деяких із дискретних груп містків позначено стрілками з номерами (пояснення див. у тексті)

- Після першої фази сходимки розподіли $n_i(\epsilon)$ значно зміщуються вліво (рис. 8, c-b). Це, зокрема, збільшує негативну деформацію слабозв'язаних містків групи 3, в кінці першої фази деформація цих містків опиняється біля межі $\epsilon \approx -1,5$ нм (рис. 8, d), за якою відбувається різке збільшення $k_{23}(\epsilon)$ (рис. 3, a). Перетин цієї межі (рис. 8, e), запускає **другу фазу східчастого скорочення** – слабозв'язані містки групи 3 починають швидко переходити в сильнозв'язаний стан (рис. 8, e-f), виконуючи робочий хід. Ці переходи, у свою чергу, призводять до різкого зростання позитивної сили півсаркомеру та його різкого скорочення. Якщо при $\epsilon < -1,5$ нм константа $k_{23}(\epsilon)$ продовжує зростати, тут також працює позитивний зворотний зв'язок.

- Невеличке скорочення в кінці сходимки – результат зменшення кількості сильнозв'язаних містків у групах 3 і 4 (рис. 8, f-g).

При розтягуванні (рис. 8, h-n) події розгортаються зворотним чином до подій при скороченні. **Сходінка** у траєкторії розтягування – результат зменшення сили півсаркомеру внаслідок зменшення кількості сильнозв'язаних містків, після перетину однією з груп містків границі $\epsilon \approx 1,5$ нм (група містків 2 на рис. 8, h-i). Це зменшення кількості сильнозв'язаних містків – результат зменшення k_{23} при перетині $\epsilon > 1,5$ нм (рис. 3, a). **Уповільнення швидкості розтягування в кінці сходимки** – результат поступового збільшення

сили, що виникає завдяки двом групам містків, які перетинають границі $\varepsilon \approx -2,5$ (група містків 1 на рис. 8, *i-k*) та $\varepsilon = 0$ нм (група містків 3 на рис. 8, *i-k*). У цих групах збільшується кількість слабозв'язаних поперечних містків. **Коротке плато після сходинки** (рис. 7, *b*, ділянка 3) – результат подальшого збільшення кількості сильнозв'язаних містків у групі 1 (рис. 8, *k-l*). Дивлячись на механізм сходинки при розтягуванні в цілому (рис. 8, *h-n*), можна представити його як зменшення сили у групі містків 2 протягом усієї сходинки, яке модулюється більш короткотривалими змінами сили протягом різних фаз сходинки завдяки іншим групам. **Пришвидшення дрейфу** на плато (рис. 7, *b* ділянка 4) пов'язано з зупинкою росту сили завдяки групам 1 і 3 (рис. 8, *m-n*) на фоні продовження зменшення сили завдяки групі 2 (рис. 8, *m-n*), кінетика цієї стадії визначається кінетикою хімічних змін у групі 2.

Величина сходинок. З наведеного аналізу також стає зрозумілим, чому повна амплітуда сходинок на рис. 7 збігається зі значенням періоду s . Періодичний характер траєкторій також означає періодичність змін стану популяції поперечних містків. Ця зміна відбувається у просторі ε та часі. Дискретність розподілів заселеності поперечних містків накладає обмеження на величину періоду просторових змін, механохімічний стан популяції поперечних містків може повторитися тільки при зміщеннях розподілів на величину, яка кратна відстані s (відстані між сусідніми стовпчиками розподілів).

У нашій моделі цикл змін розподілів триває доти, доки кожна з груп містків не займає місце сусідньої групи (з найближчим значенням ε до її власного), яке вона мала на початку циклу (наприклад, група 2, в кінці циклу (рис. 8, *f*), займе місце групи 3, яке вона мала на початку циклу (рис. 8, *f*), тому сумарна амплітуда сходинки буде збігатися зі значенням s . Теоретично також можливий сценарій, коли цикл буде тривати кілька s , у такому разі величина мінімальної великомасштабної сходинки буде у стільки ж разів більшою за s .

У формуванні великомасштабних сходинок, які є більшими за мінімальну (1,1 нм) в ціле число разів (рис. 6), ключову роль може відігравати шум. Кожна з таких великих сходинок складається з кількох мінімальних, що трапляються в часі майже одна за одною. Відносна кількість таких великих сходинок починає збільшуватися зі збільшенням швидкості скорочення чи розтягування. Півсаркомер скорочується з великою швидкістю при навантаженнях, що є значно меншими за ізометричне. Малі навантаження будуть збільшувати ймовірність хімічних переходів, що призводять до скорочення, також такі переходи в середньому буде викликати більше скорочення довжини, ніж при великих навантаженнях. Це зменшує тривалість пауз великомасштабних сходинок і робить більш ймовірною подію, коли декілька хімічних переходів, що викликають скорочення, виникнувши один за одним, перекинуть групу містків із деформаціями, що є близькими до $\varepsilon \approx -1,5$ нм через це граничне значення. При навантаженнях, які є значно більшими за ізометричне, буде, навпаки, зростати ймовірність і величина механічної реакції хімічних переходів, що призводять до розтягування, а це, знову ж таки, зумовлює збільшення ймовірності перетину $\varepsilon \approx -1,5$ нм зліва направо.

Відмінність мінімальної величини великомасштабних сходинок, отриманих у моделі (1,1 нм), від експериментального значення (2,7 нм) пов'язана з вибором параметрів l_{an} та l_{mn} у моделі. Під час розробки моделі [1] не стояла мета отримати східчасті зміни довжини, подібні до експериментальних. Але обравши інші l_{an} та l_{mn} , відповідно до (1) та (2), ми легко можемо отримати висоту сходинки, що в тому числі дорівнює і 2,7 нм. Крім того, як ми бачили, часові характеристики окремих фаз сходинки, а також їхній вклад у загальну амплітуду сходинки залежать від $k_{ij}(\varepsilon)$, тож сценарій молекулярного механізму, отриманий у рамках моделі [1], не є єдино можливим. Узагальнення механізму потребують подальших більш систематичних досліджень.

1. У рамках моделі [1] отримано траєкторії зміни довжини півсаркомеру в ізотонічному режимі, які мають східчасту форму. Статистика сходинок, а також її залежність від швидкості ковзання, подібна до такої, що спостерігається в експерименті.

2. Наявність сходинок є проявом синхронної роботи поперечних містків півсаркомеру. У разі скорочення сходинок виникають завдяки синхронному виконанню робочого ходу великою групою поперечних містків, а також синхронному зв'язуванню групи вільних. Під час розтягання сходинок виникають унаслідок синхронних відривів містків зі сильнозв'язаного стану.

3. Синхронізація стає можливою завдяки дискретності деформацій еластичних елементів поперечних містків, яка наявна в моделі з дискретною ґраткою (на відміну від моделей типу моделі Хакслі, де деформація – безперервна величина). За наявності залежності констант швидкостей механохімічного циклу від деформації, ця дискретність призводить до формування груп містків із різними хімічними властивостями.

4. Ще однією необхідною умовою синхронізації є нелінійність залежних від деформації поперечних містків констант швидкості механохімічного циклу. Синхронні переходи групи містків, що мають однакову деформацію, виникають унаслідок різних змін їхніх хімічних властивостей. Вони відбуваються під час ковзання півсаркомеру, яке змінює константи швидкості.

5. Для наявності східчастих змін довжини саркомеру, швидкі синхронні переходи мають бути сполучені зі значними змінами деформації поперечних містків (наприклад, робочий хід) чи жорсткості півсаркомеру (відриви, зв'язування поперечних містків)

6. Додатковим фактором, який підсилює синхронність, може бути наявність позитивних зворотних зв'язків між змінами довжини під час синхронного переходу та його швидкістю.

7. Величина кроку зміни довжини півсаркомеру є кратною періодові дискретного набору деформацій еластичного елемента поперечних містків, яка, у свою чергу, залежить від періодичності розташування поперечних містків і зв'язувальних центрів на товстих і тонких філаментах відповідно.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Мищенко А. М., Беспалова С. В.* Пространственно распределенная модель полусаркомера с эластичным актином и миозином: зависимость скорость – сила // *Физика живого*. 2008. Т. 2. С. 38–57.
2. *Daniel T., Trimble A., Chase P.* Compliant realignment of binding sites in muscle: transient behavior and mechanical tuning // *Biophys. J.* 1998. Vol. 4. P. 1611–1621.
3. *Duke T.* Molecular model of muscle contraction // *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999. Vol. 6. P. 2770–2775.
4. *Getz E., Cooke R., Lehman S.* Phase transition in force during ramp stretches of skeletal muscle // *Biophys J.* 1998. Vol. 6. P. 2971–2983.
5. *Little M., Steel B., Bai F.* et al. Steps and bumps: precision extraction of discrete states of molecular machines // *Biophys. J.* 2011. Vol. 2. P. 477–485.
6. *Liu X., Pollack G.* Stepwise sliding of single actin and Myosin filaments // *Biophys. J.* 2004. Vol. 1. Pt 1. P. 353–8.
7. *Nagornyak E., Pollack G., Blyakhman F.* Step size in activated rabbit sarcomers is independent of filament overlap // *J. Mech. Med. Biol.* 2004. Vol. 04. P. 485–498.

8. Pollack G., Blyakhman F., Liu X., Nagomyak E. Sarcomere Dynamics, Stepwise Shortening and the Nature of Contraction // Sliding Filament Mechanism in Muscle Contraction: Fifty Years of Research. Boston, MA. Springer US. 2005. P. 113–126.
9. Smith D., Mijailovich S. M. Toward a unified theory of muscle contraction. II: predictions with the mean-field approximation // Ann. Biomed. Eng. 2008. Vol. 8. P. 1353–1371.
10. Yakovenko O., Blyakhman F., Pollack G. Fundamental step size in single cardiac and skeletal sarcomeres // Am J Physiol Cell Physiol. 2002. Vol. 3. P. C735–42.

Стаття: надійшла до редакції 28.02.17

доопрацьована 11.07.17

прийнята до друку 13.09.17

THE ROLE OF SARCOMERE STRUCTURE IN CROSS-BRIDGES ACTIVITY SYNCHRONIZATION: TEORETICAL ANALYSIS OF STEPWISE LENGTH CHANGES IN SPATIALLY EXPLICIT STOCHASTIC MODEL

A. Mishchenko, G. Taradina

Vasyl' Stus Donetsk National University
4, Akademik Yanhelia St., Vinnytsia 21007, Ukraine
e-mail: a.mishchenko@donnu.edu.ua

Different aspects of relationship between sarcomere structure and muscle function are still poorly understood. Example of such relationship is sarcomeres stepwise contraction. Spatially explicit stochastic model of half-sarcomere was used to investigate molecular mechanism of its stepwise sliding under isotonic condition. A steps length distribution that was retrieved in model is similar to that obtained in the experiment. Molecular mechanism of stepwise sliding was analyzed. Stepwise filament sliding is the result of synchronous activity of the cross-bridges. Mechanism is based on a restrictions imposed by sarcomere lattice geometry on actin-myosin interactions. The key restriction concerns of mutual distances of cross-bridges and actin binding sites. In discrete sarcomere lattice with periodically disposed cross-bridges and actin sites those distances are also discrete. Due to strain dependency of cross-bridge kinetic their population is divided on discrete set of groups with different kinetic properties. Another necessary condition needed for the synchronization is nonlinearity of rate constants of chemical transition that is coupled with cross-bridge power stroke. Quantitative relationship between steps length in stepwise trajectory and thick and thin filaments geometry was shown. Step length was related with periodicities of cross-bridges and actin sites.

Keywords: sarcomere, stepwise length changes, spatially explicit model, sarcomere lattice geometry, molecular mechanism

ПРОЦЕСИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ У ЗАРОДКАХ В'ЮНА ЗА ДІЇ ПОХІДНОГО ПОЛІЕТИЛЕНГЛІКОЛЮ

В. Мазур¹, Ю. Здвіжков¹, С. Мандзинець¹, М. Бура¹, О. Заїченко²

*¹Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна*

*²Національний університет «Львівська політехніка»
вул. С.Бандери, 12, Львів 79013, Україна
e-mail: mcelevych@yahoo.com*

Досліджено зміни у перебігу процесів перекисного окиснення ліпідів у зародкових клітинах в'юна упродовж раннього розвитку за наявності наночастинок, синтезованих на основі похідних поліетиленгліколю. Встановлено, що наявність даних наночастинок у середовищі інкубації зародків в'юна веде до неоднозначних змін рівня вільного перекисного окиснення ліпідів у плазматичних мембранах. Додавання 1 нмоль/л нанорозмірного полімеру в середовищі інкубації призводило до збільшення рівня ТБК-позитивних продуктів окиснення ліпідів удвічі вже на першу годину розвитку (2 бластомери). Підвищений вміст ТБК-продуктів зберігався і на подальших досліджуваних стадіях розвитку зародків. Зменшення концентрації нанополімеру в середовищі інкубації до 0,01 пмоль/л викликало періодичні зміни вмісту ТБК-позитивних продуктів. На стадії 64 бластомерів виявлено максимальний вміст ТБК-продуктів, а на стадії 8 поділу – зниження їхнього вмісту з подальшим зростанням на останній стадії синхронних поділів. Ймовірно, досліджуваний нанорозмірний полімер здатен проникати крізь плазматичну мембрану та викликати захисну реакцію шляхом інтенсифікації перекисного окиснення ліпідів зародків.

Ключові слова: зародки в'юна, перекисне окиснення ліпідів, похідні поліетиленгліколю, ембріогенез

Перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ) – один із найважливіших окислювальних процесів у організмі. На сьогодні ПОЛ вважається однією з основних причин пошкодження та загибелі клітини внаслідок дії активних форм кисню (АФК). ПОЛ – основна причина пошкодження клітинних мембран і один із універсальних механізмів реалізації токсичності ксенобіотиків. Таким чином, процеси ПОЛ розглядають як один із важливих механізмів клітинної патології, що лежить в основі багатьох негативних ефектів. Певну роль у розвитку патології відіграють проміжні та кінцеві продукти перекисного окиснення, які мають цитотоксичні й мутагенні ефекти [4]. Показники ПОЛ широко використовуються у дослідженнях окислативного стресу. Цим шляхом окислюються ненасичені жирні кислоти, що може бути причиною порушення цілісності та властивостей біологічних мембран.

Однак вільнорадикальне окиснення ліпідів властиве всім тканинам аеробних організмів у мембранах і ліпопротеїнових структурах та є вироджено-розгалуженим ланцюговим процесом. За нормальних фізіологічних умов рівень ПОЛ перебуває на невисокому рівні та підтримується завдяки рівновазі про- й антиоксидантів [6–7, 9]. ПОЛ у нормі є життєво важливою ланкою в регуляції багатьох мембранозалежних процесів і ліпідного складу мембран, у синтезі простагландинів, лейкотрієнів, тромбоксанів, стероїдних гормонів, холестеролу, в метаболізмі катехоламінів [32].

Тканини тварин мають різний для кожного органа фізіологічний рівень вмісту перекисів ліпідів, при цьому їхній рівень вищий у тканинах із високою метаболічною

активністю. Особливістю перебігу процесів ПОЛ упродовж раннього онтогенезу є зміна інтенсивності ПОЛ, як протягом окремого клітинного циклу, так і у різні періоди розвитку зародків [13]. Встановлено, що на початкових етапах раннього ембріогенезу риб інтенсивність ПОЛ низька [17], як і у незапліднених яйцеклітин [9], а загальний вміст ліпідів у зародках залишається незмінним, лише збільшується вміст фосфоліпідів [9–10], що пов'язано з високою інтенсивністю поділів клітин у перші години розвитку. Однак встановлено, що ПОЛ інтенсивно зростає упродовж ембріонального розвитку гребінця *Mizuhopecten yessoensis* [27], у мембранній фракції органів морського їжака *Strongylocentrotus intermedius* [28], ембріонів японського перепела *Coturnix japonica* (зокрема, у тканинах мозку, печінки та міокарда) [33] та палтуса *Scophthalmus maximus* [30]. Продукти ліпопероксидації здатні змінювати провідність плазматичної мембрани [13], що, у свою чергу, безпосередньо впливає на роботу систем первинного та вторинного активного транспорту [4].

Оскільки ПОЛ у першу чергу відбувається у плазматичних мембранах (ПМ), – це призводить до порушення їхніх функціональних властивостей [18, 34]. Тому під час вивчення механізмів дії чинників різноманітної природи значна увага приділяється особливостям їхньої взаємодії власне з ПМ, котра є найпершою ланкою у сприйнятті зовнішніх сигналів, проведенні та трансформації їх у клітинну відповідь і центром морфологічних перебудов зародків [3].

Молекулярне конструювання водорозчинних полімерів, які були б універсальними носіями для лікарських засобів різної природи та могли долати природні біологічні бар'єри як на тканинному, так і на клітинному рівнях [19, 22], і бути біобезпечними, є актуальним завданням сучасної біології, молекулярної біофізики та медицини [20, 21].

Утворення систем доставки, яка містить стабільний кон'югат, є дуже важливим, адже багато систем доставки ліків непридатні для використання через їхню нестабільність [23]. У роботах А. Рябцевої [11, 12] було показано, що синтезований на основі олігопероксиду з бічними епоксидними групами модифікований поліетиленгліколем олігомерний носій (ПЕГ-вмісний олігомер) є водорозчинною поверхнево-активною речовиною, що здатна іммобілізувати не розчинний у воді антибіотик левоміцетин і утворювати нанорозмірні водні системи його цільової доставки, які забезпечують підвищену антимікробну активність препарату. Дослідниками встановлено, що нанорозмірний носій є перспективною полімерною системою для доставлення протипухлинних препаратів у клітини-мішені різних пухлин ссавців [2]. Однак у попередніх дослідженнях нами встановлено інгібування активності Na^+ , K^+ -АТФази зародків [8] і морфологічні зміни розвитку личинок в'юна упродовж раннього ембріогенезу [1] за впливу ПЕГ-вмісного носія.

Оскільки зародки в'юна (*Misgurnus fossilis* L.) у період раннього ембріогенезу є зручною й адекватною тест-системою для дослідження впливу різних фармакологічних [16], фізичних і хімічних [3, 6, 10, 14] чинників на живі організми, мета роботи полягала у дослідженні характеру змін ПОЛ зародків в'юна після запліднення за дії полімерного носія, для можливого з'ясування механізмів дії новосинтезованого полімеру.

Методи та матеріали

Для досліджень використовували модифікований поліетиленгліколем полімерний носій (ПЕГ-вмісний полімерний носій), синтезований на кафедрі органічної хімії Національного університету „Львівська політехніка” [11].

Яйцеклітини одержували і запліднювали за методом Нейфаха [4]. Для отримання ікри самкам внутрішньом'язово вводили хоріогонічний гонадотропін (500 од.). Ікру одержували через 36 год після стимуляції. Сім'яники отримували після декапітації та розтину черевної порожнини самців. Ікру запліднювали в чашках Петрі суспензією спермій. Через 5–10 хв

після запліднення зиготи відмивали й інкубували при температурі 20–22 °С. Зародки в'юна в умовах контролю інкубували в розчині Гольтфретера для холоднокровних [5]. У експериментальній групі досліду зародки інкубували у розчині Гольтфретера з додаванням розчину ПЕГ-вмісного полімерного носія у середовище до отримання концентрації носія 1 нмоль/л та 0,01 пмоль/л. Дослідження проводили на зародках в'юна *Misgurnus fossilis* L. через 60, 150, 210, 270 і 330 хв після запліднення яйцеклітин під час стадій, які відповідають першому дробленню зиготи (2 бластомери), четвертому (16 бластомерів), шостому (64 бластомери), восьмому (256 бластомерів) та десятому (1024 бластомери). Стадії розвитку контролювали візуально під бінокулярним мікроскопом МБС-9 [5].

У відібраних зразках реакцією малонового діальдегіду з тіобарбітуровою кислотою (ТБК) визначали вміст ТБК-активних продуктів ПОЛ (вторинних продуктів ліпопероксидації) при довжині хвилі 532 нм [15]. Кількість білка у пробах визначали за методом Лоурі [26].

Дані досліджень обробляли статистично з використанням програмного пакета для персональних комп'ютерів *Microsoft Excel*. Визначали такі основні статистичні показники, як середнє арифметичне значення (М), стандартну похибку (m) та середнє квадратичне відхилення (σ). Для оцінки достовірності різниці між статистичними характеристиками визначали t-критерій Ст'юдента, а вірогідними вважали зміни за рівня достовірності $p > 0,95$.

Результати і їхнє обговорення

Продукти ПОЛ контролюють нормальну фізіологічну активність клітин, адаптацію організмів до зовнішніх факторів [24, 35] і, як встановлено останнім часом, контролюють процеси ембріогенезу [31]. Із даних літератури відомо [9], що саме через 2 год починається інтенсивний поділ бластомерів зародків, тому значне зростання процесів вільнорадикального окиснення на цих годинах розвитку може бути пов'язане з ефективним мембраногенезом. Це свідчить про підвищення функціональної активності клітин зародка з кожним наступним етапом розвитку. Деякі автори вважають, що такі зміни активності ферментів пов'язані з підвищенням рівня активності молекул мембраноасоційованих ферментів під час ембріогенезу, які, власне, й посилюються на цій годині розвитку зародків [5, 6].

Як впливає з отриманих нами результатів, інтенсивність процесів ПОЛ зародків в'юна значно нижча порівняно з тканиною м'язів дорослого в'юна [9].

Незважаючи на низький рівень активності досліджуваних процесів у період раннього розвитку, ПОЛ зазнає змін уже на початкових стадіях ембріогенезу. Наприклад, під час інкубації зародків у середовищі Гольтфретера максимальну кількість продуктів ПОЛ зафіксовано в першу годину розвитку, що узгоджується з літературними даними по дослідженню ПОЛ на різних стадіях розвитку морського їжака *Strongylocentrotus intermedius* [27–28].

Проте вже в наступні години розвитку інтенсивність ПОЛ достовірно знижується – у середньому на $43,8 \pm 1,8$ % порівняно зі стадією 2 бластомерів (перша година розвитку). Отже, отримані експериментальні та літературні дані свідчать про наявність двох характерних періодів, пов'язаних зі змінами інтенсивності вільнорадикальних реакцій. У першому випадку інтенсивність ПОЛ підвищується, а в другому, навпаки, знижується. Під час ранніх етапів розвитку формується морула, і в бластодермі настає іонний гомеостаз, близький до вмісту катіонів у цитозолі диференційованих клітин, а також змінюється якісний склад ліпідів [6]. Це й може впливати на інтенсивність процесів ПОЛ і ефективність функціонування ферментів антиоксидантної системи.

ПОЛ мембран зародків в'юна впродовж раннього ембріогенезу за умов впливу носія VEP-GMA-graft-PEG. Експериментальна і клінічна медицина має значний досвід розробки та використання препаратів з антиоксидантною дією за різних патологій.

Тому детальне дослідження впливу похідних модифікованого поліетиленгліколем полімерного носія (ВЕР-ГМА-ПЕР) в концентрації 1 нмоль/л на процеси біологічного окиснення ліпідів ПМ зародкових клітин прісноводної риби в'юна *Misgurnus fossilis* L. у період раннього ембріогенезу є актуальним і перспективним, та наблизить до розуміння механізмів біологічної дії цих речовин, покращення їхніх лікувальних властивостей, що матиме вагоме значення для фармакології та медицини.

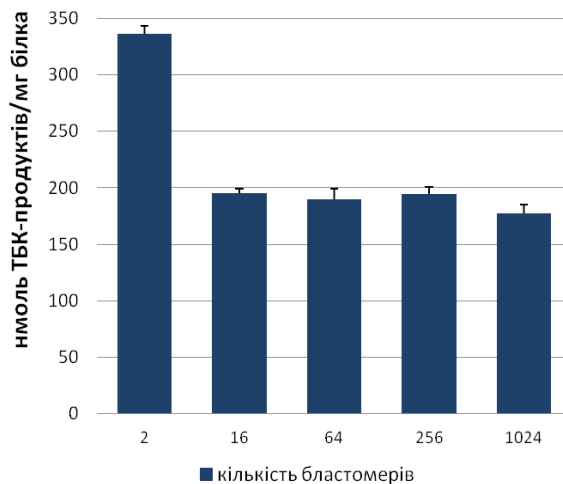


Рис. 1. Зміни вмісту МДА у зародках в'юна на стадіях поділу в контролі (n=7)

У результаті проведених досліджень (n=7) встановлено, що дія досліджуваного 1 нмоль/л полімеру впродовж раннього ембріогенезу веде до виражених змін вмісту малонового диальдегіду – вторинного продукту ПОЛ порівняно з контролем.

На стадії 2 бластомерів за впливу ВЕР-ГМА-ПЕР у концентрації 1 нмоль/л вміст МДА значно зростає (на $101,1 \pm 8,1$ %) порівняно з контролем, тобто процеси ПОЛ інтенсифікуються. Відомо, що після запліднення відбувається структурна перебудова мембран яйцеклітин. Даний процес супроводжується збільшенням текучості ліпідної фази, а через 10 хв спостерігається різке її зменшення [5, 6, 9, 29], що свідчить про зміни у системі прооксидантно-антиоксидантної рівноваги.

Із даних літератури відомо [5, 9], що саме через годину після запліднення розпочинається інтенсивний поділ зародкових клітин, тому зростання ПОЛ безпосередньо пов'язане з ефективним мембраногенезом. Це свідчить про підвищення функціональної активності клітин зародка з кожним наступним етапом розвитку.

Рівень МДА значно знижується у зародків на стадії 16 бластомерів (2,5 год після запліднення), як у контролі, так і в експериментальній групі за впливу ПЕР. Ймовірно, отримані дані пов'язані з перерозподілом між жовтком і бластодермою різних класів антиоксидантів, що зумовлено утворенням нових мембранних структур [8].

Від стадії бластули до шостої години розвитку виявлено зростання рівня МДА порівняно з контролем, що свідчить про інтенсифікацію процесів ПОЛ. Зокрема, на стадії розвитку 64 бластомерів за наявності в середовищі інкубації ПЕР спостерігається достовірне підвищення вмісту ТБК-активних продуктів (на $69,1 \pm 2,0$ %). Однак вміст МДА на кожній досліджуваній стадії достовірно не відрізнявся між собою. Це свідчить про стабілізацію мембранних процесів і настання рівноваги та ще раз підтверджує, що в цей період розвитку відбуваються суттєві зміни в обміні речовин і перерозподіл пулів макроергів.

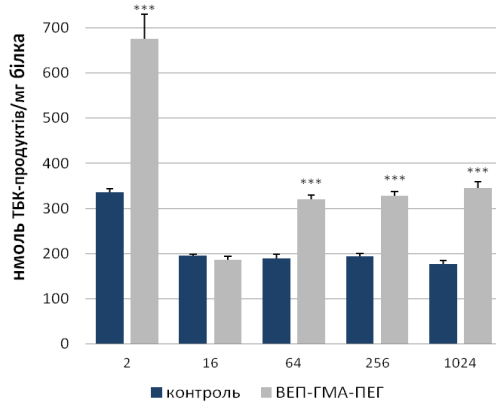


Рис. 2. Зміни вмісту МДА у зародках в'юна на стадіях поділу бластомерів за дії 1 нмоль/л наноносія порівняно з контролем (n=7): тут і надалі * – $p > 0,95$; ** – $p > 0,99$; *** – $p > 0,999$ – вірогідні зміни порівняно з контролем

У другій серії проведених досліджень встановлено, що дія досліджуваного полімеру в концентрації 0,01 пмоль/л упродовж раннього ембріогенезу також веде до виражених змін вмісту вторинного продукту ПОЛ порівняно з контролем. На першій годині розвитку за впливу модифікованого ВЕР-ГМА-ПЕР встановлено достовірне зниження вмісту ТБК-активних продуктів на $12,0 \pm 0,4$ % щодо контролю.

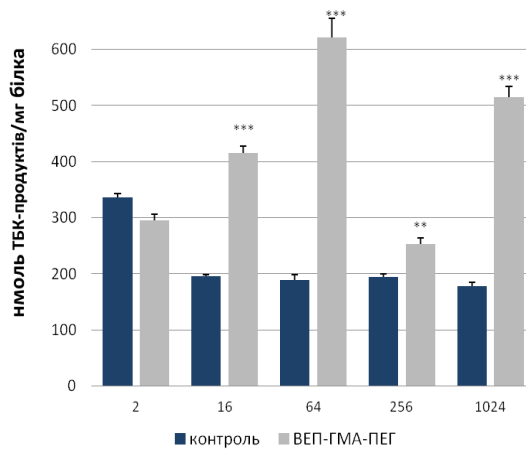


Рис. 3. Зміни вмісту МДА у зародках в'юна на стадіях поділу бластомерів за дії 0,01 пмоль/л наноносія порівняно з контролем

Проте вже на наступних стадіях розвитку інтенсивність ПОЛ збільшується і набуває періодичних змін. Так, на стадії 16 і 64 бластомерів виявлено значне підвищення вмісту МДА в середовищі, відповідно на $112,3 \pm 3,4$ % та $227,8 \pm 12,5$ %.

На останній синхронній стадії поділу бластомерів зародків виявлено достовірне підвищення вмісту МДА за наявності в інкубаційному середовищі ПЕРу. На стадії 8 поділу виявлено підвищення на $30,2 \pm 1,3$ % щодо контролю, а на стадії 10 поділу – достовірне збільшення ТБК-активних продуктів на $189,8 \pm 7,2$ %.

Відоме важливе значення ліпідів у процесі онтогенезу, особливо на ранніх стадіях розвитку, коли ікринка являє собою автономну термодинамічну закриту систему, яка

періодично обмінюється компонентами метаболізму із навколишнім середовищем [29]. При цьому ліпіди є важливими структурними елементами як для побудови нових тканин личинки, так і для її енергетичних потреб. Встановлено, що рівень і характер розподілу ліпідів у ікрі та личинках є важливими показниками життєздатності потомства, що забезпечують включення адаптаційних біохімічних механізмів у нових умовах.

Як відомо, деякі наночастинки можуть мати екоотоксикологічні ефекти. Наприклад, у лабораторних умовах наночастинки флуоресцентного латексу, суспендовані у воді, адсорбуються й акумулюються практично в усіх органах *Oryzias latipes*, а також потрапляють у її ікру. Токсичність щодо ікри та надходження в організм дорослих риб залежали від розміру частинок і зовнішніх факторів, наприклад, солоність води [25]. Оскільки за дії ВЕП-ГМА-ПЕГ у досліджуваних концентраціях вміст вторинних продуктів вільнорадикального окислення ліпідів достовірно зростає, це свідчить про посилення вільнорадикальних процесів у ПМ зародків. Ймовірно, досліджуваний полімер здатен проникати крізь бластодерму і викликати захисну реакцію зародка шляхом інтенсифікації ПОЛ. Отримані дані узгоджуються з інгібуванням активності Na^+ , K^+ -АТФази зародків упродовж раннього ембріогенезу [8] та морфологічними змінами розвитку личинок в'юна [1].

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Багдай А., Здвіжков Ю., Мандзинець С., Бура М. Морфологічні аспекти впливу новосинтезованих полімерів на розвиток зародків та личинок в'юна упродовж раннього ембріогенезу // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2014. Вип. 68. С. 69–77.
2. Бойко Н. М., Ключівська О. Ю., Кобилінська Л. І. та ін. Життєздатність і морфологія пухлинних клітин за дії похідних 4-тіазолідинового ряду, іммобілізованих на нанорозмірному полімерному носіїві // *Biotechnologia Acta*. 2015. Т. 8. № 1. С. 39–48.
3. Бура М. В., Мандзинець С. М. Исследование действия лазерного излучения на ферментативную активность Na^+ , K^+ -насоса зародышей вьюна // Ломоносов-2009: материалы докладов XVI Междунар. науч. конф. студентов, аспирантов и молодых учёных (Москва, Россия, 14–17 апреля 2009). [Электронный ресурс]. М.: Изд-во МГУ; СП “МЫСЛЬ”, 2009. С. 8–9.
4. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука, 1972. 252 с.
5. Гойда О. А. Биофизические аспекты раннего онтогенеза животных. К.: Наук. думка, 1993. 224 с.
6. Гойда О. А., Кусень С. Й., Мукалов И. О. Исследование фосфолипидов в эмбриогенезе вьюна (*Misgurnus fossilis* (L.)) // Укр. биохим. журнал. 1975. Т. 47. С. 370–373.
7. Гончарук Є. Г. Вільнорадикальне окиснення як універсальний неспецифічний механізм пошкоджуючої дії шкідливих чинників довкілля (огляд літератури та власних досліджень) // Журнал акад. мед. наук України. 2004. Т. 10. № 1. С. 131–150.
8. Здвіжков Ю. С., Мандзинець С. М., Рябцева А. О. та ін. Вплив новосинтезованого поліетиленгліколевмісного носія на зміни активності Na^+ , K^+ -АТФази зародків в'юна упродовж раннього ембріогенезу // Вісн. Харків. ун-ту. Сер. біофіз. 2013. Вип. 30 (2). С. 42–52.
9. Мукалов И. О., Гойда О. А., Кусень С. Й. Перекисное окисление липидов на ранних этапах развития вьюна // Укр. биохим. журнал. 1980. Т. 52 (4). С. 473–477.
10. Мурзина С. А., Нефедова З. А., Руоколайнен Т. Р. и др. Динамика содержания липидов в процессе раннего развития пресноводного лосося *Salmo salar* L. // Онтогенез. 2009. Т. 40. № 3. С. 208–214.

11. Рябцева А., Мітіна Н., Гаврилюк Д. та ін. Нанорозмірні системи доставки протиракових препаратів, іммобілізованих на поліетиленглікольвмісному полімерному носії // Вісн. Нац. ун-ту «Львівська політехніка». Хімія, технологія речовин та їх застосування. 2012. № 726. С. 377–383.
12. Рябцева А., Остапчук Ю., Мітіна Н. та ін. Поліетиленглікольвмісні олігомерні носії та нанорозмірні системи доставки антимікробних речовин на їх основі. Хімія, технологія речовин та їх застосування // Вісн. Нац. ун-ту «Львівська політехніка». 2011. № 700. С. 367–373.
13. Соколов В. С., Чуракова Т. Д., Булгаков В. Г. и др. Исследование механизмов действия продуктов перекисного окисления липидов на проницаемость бислоиных липидных мембран // Биофизика. 1981. Т. 26. № 1. С. 147–149.
14. Тарновська А. В. Перекисне окиснення ліпідів у зародках в'юна за впливу фторхінолонів, іонів кальцію та магнію: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. Львів, 2005. 16 с.
15. Тимирбулаев Р. Р., Селезнев Е. И. Метод повышения интенсивности свободнорадикального окисления липидосодержащих компонентов крови и его диагностическое значение // Лаб. дело. 1981. № 4. С. 209–211.
16. Целевич М. В., Мандзинець С. М., Санагурський Д. І. Na^+ , K^+ -АТФ-азна активність мембран зародків в'юна *Misgurnus fossilis* L. при дії антибіотиків // Фізіол. журнал. 2004. Т. 50. № 5. С. 64–68.
17. Чернышев В. И., Исуев А. Р. О роли свободнорадикальных реакций в процессах эмбрионального развития вьюна *Misgurnus fossilis* (L). // Вопр. ихтиологии. 1978. Т. 18. №1 (108). С. 117–130.
18. Akhgari M., Abdollahi M., Kebryaezadeh A. et al. Biochemical evidence for free radical induced lipid peroxidation as a mechanism for subchronic toxicity of malathion in blood and liver of rats // Hum. Exp. Toxicol. 2003. Vol. 22. P. 205–211.
19. Caruthers S. D., Wickline S. A., Lanza G. M. Nanotechnological applications in medicine // Curr. Opin. Biotechnol. 2007. Vol. 18. N 1. P. 26–30.
20. Cho K., Wang X., Nie S. et al. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer // Clin. Cancer Res. 2008. Vol. 14. N 5. P. 1310–1316.
21. Ebbesen M., Jensen T. G. Nanomedicine: techniques, potentials, and ethical implications // J. Biomed. Biotechnol. 2006. Vol. 5. P. 1–11.
22. Euliss L. E., DuPont J. A., Gratton S. et al. Imparting size, shape, and composition control of materials for nanomedicine // Chem. Soc. Rev. 2006. Vol. 35. N 11. P. 1095–1104.
23. Jones M. C., Leroux J. C. Polymeric micelles – a new generation of colloidal drug carriers // Eur. J. Pharm. Biopharm. 1999. N 48. P. 101–111.
24. Kagan V. E. Lipid Peroxidation in Biomembranes. Florida: CRC. Boca Raton. 1988. P. 1–183.
25. Lee W.-M., Ha S.-W., Yang C.-Y. et al. Effect of fluorescent silica nanoparticles in embryo and larva of *Oryzias latipes*: Sonic effect in nanoparticle dispersion // Chemosphere. 2011. Vol. 82. P. 451–459.
26. Lowry O. H., Rosebrough N. G., Farr A. L., Randall R. C. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193. N 1. P. 265–275.
27. Lukyanova O. N., Khotimchenko Y. S. Lipid peroxidation in organs of the scallop *Mizuhopecten yessoensis* and sea-urchin *Strongylocentrotus intermedius* during the reproductive cycle // Comparative Biochemistry and Physiology – B Biochemistry and Molecular Biology. 1995. Vol. 110 (2). P. 371–377.
28. Luk'yanova O. N., Annikova L. V., Deridovich I. I. Lipid peroxidation in embryos and larvae of the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* // J. Evol. Biochem. Physiol. 2000. Vol. 36. No 2. P. 118–122.

29. Murzina S. A., Nefedova Z. A., Pekkoeva S. N. et al. Age-specific lipid and fatty acid profiles of atlantic salmon juveniles in the Varzuga river // *Int. J. Mol. Sci.* 2016. P. 1050.
30. Peters L. D., Livingstone D. R. Antioxidant enzyme activities in embryologic and early larval stages of turbot // *J. Fish Biol.* 1996. Vol. 49. N 5. P. 986–997.
31. Rudneva-Titova I. I. Formation of antioxidant system in early ontogenesis of marine animals // *Uspekhi Sovr. Biol.* 1997. Vol. 117. No. 3. P. 390–397.
32. Stubb J. Controlling radical reactions // *Monthly Nature.* 1994. Vol. 2. N 8. P. 33.
33. Tsunekage T., Ricklefs R. E. Increased lipid peroxidation occurs during development in Japanese quail (*Coturnix japonica*) embryos // *Br. Poult. Sci.* 2015. Vol. 56 (2). P. 262–266.
34. Videla L. A. Energy metabolism, thyroid calorigenesis, and oxidative stress: functional and cytotoxic consequences // *Redox Rep.* 2000. Vol. 5. P. 265–275.
35. Winston G. W., DiGiulio R. T. Prooxidant and Antioxidant Mechanisms in Aquatic Organisms // *Aquat. Toxicol.* 1991. Vol. 19. P. 137–161.

Стаття: надійшла до редакції 14.06.17

доопрацьована 04.10.17

прийнята до друку 06.10.17

LIPID PEROXIDATION PROCESSES IN THE LOACH EMBRYOS UNDER THE INFLUENCE OF POLYETHYLENE GLYCOL DERIVATIVES

V. Mazur¹, Y. Zdvizhkov¹, S. Mandzynets¹, M. Bura¹, O. Zaichenko²

¹*Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskyyi St., Lviv 79005, Ukraine*

²*Lviv National Polytechnic University
12, S. Bandera St., Lviv 79013, Ukraine
e-mail: mcelevyeh@yahoo.com*

The changes in process of lipid peroxidation in loach embryos during early embryogenesis with nanoparticles synthesized based on derivatives of polyethylene glycol were investigated. It was shown that presence these nanoparticles in the incubation medium for loach embryos leads to controversial changes in the level of free lipid peroxidation in the plasma membranes. Nanosized polymer in the incubation medium (10^{-9} mol / L) lead to increasing of TBA-positive products of lipid in twice already at the first hour of development (2 blastomeres) and high content of TBA-product was stored and on further stages of development. The reducing nano polymer concentration in the incubation medium to 10^{-15} mol / l caused periodic changes in the content of TBA-positive products. At the stage of 64 blastomeres detected maximum content of TBA-products, and on the 8 stage of division – decreasing their content with further increasing in the last stage of synchronous divisions. we suggested that studied nanosized polymer capable to penetrate accross the plasma membrane and induce a protective response of embryos through intensification of lipid peroxidation.

Keywords: loach embryos, lipid peroxidation, polyethylene glycol derivatives, embryogenesis

УДК 612.151-083:616.151-056.7

ДОСЛІДЖЕННЯ ЗВ'ЯЗУВАННЯ ФАКТОРА VIII ЗСІДАННЯ КРОВІ З КРЕМНЕЗЕМНИМИ СОРБЕНТАМИ РІЗНОЇ ПОРИСТОСТІ

Н. Шурко*, Т. Даниш

*ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України»
вул. Генерала Чупринки, 45, Львів 79044, Україна
e-mail: natalia_shurko@ukr.net*

Препарати фактора VIII зсідання крові використовуються у лікуванні пацієнтів з гемофілією А та хворобою Віллебранда. Фактор VIII отримують безпосередньо з плазми крові людини з використанням хроматографічних методів. Очищення білка методом афінної хроматографії засноване на оберненій взаємодії між білком і афінним лігандом, з'єднаним з хроматографічною матрицею. Традиційно, роль матриці в афінній хроматографії відіграють пористі матеріали, такі як агароза, поліметакрилат, поліакриламід, целюлоза та кремнезем. Під час вибору матеріалу матриці хроматографічного сорбенту необхідно враховувати кілька факторів: однорідність, гідрофільність, хімічну та механічну стабільність, селективність, високу адсорбційну ємність, розмір частинок і пор. Продемонстровано ефективність застосування барвник-лігандної афінної сорбції з використанням кремнеземного носія для виділення й очищення фактора VIII зсідання крові. У статті представлено результати досліджень сорбції фактора VIII з хроматографічним сорбентом Діасорб-амінопропіл-Procion blue NB з різним розміром пор (250, 500, 750 та 1500 Å). Сорбент із розміром пор 750 Å виявився найкращим для очищення фактора VIII зсідання крові. Очищення фактора відбувалося завдяки явищу негативної афінної сорбції. Питома активність очищеного фактора зростала приблизно втричі.

Ключові слова: фактор VIII зсідання крові, афінна хроматографія, тріазинові активні барвники, макропориста кремнеземна матриця

У процесі вдосконалення виготовлення плазмових похідних із використанням хроматографічних методів очищення розвинулася нова генерація терапевтичних препаратів, а саме факторів зсідання крові (VII, VIII та IX), інгібіторів протеаз тощо [9, 13, 15]. Хроматографічне очищення фактора VIII (FVIII) – один із технологічно найважчих процесів через потенційний ризик його активації та нестабільності за наявності протеаз плазми крові [8].

Для отримання сучасних препаратів FVIII широко використовують аніонообмінну, гель-проникну й афінну хроматографії. З точки зору ефективності афінна хроматографія найбільш придатна для цієї мети.

До матриці афінного сорбенту, крім загальних вимог до хроматографічних матриць (нерозчинність, гідрофільність, щільність, відповідна форма та розмір гранул, хімічна стабільність в умовах модифікації та безпосередньо в хроматографічному процесі, відсутність неспецифічної адсорбції тощо), пред'являються додаткові вимоги: макропористість і наявність реактивних хімічних груп (аміно-, гідроксильних, епокси-), що дають змогу за допомогою нескладної хімічної реакції ковалентно прив'язувати різноманітні біологічні молекули (ліганди та спейсери) [5].

Біоспецифічні ліганди іммобілізують на інертному, переважно сферичному матеріалі-носії. Прикладами відповідних матриць є неорганічні носії, такі як силікагель, силікати чи пористе скло, або органічні, такі як поперечно-зшиті полісахариди, наприклад, целюлоза, похідні целюлози, декстрини або модифікована агароза. Кращим носієм є Sepharose® – матеріал на основі модифікованої агарози, полісахаридні ланцюжки якої утворюють тривимірну структуру [5]. Неорганічні носії мають низку переваг над органічними: легко регенеруються, їм можна надати будь-якого вигляду (порошок, кульки, частки неправильної форми, моноліт або пористий матеріал, що утворює багатоканальну систему). Найчастіше з неорганічних носіїв використовують макропористі кремнеземи (силікагелі, силохроми та макропористе скло).

Кремнеземні носії зручні у роботі, однак мають суттєві недоліки: підвищену розчинність у лужному середовищі та неспецифічну адсорбцію ферментів. З метою зниження розчинності цих носіїв використовують різні модифікуючі агенти, що дає змогу цілеспрямовано змінювати властивості поверхні кремнеземних носіїв [10]. Для зменшення неспецифічної сорбції кремнеземних носіїв, що містять вільні силанольні групи, проводять їхню обробку (силанізацію), найчастіше γ -амінопропілтриетоксисиланом, γ -гідроксипропілтриетоксисиланом чи триетоксипропілгліцидоксисиланом (рис. 1) [4].

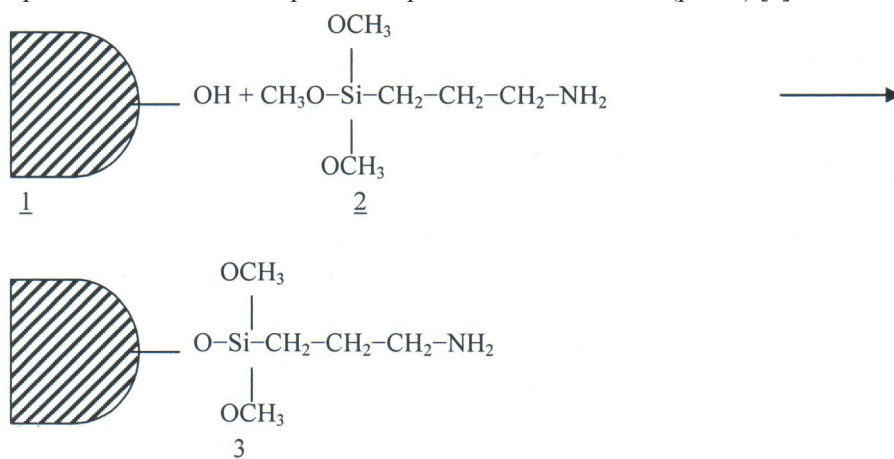


Рис. 1. Загальна схема одержання Діасорбу-амінопропілового: 1 – Діасорб; 2 – γ -амінопропілтриетоксисилан; 3 – Діасорб-амінопропіловий

Нами протягом тривалого часу на практиці застосовуються макропористі сорбенти на основі кремнезему як матриця для виділення й очищення білкових факторів плазми крові, зокрема, факторів протромбінового комплексу [1, 2].

За цей час нами продемонстровано основні переваги даного типу сорбентів: висока стабільність, стійкість до дії мікроорганізмів, хімічних речовин і стерилізації, легкість регенерації, можливість застосування високих швидкостей проведення хроматографічного процесу [3].

Серед афінних лігандів є поділ на органічні (субстрати, коферменти, гормони, лектини, кофактори, антитіла, нуклеїнові кислоти, ефектори, інгібітори тощо) та неорганічні. Особливу групу серед таких лігандів займають тріазинові барвники, що являють собою синтетичні гідрофільні молекули з реактивним (хлортріазиновим) фрагментом, за допомогою якого вони можуть приєднуватися до різних полімерних носіїв [10].

Барвник-лігандна біоспецифічна хроматографія розроблена як важливий спосіб очищення білка, оскільки має низку переваг над іншими формами афінної хроматографії, а саме: дешевизна, доступність, легкість іммобілізації, відносна стабільність до дії біологічних і хімічних чинників, легкість регенерації, висока адсорбційна ємність тощо [11]. У літературі достатньо широко опубліковані дані про застосування активних тріазинових барвників як лігандів для хроматографічного виділення й очищення білків [14]. Світовими лідерами з випуску тріазинових барвників є компанії: Ciba Ltd. (Cibacron) та ICI (Imperial Chemical Industries або Procion). Cibacron та Procion H – монохлортріазинові барвники. Основною відмінністю між Cibacron і Procion H є положення сульфогрупи в аніліновому кільці (*орто*- в Cibacron і *мета*- чи *пара*- в Procion H серії).

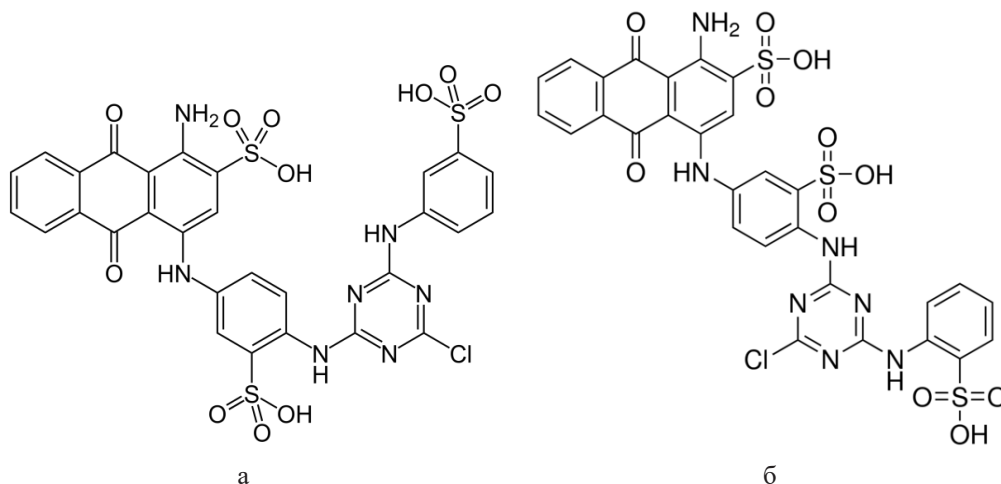


Рис. 2. Структурні формули Procion blue HB (а) та Cibacron Blue 3G-A (б)

Аналогом барвника Procion blue HB є вітчизняний барвник Активний яскраво-голубий К («Барва», Івано-Франківськ). У нашій лабораторії проведено низку порівняльних досліджень стосовно використання саме цих двох барвників у ролі афінних лігандів факторів протромбінового комплексу [3].

Метою нашої роботи було дослідити кремнеземні сорбенти різної пористості з лігандом Procion blue HB та визначити оптимальний для виділення FVIII зсідання крові.

Матеріали та методи

Як вихідний матеріал використали препарати FVIII «Кріопреципітат» (одержаний згідно з [18]) та «Immunate» (Baxter, Австрія). Визначення активності FVIII проводили уніфікованим одностадійним коагулогічним методом за часом зсідання фібриногену в суміші, що містила дефіцитну по фактору плазму (вміст фактора менше 1 %), розведену досліджувану рідину й АСТІN-реагент (Helena, Великобританія), за наявності іонів кальцію [16].

Для синтезу сорбентів застосовували кремнезем Діасорб-амінопропіловий (БиоХимМак-Ст, Росія) з розміром пор 250, 500, 750 та 1500 Å і тріазиновий барвник Procion Blue HB («Acros Organics», Бельгія). Синтез матриці з іммобілізованими тріазиновими барвниками проводили методикою «з включенням солі» за лужних значень рН [2].

Для цього до 5 см³ сухого Діасорбу-амінопропілового додавали 6,5 мл водного розчину (10 мг/мл) барвника. Через 20 хв додавали 2,5 мл 5 М NaCl, а ще через 90 хв 1,25 мл 5 М розчину K₂CO₃ (рН~10,5). Витримували 48 год за температури 45 °С. Відмивали сорбенти дистильованою водою, 4 М KCl, ізопропанолом, 6 М сечовиною, дистильованою водою.

Дослідження сорбції-десорбції FVIII проводили batch-методом: до 2 мл сорбенту, врівноваженого 50 мМ Тріс-НСІ буферним розчином (рН 7,4), додавали по 2 мл розчину досліджуваного препарату (в одному випадку – «Кріопреципітат», а в іншому – «Immunate»). Для вимірювань відбирали проби до сорбції та через 60 хв після нанесення зразка. Концентрацію білка визначали методом Бредфорда за допомогою Кумасі діамантового голубого G-250 [14]. Як стандарт використовували альбумін великої рогатої худоби (ВРХ).

Результати і їхнє обговорення

Можливість адсорбції макромолекули на хроматографічному сорбенті залежить не лише від вибору афінного ліганду, але й від природи носія. Інтенсивність процесу адсорбції визначається розміром, кількістю й конфігурацією пор [10, 11].

Оскільки об'єктом нашого дослідження FVIII є доволі велика білкова молекула ($M_r=330$ кДа), наш вибір був зроблений саме на користь макропористих кремнеземних сорбентів. Сорбент з оптимальним розміром пор для очищення FVIII підбирали експериментально. Досліджували сорбційні властивості синтезованих нами сорбентів стосовно FVIII. Для моделювання процесу сорбції FVIII як вихідну сировину використали комерційний препарат фактора «Immunate», що, крім досліджуваного білка, містить як стабілізатор лише альбумін людини. Крім того, для дослідження можливості використання даного типу сорбенту в процесі очищення FVIII ми провели аналогічне дослідження із Кріопреципітатом, де вплив інших білків на сорбцію досліджуваного фактора є значним.

Наші дослідження показали, що FVIII не зв'язувався зі синтезованими сорбентами (явище негативної афінної сорбції) [6, 17]. При цьому питома активність фактора зростала. Найкращий вихід по питомій активності для FVIII в обох випадках ми досягли на сорбенті з розміром пор 750 Å (табл. 1, 2).

Таблиця 1

Результати очищення FVIII з Кріопреципітату на кремнеземних сорбентах із різним розміром пор ($M \pm m$; $n=5$)

Параметр	Нанесення	Діасорб 250	Діасорб 500	Діасорб 750	Діасорб 1500
Активність FVIII, МО/мл	1,65±0,07	1,27±0,07	1,14±0,05	0,09±0,04	1,16±0,057
Концентрація білка, мг/мл	26,02±0,13	20,02±0,06	12,58±0,10	6,55±0,06	13,60±0,02
Питома активність FVIII, МО/мг білка	0,06±0,03	0,06±0,03	0,09±0,04	0,14±0,05	0,09±0,04
Ступінь очищення, разів		1,03	1,38	2,17	1,34

Таблиця 2

Результати очищення FVIII з препарату «Immunate» на кремнеземних сорбентах із різним розміром пор ($M \pm m$; $n=5$)

Параметр	Нанесення	Діасорб 250	Діасорб 500	Діасорб 750	Діасорб 1500
Активність FVIII, МО/мл	10,28±0,42	5,25±0,32	6,05±0,22	8,15±0,33	7,6±0,31
Концентрація білка, мг/мл	0,50±0,02	0,20±0,01	0,21±0,01	0,12±0,04	0,39±0,01
Питома активність FVIII, МО/мг білка	20,66±0,64	26,60±0,99	28,70±0,81	67,20±0,90	19,54±0,94
Ступінь очищення, разів		1,23	1,39	3,25	0,95

Сорбенти з меншим розміром пор (250 та 500 Å) є малоефективними для очищення фактора, оскільки вони не дають відділити нецільові білки від бажаного. Це узгоджується з літературними даними [7], згідно з якими для кремнеземних сорбентів з діаметром пор 440-650 Å межа ексклюзії по декстрану різної молекулярної маси становить 150–350 кДа. Оскільки основні білки, що входять до складу Кріопреципітату, – це високомолекулярні фібриноген ($M_r=330$ кДа), фібронектин ($M_r=450$ кДа) і фактор фон Віллебранда

(M_r=310 кДа) [18], ми не досягли відповідного ступеня очищення FVIII на сорбентах з розміром пор 250 та 500 Å, хоча і відбувається часткове зв'язування цих білків на зовнішній поверхні хроматографічних сорбентів (незначне збільшення питомої активності FVIII).

Молекулярна маса сироваткового альбуміну людини (ЛСА) становить приблизно 70 кДа. Так, у роботі А. Denizli відмічено, що оптимальна його сорбція відбувається на поліамідному сорбенті з Cibacron Blue F3GA з розміром пор 400 Å при рН 5,0 [12]. Ізоелектрична точка ЛСА становить 4,64. Очевидно, що в даній технології сорбція альбуміну досягається за рахунок гідрофобних взаємозв'язків. У той же час, за більших значень рН (7,4 у нашому дослідженні) використання цього ліганду дає інші типи взаємодії, скоріш за все, змішаного характеру (іонний, гідрофобний, біоспецифічний тощо) [2].

У випадку сорбенту з розміром пор 1500 Å питома ефективна площа зв'язування (концентрація ліганду) є менша. Для порівняння питома активність кремнеземної матриці з розміром пор 750 Å становить 0,47 мМоль/г, а для 1500 Å – 0,37 мМоль/г. Зменшення концентрації ліганду приводить до зменшення сорбційної ємності сорбенту. Відповідно, ефективність такого сорбенту менша, порівняно зі сорбентом з пористістю 750 Å.

Досліджено сорбційні властивості кремнеземних сорбентів стосовно FVIII з'єднання крові. Найвищий ступінь очищення досліджуваного фактора досягається на кремнеземному сорбенті з розміром пор 750 Å. При цьому встановлено, що очищення фактора досягається завдяки явищу негативної афінної сорбції.

Отже, кремнеземні сорбенти з розміром пор 750 Å із лігандом Procion Blue успішно можуть використовуватись у технології отримання високоочищеного препарату FVIII.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Даниш Т. В., Вороняк М. І., Вус М. М. Синтез та вивчення властивостей афінних сорбентів, придатних для виділення та очищення протеїназ із плазми крові // Гематологія і переливання крові: міжвід. зб. 2008. Вип. 34. Т. 2. С. 83–87.
2. Даниш Т. В., Вороняк М. І., Дульцева Н. А., Шурко Н. О. Синтез кремнеземних сорбентів із лігандами – активними барвниками тріазинового ряду // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2008. Т. 47. С. 63–69.
3. Даниш Т. В. Застосування хроматографічних сорбентів з біоімітуючими лігандами для одержання діагностичних та терапевтичних білкових препаратів // Гематологія і переливання крові: міжвід. зб. 2008. Вип. 34. Т. 2. С. 79–83.
4. Дин П., Джонсон У., Мидл Ф. Афинная хроматография: методы. М.: Мир, 1988. 278 с.
5. Остерман Л. А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М.: Наука, 1985. 536 с.
6. Пат. 94299 UA, C07K 1/22, 14/75. Спосіб очищення фактора VIII згортання крові / Шурко Н.О., Даниш Т.В., Новак В.Л.; Заявл. 03.07.2009; Опубл. 26.04.2011; Бюл. № 8, 2011.
7. Туркова Я. Афинная хроматография. М.: Мир, 1980. 472 с.
8. Шурко Н. О., Даниш Т. В. Створення технології отримання фактора VIII згортання крові з використанням методу афінної хроматографії на кремнеземних носіях // Біологія тварин. 2016. Т. 18. № 2. С. 152–159.
9. Cheng E. Purification of coagulation factor VIII by liquid chromatography // J. Blood Disord Transfusion. 2016. Vol. 7. (4). P. 82.
10. Clonis Y. D. Dye Ligands. Affinity separation. 2000. P. 259–265.
11. Denizli A., Pişkin E. Dye-ligand affinity systems // J. Biochem. Biophys. Methods. 2001. Vol. 30. 49(1–3). P. 391–416.
12. Denizli A. Plasma fractionation: conventional and chromatographic methods for albumin purification // Hacettepe J. Biology and Chemistry. 2011. Vol. 39 (4). P. 315–341.

13. Pat. EP 1885486 B1. Affinity adsorbents for factor VIII and von Willebrand's factor / Jason R. B., Badley S.; CA2607858A1, CA2607858C; Filed: April 09.05.2006; Publ. 23.03.2016.
14. Read S. M., Northcote D. H. Minimization of variation in the response to different proteins of the Commssie Blue G Dye-binding assay for proteins // *Anal. Biochem.* 1981. Vol. 116 (1). P. 53–64.
15. Rodrigues S., Verinaud C. I., Oliveira D. S. et al. Purification of coagulation factor VIII by immobilized metal affinity chromatography // *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2015. Vol. 62. N 3. P. 343–348.
16. Ro Sen S., Casoni Chiaroi M. Determination of factor VIII activity in plasma and concentrates: comparison between methods // *Am. Clin. Lab.* 2002. P. 32–37.
17. Scoups K. P. Current protocols in protein science. 1995. 3800 p.
18. Sparrow R. L., Greening D. W., Simpson R. J. A protocol for the preparation of cryoprecipitate and cryodepleted plasma // *Methods Mol. Biol.* 2011. Vol. 728. P. 259–265.

Стаття: надійшла до редакції 22.03.17

доопрацьована 06.09.17

прийнята до друку 15.09.17

STUDY OF COAGULATION FACTOR VIII SORPTION WITH SILICA SORBENTS OF DIFFERENT PORE SIZE

N. Shurko, T. Danysh

*SI «Institute of Blood Pathology and Transfusion Medicine, NAMS»
45, Gen. Chuprynka St., Lviv 79044, Ukraine
e-mail: natalia_shurko@ukr.net*

The coagulation factor VIII concentrates are used in the treatment of patients with Hemophilia A and Von Willebrand disease. Human FVIII was purified directly from plasma using different methods of chromatography. The separation of a proteins using affinity chromatography relies on the reversible interactions between the protein to be purified and the affinity ligand coupled to chromatographic matrix. Traditionally, affinity chromatography support sorbents have consisted of porous support materials such as agarose, polymethacrylate, polyacrylamide, cellulose, and silica. Regardless of the type of sorbents used in the affinity purification, several factors must be considered when choosing a matrix material should be uniform, hydrophilic, chemically and mechanically stable, hydrophilic, and selective and should also exhibit high adsorption capacity, pore size, and particle size. The paper describes studies of sorption factor VIII on chromatographic sorbents Diasorb aminopropyl-Procion Blue HB with different size of pore. As a result of this work we have selected of sorbent with size of pore 750 Å for the best for purification of factor coagulation VIII. The purification of factor took place due to the phenomenon of negative affinity chromatography. The specific activity increased approximately threefold.

Keywords: blood coagulation factor VIII, affinity chromatography, triazine active dyes, macroporous silica matrix

УДК 581.8+581.45

**ПОКАЗНИКИ АНАТОМІЧНОЇ СТРУКТУРИ ЛИСТКІВ ДУБА ЧЕРВОНОГО
(*QUERCUS RUBRA* L.) В УРБОТЕХНОГЕННИХ УМОВАХ**

А. Криворучко, В. Бессонова

*Дніпропетровський державний аграрно-економічний університет
вул. С. Єфремова, 25, Дніпро 49600, Україна
e-mail: uspeshna18@gmail.com*

Досліджено вплив урботехногенних умов на показники анатомічної структури листків дуба червоного (*Quercus rubra* L.). Об'єктом дослідження слугували дерева *Q. rubra*, що зростають в умовно чистій зоні – ботанічному саду Дніпропетровського національного університету ім. О. Гончара (ділянка 1) та у вуличному насадженні біля автотраси з інтенсивним автомобільним рухом (ділянка 2) у м. Дніпро. Встановлено, що гістологічні параметри листка *Q. rubra* в умовах забруднення довкілля змінюються у бік ксероморфності, а саме: потовщення кутикули й адаксіальної епідерми, збільшення товщини стовпчастого і зменшення товщини губчастого мезофілу, зростання коефіцієнта палісадності, збільшення кількості продихів на одиницю поверхні епідерми. Кількість епідермальних клітин на 1 мм² поверхні листка збільшується у рослин вуличного насадження порівняно з рослинами умовно чистої зони. Ступінь відкритості продихів більша у рослин, що зростають на ділянці 1. У листках рослин ділянки 2 зменшується як довжина, так і ширина замикальних клітин продиху в середньому на 20 %. Зміни деяких показників анатомічної структури листків у бік ксероморфності в урботехногенних умовах можна розглядати як адаптивну реакцію рослин на забруднення довкілля.

Ключові слова: придорожнє насадження, дуб червоний, листок, епідерма, мезофіл, продихи

У різних екологічних дослідженнях широко використовують кількісно-анатомічні методи [9, 14, 21, 32, 37, 41]. Оскільки структура органів відображає результат впливу факторів середовища на рослини, то за відповідними реакціями кількісних змін параметрів гістологічних елементів можна судити про силу і значення тих чи інших чинників, а також про ступінь реагування рослини на їхній вплив [1, 17, 24, 35, 43, 44]. Особливого значення набувають анатомічні дослідження в інтродукції рослин для виявлення шляхів пристосувальних реакцій рослин до різних екологічних умов [5, 12, 23, 29, 30]. В останні роки привертає увагу такий інтродуцент як дуб червоний (*Quercus rubra* L.), котрий характеризується високими декоративними якостями. Проте дерева цього виду ще дуже обмежено використовуються в озелененні міст південного сходу України. Для ширшого впровадження цього виду в зелене будівництво необхідне всебічне дослідження відповідних морфо-анатомічних реакцій на вплив урботехногенних чинників.

У першу чергу заслуговують на увагу дослідження анатомічної будови листків, яка впливає на перебіг таких фізіологічних процесів як фотосинтез, дихання, водний обмін, а також спрямованість процесів метаболізму. На думку В.К. Василевської [6], адаптивна значущість анатомічних ознак листків не завжди є однозначною і явною, проте вони дають змогу оцінити і зрозуміти шляхи пристосування до певних умов життя. Таких же поглядів дотримується і П.С. Гнатів [9] на підставі досліджень анатомічної будови листків деяких

деревних рослин у міському середовищі. В урботехногенних умовах листки рослин відіграють важливу роль в осадженні пилу і поглинанні токсичних промислових газів [4, 8, 25, 34, 38, 40, 42, 45], тому важливо визначити ступінь і характер їхнього впливу на анатомічні зміни цього органа.

Мета даного дослідження – проаналізувати вплив урботехногенних умов середовища на показники анатомічної структури листків дуба червоного.

Матеріали та методи

Об'єктом дослідження слугували дерева *Q. rubra*, що зростали в умовно чистій зоні – ботанічному саду Дніпропетровського національного університету ім. О. Гончара (ділянка 1), що лежить на відстані близько 10 км від промислових підприємств міста, та біля автотраси з інтенсивністю автомобільного руху 49,4 тис. авто за добу (ділянка 2) – вулиця Набережна Січеславська (Набережна Леніна) м. Дніпро. Ця ділянка залучена до групи сильно забруднених вулиць, на яких інтенсивність руху від 2600 до 3400 авто за годину [27]. Крім впливу викидів автомобільного транспорту, на рослини дослідної ділянки 2 діють інгредієнти промислових викидів Західного, Північно-східного та Північно-західного промислових комплексів [22] при відповідному напрямку вітру. Відстань від них становить 4,5 км, 2,7–4,4 та 2,9–3,8 км відповідно. Моніторингова точка лежить у пониженій частині міста (56,8 м над рівнем моря), що викликає накопичення забруднюючих речовин [26] і підвищення концентрації газоподібних викидів (SO_2 , NO_x тощо). Індекс забруднення в цьому районі становить від 7 до 11 одиниць, тобто високий [10].

Для аналізу відбирали максимально розвинені листки в середній частині пагонів, що закінчили ріст, з південно-східного боку крони на висоті 2,5 м. Використовували фрагменти листка з його середньої частини. Поперечні зрізи листків робили за допомогою ручного мікротому, виготовленого згідно з описом [16]. Розміри тканин і клітин визначали під мікроскопом Біомед-4 з використанням окуляр-мікрометра. Середні значення показників виводили з 25–40 вимірів. Щільність розташування продихів і їхні розміри обчислювали на відбитках, отриманих за методом Г.Х. Молотковського [3]. Для вивчення форми клітин епідермісу виготовляли тимчасові препарати. Послідовність вивчення здійснювали згідно з методикою анатомічних досліджень В.Г. Ніколаєвського [19]. Фотографування виконували фотокамерою Digital Camera for Microscope DCM-130.

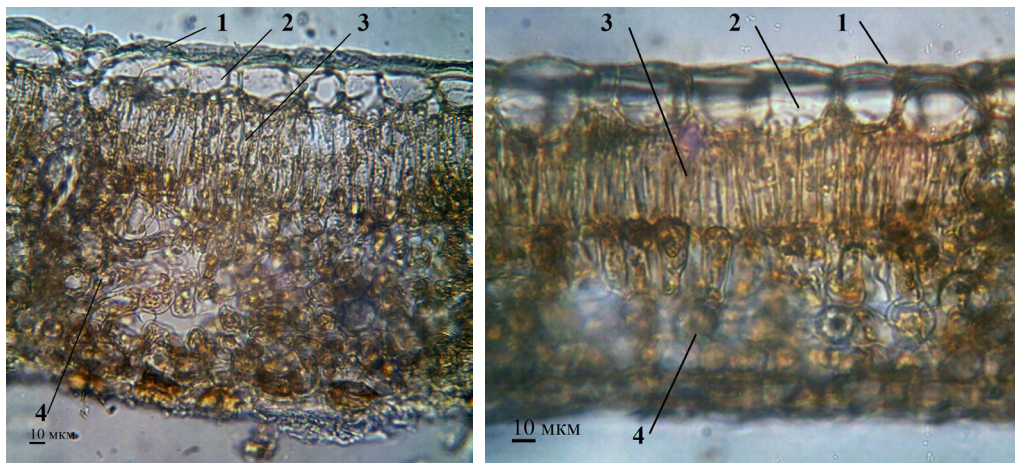
Продихово-епідермальний індекс розраховували за формулою $\frac{K_n \cdot 100}{K_e + K_n}$, де K_n – кількість продихів на 1 мм² поверхні листка, K_e – кількість епідермальних клітин [35]. Індекс ксероморфності розраховували за формулою $I_{xr} = \frac{N_e + N_n}{100} \%$, де N_e – щільність епідермальних клітин, шт./мм²; N_n – щільність продихів, шт./мм² [11, 46]. Коефіцієнт палісадності обчислювали як відношення товщини палісадного мезофілу листка до загальної товщини листка і виражали у відсотках. Результати обробляли статистично у програмі Microsoft Excel 2010. Розраховували помилку середнього арифметичного, обчислювали критерій достовірності відмінностей між показниками варіантів (t-test). За контроль прийнято показники з ділянки 1.

Результати і їхнє обговорення

За диференціацією мезофілу листок *Q. rubra* належить до дорзивентрального типу. Його товщина становить на ділянці 1 – 162,5 мкм, на ділянці 2 – 166,0 мкм, умови зростання фактично не впливають на значення цього показника (табл. 4). Пластинка листка, за класифікацією Б.Р. Васильєва [7], тонка у рослин обох варіантів.

З питання впливу урботехногенних умов на товщину листової пластинки у літературі опубліковано дані про різноспрямовані тенденції змін цього показника. Так, за результатами С.О. Сергейчик [25], у стійкого до забруднення виду – дикого винограду п'ятилисточкового (*Parthenocissus quinquefolia* Planch.) спостерігається потовщення листка, у чутливого виду – жимолості татарської (*Lonicera tatarica* L.) – зменшення. Збільшення товщини листка платана східного (*Platanus orientalis* L.) в умовах забруднення довкілля інгредієнтами промислових викидів відмічають Н.В. Капелюш і В.П. Бессонова [15].

Листок дуба червоного вкритий кутикулою, яка товстіша у рослин забрудненої ділянки (рис. 1), що має значення для захисту від проникнення в тканини листків шкідливих газів і запобігає надмірному випаровуванню води. Характерно, що збільшення товщини кутикули в умовах високого рівня забруднення міського середовища виявлено у листків липи сердцелистої (*Tilia cordata* Mill.), але у робінії звичайної (*Robinia pseudoacacia* L.) спостерігається її потоншення [18]. У плані клітини епідерми адаксіальної поверхні листка різної форми: трапецієподібні, прямокутні та ін. (рис. 2). Клітинні стінки епідерми абаксіальної поверхні листка – звивисті (за шкалою С.Ф. Захаревича [13]). Форма епідермальних клітин верхньої та нижньої поверхні листка на ділянці 1 не відрізняється від таких на ділянці 2.



I

II

Рис. 1. Поперечний зріз листової пластинки *Q. rubra*: I – ділянка 1; II – ділянка 2; 1 – кутикула; 2 – епідерма; 3 – палисадна паренхіма; 4 – губчаста паренхіма

На нижньому боці листка рослин на обох ділянках рідко трапляються трихоми у вигляді двоклітинних загострених волосків і у вигляді пучечків.

На поперечному зрізі листка – клітини епідерми табличчастої форми, більші на адаксіальному боці листка (рис. 1, табл. 1). Вони довші у рослин, що зростають в умовах забруднення, на 29,9 % і ширші на 12,06 % порівняно з умовно чистою зоною. Проте розміри клітин епідерми на абаксіальному боці в обох варіантах статистично не відрізняються (табл. 1).

Продихи розміщені лише на одній поверхні листка – на нижній, тобто листок гіпостомний. За особливостями будови сформовані продихи належать до аномоцитного типу. Це – безладноклітинний тип, навколопродихових клітин немає [31]. Згідно з визначенням інших дослідників, цей тип характеризується відсутністю будь-якої організації клітин, що прилягають до продихів [2, 39].

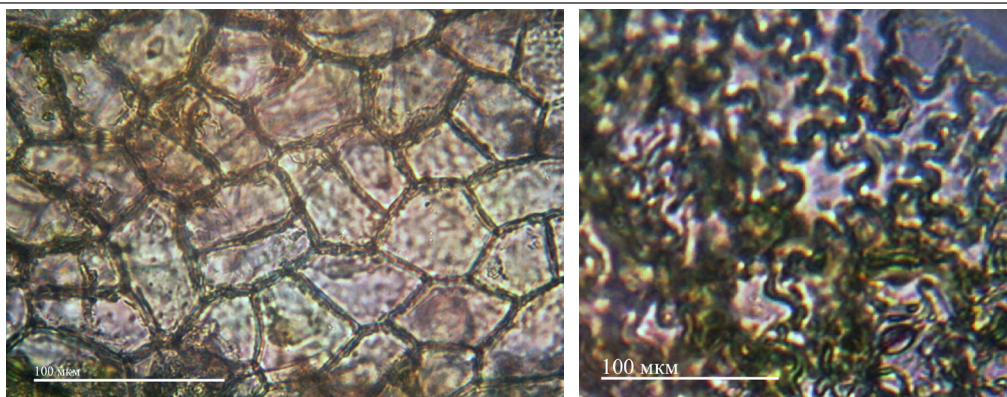


Рис. 2. Епідерма адаксіального (I) й абаксіального (II) боків листка *Q. rubra* (ділянка 1)

Таблиця 1

Показники клітин епідерми листка *Q. rubra*, мкм ($M \pm m$)

Варіант	Товщина кутикули	Висота клітин епідерми		Ширина клітин епідерми	
		адаксіальної	абаксіальної	адаксіальної	абаксіальної
Ділянка 1	4,20±0,12*	15,20±0,30*	13,02±0,51	24,80±0,34*	14,62±0,36
Ділянка 2	7,25±0,21	19,74±0,42	12,10±0,46	21,81±0,50	15,45±0,50

Примітки: * – різниця між варіантами статистично достовірна за $P \leq 0,05$; $n=30$

Щільність продихів становить для ділянки 1 – 312,85 шт./мм², для ділянки 2 – 389,21 шт./мм² (табл. 2), що за класифікацією Б.Р. Васильєва [7] оцінюється як дуже багато.

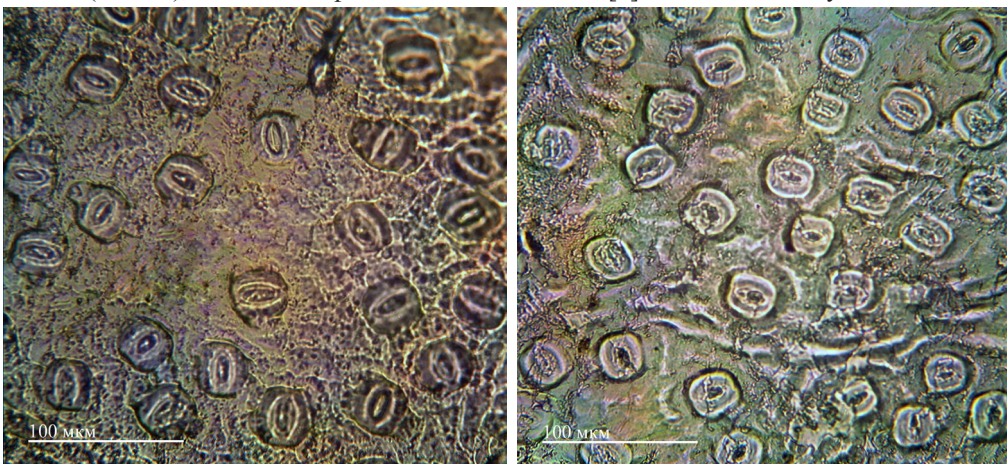


Рис. 3. Продихи на абаксіальній поверхні листової пластинки *Q. rubra*: I – ділянка 1; II – ділянка 2

Продихи епідерми листків рослин із ділянки 2 розташовані щільніше, ніж у рослин з умовно чистої зони (на 26,32 %). Раніше було виявлено також більш високу щільність продихів на одиницю поверхні епідерми у газонних трав [20] та у *Ricinus communis* L. [47] за умов забруднення повітря. Відомо, що збільшення щільності продихів і зменшення їхніх розмірів в умовах дії на рослини токсичних газів є рисами зміни будови листка у бік ксероморфної структури [20].

Щільність продихів – це саме та ознака епідерми, яка визначає швидкість газообміну і більш високий темп провідності речовин. Вважається, що ці процеси залежать більшою мірою саме від цього показника, а не від збільшення довжини продихів [33, 48]. На думку деяких дослідників, велика кількість дрібних продихів максималізує дифузію CO₂ в листки для фотосинтезу без великих втрат вологи [33, 36]. В.С. Ніколаєвський [20] вважає, що у видів із більшою кількістю дрібних продихів на одиницю поверхні краще регулюється ступінь їхньої відкритості.

Ступінь відкритості продихів у *Q. rubra* більший у рослин із ділянки 1, ніж із ділянки 2. Менша відкритість продихів дає певні переваги рослинам за дії на них техногенних емісій, оскільки встановлено [20, 25], що надходження газів у тканини листків здійснюється переважно через продихи.

Забруднення довкілля впливає на кількість епідермальних клітин на 1 мм² поверхні. Цей показник зростає на ділянці 2 щодо ділянки 1 на 10,24 % (табл. 2).

Таблиця 2

Щільність клітин епідерми листка та продиховий індекс *Q. rubra* (M±m)

Варіант	Щільність продихів шт./мм ²	Кількість клітин епідерми, шт./мм ²	Продиховий індекс
Ділянка № 1	310,85±14,30*	925,21±10,15*	25,15
Ділянка № 2	398,21±14,30	1020,00±14,21	28,08

Примітки: * – різниця між варіантами статистично достовірна за P≤0,05; n=25

Проте розрахунки продихового індексу свідчать про деяке його підвищення в умовах забруднення довкілля (табл. 3). В обох варіантах цей показник, за Васильєвим [7], можна охарактеризувати як дуже великий.

Таблиця 3

Характеристики продихів на нижній епідермі листка *Q. rubra* (M±m)

Варіант	Довжина замикальних клітин продихів, мкм	Ширина замикальних клітин продихів, мкм	Відкритість продихів, мкм	Індекс ксероморфності
Ділянка № 1	27,21±0,31*	15,16±0,23*	7,21±0,21*	12,36
Ділянка № 2	22,14±0,35	12,27±0,28	4,00±0,18	14,18

Примітки: * – різниця між варіантами статистично достовірна за P≤0,05; n=30

Зі збільшенням кількості продихів на одиницю площі епідерми листків рослин з ділянки 2 зменшується як довжина, так і ширина замикальних клітин у середньому на 20 % (табл. 3).

Листок *Q. rubra* має чітко виражену диференціацію мезофілу на палісадну і губчасту тканини (рис. 1). Клітини палісадної паренхіми подовжені, щільно зімкнені. Висота цього шару на 20,49 % більша, ніж у рослин із ділянки 1 (табл. 4). Майже на таку ж величину клітини вужчі. Число рядів стовпчастих клітин змінюється від 1 до 2, середня їхня кількість в умовно чистій зоні (ділянка 1) – 1,52, у придорожній (ділянка 2) – 2,0. Верхній ряд стовпчастої паренхіми представлений більш довгими клітинами, другий ряд складається з більш коротких клітин (табл. 4).

Відношення довжини палісадних клітин до їхньої ширини у листків дерев з ділянки 2 зростає порівняно з ділянкою 1 на 44,52 %.

Губчастий мезофіл складається з 3–4 рядів пухко розташованих клітин із міжклітинниками (рис. 1). Розміри клітин губчастої паренхіми з ділянки 1 та ділянки 2 статистично не відрізняються. Шар губчастої паренхіми трохи вужчий у останньому варіанті, має менші міжклітинники (табл. 4).

Таблиця 4

Показники мезофілу листка *Q. rubra* (M ± m)

Показник, мкм	Ділянка № 1	Ділянка № 2
Стовпчаста паренхіма, мкм	62,20±0,33	74,92±0,48*
Губчаста паренхіма, мкм	72,10±1,12	59,24±1,22*
Клітини стовпчастої паренхіми (довжина), мкм		
1-й ряд	37,10±0,72	42,21±0,51*
2-й ряд	25,12±0,80	32,14±1,17*
Клітини стовпчастої паренхіми (менший діаметр), мкм	11,16±0,21	9,30±0,19*
Клітини губчастої паренхіми (довжина×ширина) мкм	18,12×15,22	17,31×16,74
Відношення довжини клітин стовпчастої паренхіми до їхнього меншого діаметра	5,57	8,05
Розміри міжклітинників, мкм	15,32×12,63	12,41×9,75
Коефіцієнт палісадності	38,27	45,13
Товщина листка, мкм	162,5±1,52	166,0±1,64

Примітки: * – різниця між варіантами статистично достовірна за $P \leq 0,05$; $n=30$

Згідно з результатами, отриманими В.О. Стасенко та ін. [28], високий рівень забруднення викликає потоншення губчастої та стовпчастої паренхіми у робінії звичайної (*Robinia pseudoacacia* L.). Іншими авторами виявлено, що при слабкому рівні забруднення промисловими викидами товщина мезофілу збільшується за рахунок стовпчастого мезофілу, а при середньому і високому рівні забруднення – зменшується за рахунок губчастої та стовпчастої тканин відповідно [18]. За нашими даними, забруднення довкілля викликає потовщення стовпчастої паренхіми у *Q. rubra* і зменшення шару губчастої паренхіми, що є показником змін структури листка у бік ксероморфності. П.С. Гнатів [9], досліджуючи характеристики цих частин мезофілу листків акації білої (*Robinia pseudoacacia* L.), ясена звичайного (*Fraxinus excelsior* L.) та гіркогоштану звичайного (*Aesculus hippocastanum* L.) у міському середовищі, встановив подібні тенденції змін структури листка до ксероморфності.

Значення коефіцієнта палісадності більша у листків рослин, що зростають на ділянці 2 (табл. 4). Цей показник у листків із ділянки 1, за шкалою Б.Р. Васильєва [7], низький, із ділянки 2 – середній. Коефіцієнт палісадності вказує на ступінь мезоморфності листка. Отже, збільшення його значення свідчить, що в умовах забруднення довкілля зростає ступінь ксероморфності. Це підтверджує розрахунок індексу ксероморфності, який вищий у рослин придорожньої зони (табл. 3).

Таким чином, аналіз кількісних параметрів гістологічної структури листка *Q. rubra* в умовах забруднення довкілля свідчить про те, що ціла низка показників змінюється у бік ксероморфності, а саме: потовщення кутикули й адаксіальної епідерми, збільшення товщини стовпчастого і зменшення товщини губчастого мезофілу, зростання коефіцієнта палісадності, збільшення кількості продохів на одиницю поверхні епідерми. Ступінь відкритості продохів більший у рослин із умовно чистої зони. Хоча вплив забруднення довкілля на деякі показники структурних елементів листка *Q. rubra*, загалом, не дуже великий, проте у комплексі вони можуть відіграти суттєву роль у пристосуванні рослин до урботехногенного забруднення і підвищення їхнього адаптивного потенціалу за цих умов.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Александров В. Г. Анатомия растений. М.: Высшая школа, 1966. 429 с.
2. Баранова М.А. Классификация морфологических типов устьиц // Ботан. журнал. 1985. Т. 70. № 12. С. 1585–1594.
3. Бессонова В. П. Практикум з фізіології рослин. Дніпропетровськ: РВВ ДДАУ, 2006. 316 с.

4. Бессонова В. П. Эффективность осаждения пылевых частиц листьями древесных и кустарниковых растений // Вопросы защиты природной среды и охрана труда в промышленности: сб. науч. трудов. Днепропетровск: Изд-во ДГУ, 1993. С. 34–37.
5. Бойко Л. І. Особливості листка *Pittosporum tobiza* (*Pittosporaceae*) за різних умов вирощування // Укр. ботан. журнал. 2016. Т. 73. № 6. С. 593–599.
6. Василевская В. К. Формирование листа засухоустойчивых растений. Ашхабад: Изд-во АН Туркменской ССР, 1954. 184 с.
7. Васильев Б. Р. Строение листа древесных растений различных климатических зон / под ред. В.М. Шмидта. Л.: Изд-во ЛГУ, 1988. 208 с.
8. Гетко Н. В. Растения в техногенной среде. Минск: Наука и техника, 1989. 208 с.
9. Гнатів П. С. Гіркокаштан звичайний у Львові і питання його екологічної стійкості в міських насадженнях // Наукові записки Державного Природничого музею. 2007. Вип. 23. С. 75–84.
10. Доценко Л. В., Демиденко А. А. Порівняльний аналіз методів визначення рівня забруднення атмосферного повітря // Екологічна безпека. 2014. № 2 (18). С. 71–78.
11. Жалдак С. Н. Взаимодействие в сообществах однолетних галофитов и их влияние на анатомо-морфологические структуры растений // Питання біоіндикації та екології. 2000. Вип. 5. № 3. С. 17–20.
12. Зайцев Б. В. Анатомо-морфологические особенности некоторых представителей элимоидных родов как материал для интродукции растений // Полезные растения природной флоры Сибири. Новосибирск: Наука, 1967. С. 71–77.
13. Захаревич С. Ф. К методике описания эпидермиса листа // Вестн. Ленинград. ун-та. 1954. № 4. С. 65–75.
14. Иванова Л. А., Пьянков В. И. Влияние экологических факторов на структурные показатели мезофила листа // Ботан. журнал. 2002. Т. 87 (12). С. 17–28.
15. Капельюш Н. В., Бессонова В. П. Зміна анатомічних показників листків *Platanus orientalis* L. під дією промислових емісій (техногенного навантаження) // Інтродукція рослин. 2005. № 1. С. 81–87.
16. Клейн Р. М., Клейн Д. Т. Методы исследования растений. М.: Колос, 1974. 527 с.
17. Крохмаль И. И. Функциональная анатомия и морфология листа *Campanula sibirica* L. // Экология и ноосферология. 2015. Вып. 26. № 1–2. С. 55–65.
18. Кучма В. М., Гришко В. М. Анатомічна будова листка липи серцелистої та робінії псевдоакації в різних екологічних умовах зростання // Питання біоіндикації та екології. Запоріжжя: ПВКФ «Павел», 1999. С. 22–27.
19. Николаевский В. Г. К методике количественно-анатомического изучения влияния внешней среды на структуру вегетативных органов высших растений // Ботан. журнал. 1964. Т. 49. № 6. С. 833–838.
20. Николаевский В. С. Биологические основы газоустойчивости растений. Новосибирск: Наука, 1979. 208 с.
21. Овруцька І. І. Анатомо-морфологічні ознаки листків *Sium latifolium* L. у різних умовах зростання // Укр. ботан. журнал. 2012. Т. 69. № 1. С. 125–133.
22. Пасічний Г. В., Сердюк С. М. Динаміка важких металів в ґрунтовому покриві у зв'язку з техногенним забрудненням оточуючого середовища (на прикладі м. Дніпропетровська) // Екологія і природокористування. 2002. Вип. 4. С. 111–117.
23. Пленник Р. Я. Анатомический метод и теория интродукции растений // Нетрадиционные методы в исследованиях растительности Сибири. Новосибирск: Наука, 1982. С. 154–162.

24. Попова О. А. Анатомическое строение листа некоторых раннецветущих растений Восточного Забайкалья // Ученые записки ЗабГГПУ. 2013. № 1 (48). С. 37–45.
25. Сергейчик С. А. Устойчивость древесных растений в техногенной среде. Минск: Наука і техника, 1994. 279 с.
26. Сердюк С. М., Доценко Л. В. Наукове обґрунтування фітомеліоративних заходів в умовах високого автотранспортного навантаження // Питання степового лісознавства та степової рекультивациі земель. 2007. Вип. 11 (36). С. 192–200.
27. Сердюк С. М. Актуальні проблеми трансформації міського середовища в умовах високого автотранспортного навантаження (на прикладі м. Дніпропетровськ) // Електромагнітна сумісність та безпека на залізничному транспорті: зб. наук. праць. 2016. № 11. С. 101–108.
28. Стасенко В. А., Швиндлерман С. П. Анатомо-морфологические изменения *Robinia pseudoacacia* L. как показатель состояния окружающей природной среды // Вопросы биоиндикации и экологии. Запорожье: ЗГУ, 1997. Вып. 2. С. 97–102.
29. Тюрина Е. В. Значение анатомического метода для выяснения происхождения адаптационных и интродукционных возможностей растений // Нетрадиционные методы в исследованиях растительности Сибири. Новосибирск: Наука, 1982. С. 77–88.
30. Тюрина Е. В. Интродукция зонтичных в Сибири. Новосибирск: Наука, 1978. 239 с.
31. Эсау К. Анатомия растений. М.: Мир, 1969. 564 с.
32. Boyne R. L. Comparative leaf anatomy of invasive and noninvasive climbers under different light levels. Implication for ecophysiological performance and phenotypic plasticity // B. Sc. thesis, Queensland University of Technology. Brisbane, Australia, 2011.
33. Brodrigg T. J., Jordan G. J., Carpenter R. S. Unified changes in cells size permit coordinated leaf evolution // New Phytologist. 2013. Vol. 199. P. 559–570.
34. Gawronski S. W., Gawronska H., Lomnicki S. et al. Plants in Air Phytoremediation // Adv. Bot. Res. 2017. Vol. 83. P. 319–346.
35. Gupta B. Correlation of tissues in leaves II. Absolute stomatal numbers // Annals of Botany. 1961. Vol. 25. P. 71–77.
36. Holland N., Richardson A. D. Stomatal length correlation with elevation of growth in four temperate species // Journal of Sustainable Forestry. 2009. Vol. 28. P. 63–73.
37. Jusypiva T., Miasoid G. The impact of SO₂ and NO₂ industrial emission on anatomical stem of *Salix alba* // International letters of nature science. 2016. Vol. 51. P. 6–13.
38. Klingberg J., Broberg M., Strandberg B. et al. Influence of urban vegetation on air pollution and noise exposure – A case study in Gothenburg, Sweden // Sci. Total Environ. 2017. Vol. 599–600. P. 1728–1739.
39. Metcalfe C. R., Chalk L. Anatomy of the dicotyledons. London: Oxford Univ. Press., 1950. 1500 p.
40. Powe N. A., Willis K. G. Mortality and morbidity benefits of air pollution (SO₂ and PM₁₀) absorption attributable to woodland in Britain // J. Environ. Manage. 2004. Vol. 70. P. 119–128.
41. Sack L., Cowan P. D., Jaikumar N. et al. The hydrology of leaves: coordination of structure and function in temperate woody species // Plant Cell Environ. 2003. Vol. 26. P. 1343–1356.
42. Shi J., Zhang G., An H. et al. Quantifying the particulate matter accumulation on leaf surfaces of urban plants in Beijing, China // Atmospheric Pollution Research. 2017. Vol. 8. P. 836–842.
43. Terashima I., Mayazawa S., Hanba Y. T. Why are sun leaves thiched then shade leaves? – Consideration based on analyses of CO₂ diffusion in the leaf // J. Plant Res. 2001. Vol. 114. P. 93–105.

44. Torre S., Fjeld T., Gislerrød H. R., Moe R. Leaf anatomy and stomatal morphology of greenhouse roses grown at moderate or high air humidity // J. Amer. Soc. Hort. Sci. 2003. Vol. 128 (4). P. 598–602.
45. Uni D., Kutra I. Airborne dust absorption by semi-arid forests reduces PM pollution in nearby urban environments // Sci. Total Environ. 2017. Vol. 598. P. 984–992.
46. Weissenböck V. G. Einfluß des Bodensalzgehaltes auf Morphologie und Ionenspeicherung von Halophyten // Flora. 1969. Bd. 158. P. 369–389.
47. Yunus M., Ahmad K. J., Gale R. Air pollutants and epidermal traits in *Ricinus communis* L. // Environ. Pollut. 1979. Vol. 20. N 3. P. 189–198.
48. Zhang S. B., Guan Z. S., Sun M. et al. Evolutionary association at stomatal trichomes with leaf vein density in *Paphiopedium* // Orchidaceae. 2012. Vol. 7. P. 1–10.

Стаття: надійшла до редакції 26.06.17

доопрацьована 13.09.17

прийнята до друку 15.09.17

PARAMETERS OF ANATOMICAL STRUCTURE OF RED OAK (*QUERCUS RUBRA* L.) LEAF IN URBANIZED CONDITIONS

A. Kryvoruchko, V. Bessonova

Dnipropetrovsk State University of Agriculture and Economics

25, Sergiy Efremov St., Dnipro 49600, Ukraine

e-mail: uspeshna18@gmail.com

The effect of urbanized conditions on the anatomical parameters of red oak (*Quercus rubra* L.) leaves was researched. The object of the study was a *Q. rubra* trees, which grow in non-polluted site – Botanical Garden of Oles Honchar Dnipro National University (site 1) and near the highway with heavy traffic (site 2) in Dnipro. It was established that the histological parameters of *Q. rubra* leaves under pollution conditions is changed toward xeromorphism – a thickening of the cuticle and adaxial epidermis, increasing the thickness of palisade and reducing the thickness of spongy mesophyll, increasing the palisade index and increasing the number of stomata per unit epidermis surface. Stomata of leaf epidermis on site 2 is located more densely than in plants of non-polluted site. Number of epidermal cells per 1 mm² of leaf surface increases in trees on site 2 relative to trees on site 1. The degree of openness of stomata in plants is greater on non-polluted site. The length and width of guard cells in the plants of site 2 is decreased by an average of 20 %. Changes in some parameters of leaves anatomical structure toward xeromorphism in urbanized conditions is considered as adaptive response of plants to environmental pollution.

Keywords: roadside planting, red oak, leaf, epidermis, mesophyll, stomata

УДК 579.873.1:577.181.4

**STUDY OF *STREPTOMYCES GHANAENSIS* ATCC14672 GENES *SSFG_03627*
AND *SSFG_01411* ENCODING PUTATIVE MEMBRANE PROTEINS**

Y. Sehin, B. Ostash

*Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: b.ostash@lnu.edu.ua*

Streptomyces ghanaensis ATCC14672 produces moenomycin A, a potent phosphoglycolipid antibiotic that targets bacterial peptidoglycan glycosyltransferases (PGTs). The genetic and biochemical aspects of assembly of moenomycin molecule is well understood. Yet, it remains unknown how moenomycins are transported from the cell into an environment, and whether the active export of moenomycin might be important for resistance of producer to its own potentially toxic secondary metabolite. There is overall structural and functional similarity between moenomycin and Lipid II an essential precursor to peptidoglycan (common lipid-glycoside scaffold, both bind PGTs). We hypothesized that proteins responsible for Lipid II transport across the *S. ghanaensis* membrane, analogous to MurJ in *Escherichia coli*, could also be involved in moenomycin export. In this work we describe initial genetic characterization of two MurJ-like *S. ghanaensis* ATCC14672 genes, *SSFG_03627* and *SSFG_01411*. We revealed that gene *SSFG_03627* is essential and could be deleted from *S. ghanaensis* ATCC14672 genome only in presence (*in trans*) of the second *SSFG_03627* gene copy. Attempts to complement *murJ*-deficient *E. coli* NR1154 strain with either *SSFG_03627* or *SSFG_01411* gene were unsuccessful. Manipulations of *SSFG_03627* gene copy number had complex influences on moenomycin production in *S. ghanaensis* ATCC14672.

Keywords: *Streptomyces*, moenomycin, antibiotic resistance, Lipid II flippases

S. ghanaensis is the producer of moenomycin A (MmA) – founding member of a small family of phosphoglycolipid antibiotics that inhibit the growth of mostly Gram-positive bacteria, including many vancomycin- and methicillin-resistant strains. The structure of MmA features elements rarely found in the secondary metabolites of bacteria and it is the only known natural antibiotic that inhibits the transglycosylation step of bacterial cell wall synthesis through binding to the peptidoglycan transglycosylases (PGTs) [8]. This makes MmA an interesting target for drug development.

Genetic control of moenomycin biosynthesis is well studied, it is quite complex, with 17 genes being involved [7, 8]. These genes (*moe*) form two clusters located distantly to each other. There are no regulatory or resistance genes within either of the *moe* clusters, so there is a broad interest of studying other mechanisms involved in moenomycin biogenesis. One of possible research targets is to study how this molecule gets through the *S. ghanaensis* membrane, and what moenomycin resistance mechanisms are. It has been shown that moenomycin inhibits PGTs, the enzymes involved in the essential penultimate step of bacterial cell wall biosynthesis through binding in the active site cleft of PGTs. In this mechanism MmA and Lipid II, an essential precursor of peptidoglycan, compete for binding to PGT [3]. If so, we suggest that enzymes involved in Lipid II translocation across *S. ghananesis* membrane might also be involved in MmA export from cells, and contribute to *S. ghanaensis* resistance to MmA. Only recently genes and

enzymes for Lipid II translocation have been discovered in model organisms *E. coli* and *Bacillus subtilis* [9]. However, nothing is known about Lipid II translocation in actinomycetes and *S. ghanaensis* as well. Therefore, in our work we pursued several goals. First, we identified, *in silico*, homologs of *E. coli* Lipid II flippase in *S. ghanaensis*. Second, we constructed plasmids for overexpression of the identified genes in *Streptomyces*, and studied the effects of increased gene dosage on moenomycin production, colony morphology and overall antibiotic resistance. Third, we attempted to knock out the gene for one of the identified MurJ homolog. Fourth, we explored whether *S. ghanaensis* ATCC14672 *murJ* homologs are able to complement conditionally deficient *murJ* strain of *E. coli* NR1154. As a result of these experiments, we show that the studied genes influence moenomycin production but not antibiotic resistance, although their exact biological roles in *S. ghanaensis* remain poorly understood.

Materials and Methods

Strains used and constructed in this work are listed in Table 1. Solid oatmeal (40g/l oat flour, 20g/l agar) and soy-mannitol media [5] were used to grow *Streptomyces* and plate matings. *B. cereus* and *E. coli* strains were grown in liquid or agar LB medium supplemented with appropriate antibiotic (if needed) at either 30 or 37 °C, respectively. For visual and microscopic lawn examination, strains were grown on oatmeal, soy-flour and TSB media. Vectors pKC1132 [5], pHYG, pGCymRP21, pTES, pUWLCre [11] were used for genetic engineering experiments. Genomic DNA from *Streptomyces* and plasmid DNA from *E. coli* were isolated using standard protocols [5]. Restriction enzymes and molecular biology reagents were used according to recommendation of suppliers (NEB, MBI Fermentas). Genome sequence of *S. ghanaensis* ATCC14672 was accessed through NCBI website.

Several plasmids were constructed in course of the work. 5-kb segment of *S. ghanaensis* ATCC14672 genome, centered on gene *SSFG_03627*, was amplified from *S. ghanaensis* ATCC14672 chromosome with primers mviN_{gh}-largeXbaIup (AAATCTAGACATGACCAAGGCCTCCAC) and mviN_{gh}-largeEcoRIrp (AAA GAATTCCTGCATCCGGTTCCGTTCC). Sites for restriction endonucleases (RE) are underlined in primer sequences. This segment was treated with RE XbaI and EcoRI and cloned into respective sites of pKC1132 to give pOOB100a. Gene *SSFG_03627* within pOO100a was replaced with hygromycin resistance cassette from pHYG using recombineering (primers mviN_{gh}-red-hyg-up: GCCATGCCGCGGGCAACTCGGGC-CACCCCGAGTCGGATCCCCGTA- GAGATTGGCGATCCC and mviN_{gh}-red-hyg-rp: TCAGCGTCCCAGGCGTCCGCGGACCATGCCGA- CCAGAGACAGGCGCCGGGGGCG-GTGTC). The final construct for *SSFG_03627* knockout was labeled as pOOB101c. Gene *SSFG_03627* was amplified with primers mviN_{gh}-XbaIup (AAATCTAGACCGTTGAGGATGTCGTGG) and mviN_{gh}-EcoRIrp (AAAGAATTCAGCGTCCCAGGCGTCC) and cloned into XbaI-EcoRI-digested vector pTES to give expression plasmid pOOB99a. For inducible expression of *SSFG_01411* 2.5-kb segment of *S. ghanaensis* ATCC14672, genome, contained the *SSFG_01411* gene, was amplified with primers ssfg_06665_up1 (AAAGATATCTAGAGTC-CACCGCAAGATCCTCGC) and ssfg_06665_rp (AAAGGATCCGA ATTCACCGCACCCCGGCAGGC). This segment was treated with XbaI+EcoRI and cloned into SpeI+EcoRI sites of pGCymRp21, under control of inducible P21-cmt promoter, to give pJS2. Also *SSFG_03627*, amplified with primers mviN_{gh}-XbaIup (AAATCTAGACCGTTGAGGATGTCGTGG) and mviN_{gh}-EcoRIrp (AAAGAATTCAGCGTCCCAGGCGTCC), was treated with XbaI+EcoRI and cloned into SpeI+EcoRI sites of pGCymRp21 to give pJS1.

Moenomycin was extracted from *S. ghanaensis* strains after five days of cultivation in liquid TSB medium and analyzed as described in [6]. Antibiotic resistance was analysed with disc

diffusion method. For scanning electron microscopy (SEM), small pieces of 7-day-old sporulating lawn were cut off the oatmeal agar plate samples, vacuum-dried and directly analyzed on a Jeol JSM-T220A scanning microscope.

Table 1

Bacterial strains used in this work

Strain	Relevant characteristics	Source / Reference
<i>E. coli</i> DH10B	Routine cloning host; F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> λ <i>rpsL</i> <i>nupG</i> .	Invitrogen
<i>E. coli</i> ET12567 pUZ8002	Strain for conjugative transfer of coresident plasmids; <i>dam13::Tn9</i> (Cm ^r) <i>dcm6</i> <i>hsdM</i> <i>hsdR</i> <i>zjj202::Tn10</i> (Tet ^r) <i>recF143</i> <i>galK2</i> <i>galT22</i> <i>ara14</i> <i>lacY1</i> <i>xyl5</i> <i>leuB6</i> <i>thi1</i> <i>tonA31</i> <i>rpsL136</i> (Str ^r) <i>hisG4</i> <i>tsx78</i> <i>mtl1</i> <i>glnV44</i> . pUZ8002 - Km ^r	[5]
<i>E. coli</i> BW25113 pIJ790	F ⁻ , DE(<i>araD-araB</i>)567, <i>lacZ4787</i> (del):: <i>rrnB-3</i> , LAM ⁻ , <i>rph-1</i> , [4] DE(<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR514</i> . Contains the λ RED recombination plasmid pIJ790.	[4]
<i>E. coli</i> NR1154	MurJ-depletion strain; MC4100 <i>ara+</i> Δ <i>lysA::kan</i> <i>murJ</i> Ω(-14:: <i>bla</i> <i>araC</i> P _{BAD}).	[9]
<i>E. coli</i> NR1154-99a	NR1154 derivative. Carries <i>SSFG_03627</i> gene (pOOB99a).	This work
<i>E. coli</i> NR1154 JS2	NR1154 derivative. Carries the <i>SSFG_01411</i> gene under control of cumate-inducible promoter (pJS2 plasmid).	This work
<i>Bacillus cereus</i> ATCC19637	Moenomycin-sensitive test culture.	ATCC
<i>S. ghanaensis</i> ATCC14672	Wild type moenomycin producer.	ATCC
<i>S. ghanaensis</i> YS1	ATCC14672 derivative. Carries the second copy of <i>SSFG_03627</i> gene integrated into <i>attB^{nc31}</i> . Am ^r	This work
<i>S. ghanaensis</i> YS2	YS1 derivative. pOOB99a vector sequences were excised from YS1 genome with pUWLCre plasmid. Am ^s	This work
<i>S. ghanaensis</i> YS3	YS2 derivative. The native copy of <i>SSFG_03627</i> of YS2 genome was knocked out with plasmid pOOB101c. Hy ^r Am ^s	This work
<i>S. ghanaensis</i> JS1	ATCC14672 derivative. Carries the extra copy of <i>SSFG_03627</i> gene under cumate-inducible promoter (pJS1).	This work
<i>S. ghanaensis</i> JS2	ATCC14672 derivative. Carries extra copy of <i>SSFG_01411</i> gene under cumate-inducible promoter (pJS2 plasmid).	This work
<i>S. albus</i> SAM2	Derived from <i>S. albus</i> J1074 by deletion of φC31 <i>pseB4</i> .	[1]
<i>S. albus</i> JS1	SAM2 derivative. Carries the extra copy of <i>SSFG_03627</i> gene under cumate-inducible promoter (pJS1 plasmid).	This work
<i>S. albus</i> JS2	SAM2 derivative. Carries the extra copy of <i>SSFG_01411</i> gene under cumate-inducible promoter (pJS2 plasmid).	This work

Genome sequences were accessed through NCBI. Orthologs prediction was carried out via reciprocal BLASTP analyses. Phylogenetic analysis was carried out using maximum-likelihood algorithm at www.phylogeny.fr; default parameters of phylogenetic reconstruction have been applied. Transmembrane domain prediction program TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) was used to analyze putative Lipid II flippases.

Results and Discussion

***In silico* search for MurJ homologs encoded within *S. ghanaensis* ATCC14672 genome.** Using amino acid sequence of *E. coli* MurJ, a putative flippase of Lipid II [9], we employed BLASTP to look for orthologs within *S. ghanaensis* ATCC14672 genome. Our initial search (in 2010) was based on analysis of partially sequenced *S. ghanaensis* ATCC14672 genome, and it returned protein SSFG_03627 (767 amino acids; 44 % similarity over 457-aa segment) as the reciprocal best BLASTP hit (RBH). According to program TMHMM, SSFG_03627 protein featured 14 transmembrane domains. This was consistent with a hypothesis about membrane

location of presumed Lipid II flippase. Recently we updated our ortholog search using more extensively sequenced *S. ghanaensis* ATCC14672 genome. With BLASTP program we searched RBH for SSFG_03627 in genomes of *Mycobacterium tuberculosis*, *B. subtilis* and *E. coli* K12 genomes. None of the hits was reciprocal this time. However, we identified another MurJ-like protein – SSFG_01411, that was RBH to all putative Lipid II flippases from the studied genomes, except for MurJ (Fig. 1). TMHMM program confirmed that SSFG_01411 had 14 possible trans-membrane domains in its structure (data not shown).

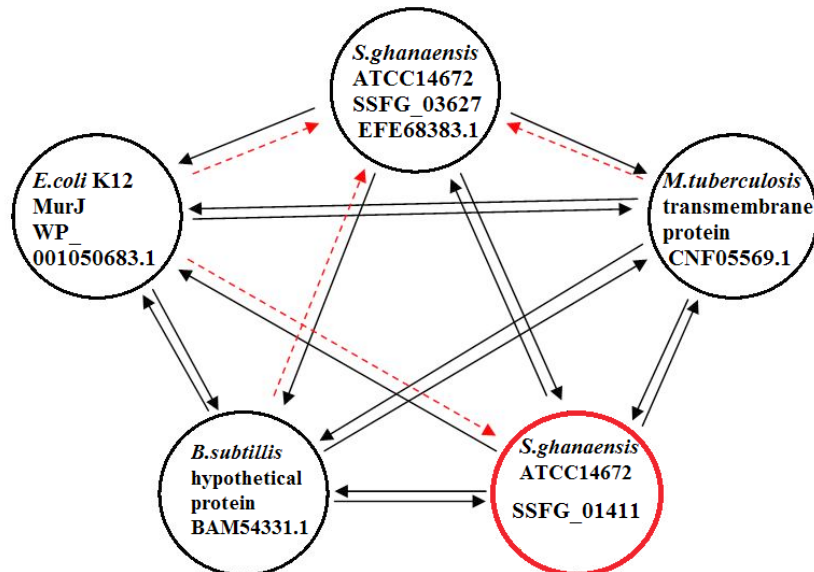


Fig. 1. Orthologous relationships (based on RBH strategy) within the group of putative Lipid II flippases from model strains and *S. ghanaensis* ATCC14672. Solid two-way arrows indicate RBH, dashed arrows indicate non-best hit (e.g., MurJ is RBH for SSFG_01411, but the latter is not RBH for MurJ). SSFG_01411 and SSFG_03627 are paralogues. In all cases *E* value in pairwise alignments was below 3^{-10} , implying that our findings were statistically significant

Studies of SSFG_03627 and SSFG_01411 in *S. ghanaensis* ATCC14672. Plasmid pOOB101c for *SSFG_03627* knockout (see Methods) was transferred into *S. ghanaensis* ATCC14672 and hygromycin-resistant (Hy^r), apramycin-sensitive (Am^s) clones (an indicative of *SSFG_03627* replacement with Hy^r cassette) were looked for. In spite of much effort, we failed to isolate viable Hy^rAm^s clones; all of them grew marginally and died after one passage. These facts pointed to essentiality of *SSFG_03627*. However, disruption of an essential gene should be possible if two copies of the latter are present in the genome. So we set out to delete native copy of *SSFG_03627* in *S. ghanaensis* ATCC14672 genome in presence of the second *SSFG_03627*, located *in trans*. The construction of *S. ghanaensis* ATCC14672 carrying two copies of *SSFG_03627* was therefore carried out as follows. First, second copy of *SSFG_03627* was integrated into *attB^{oC31}* of *S. ghanaensis* ATCC14672 genome using plasmid pOOB99a. The generated strain was referred to as *S. ghanaensis* YS1. Second, pOOB99a vector sequences were excised from *S. ghanaensis* YS1 using plasmid pUWLCre to give *S. ghanaensis* YS2 (Am^s). Third, native copy of *SSFG_03627* was knocked out of *S. ghanaensis* YS2 genome with plasmid pOOB101c. Hy^rAm^s clones were readily isolated, and one of them, marked as *S. ghanaensis* YS3, was verified by diagnostic PCR to carry the expected *SSFG_03627* knockout (data not shown).

Our results point that gene *SSFG_03627* is essential, because it could be easily deleted from *S. ghanaensis* ATCC14672 genome in presence of extra copy of *SSFG_03627*.

Also, plasmid pJS1 was conjugally transferred into *S. ghanaensis* ATCC14672 strain. We thus generated *S. ghanaensis* JS1 strain, which carried the extra copy of *SSFG_03627* gene under cumate-inducible promoter [6]. In the same way, we generated *S. ghanaensis* JS2 strain with extra *SSFG_01411* copy under cumate-inducible promoter. Both plasmids were also transferred into *S. albus* SAM2.

The next purpose of our work was to investigate the phenotype of above mentioned strains. We checked their resistance to common antibiotics and revealed no differences in comparison to initial strains. No significant morphological changes were also detected. Because of both structural and chemical similarities of Lipid II and MmA, we suggested that the latter could be transported out of the cell by MurJ homologues in *S. ghanaensis*. We analysed the level of MmA accumulation separately in mycelium and supernatant of *S. ghanaensis* fermentation medium with the help of biochromatography. These results are summarized in Fig. 2. In *S. ghanaensis* YS3 strain (deletion of native *SSFG_03627* gene), MmA production was almost completely blocked. In the wild type background, presence of *SSFG_03627*, either under *ermEp* (pOOB99a, lanes 2M, 2S) or P21-*cmt* (lanes 4M, 4S) led to qualitative and quantitative changes in moenomycin production profile. Particularly, *SSFG_03627* expression from plasmids caused *S. ghanaensis* to accumulate in mycelium as-yet-unidentified antibacterials, while accumulation of MmA and second most abundant phosphoglycolipid, nosokomycin B [7] was not observed. In the same time, MmA was also absent in the supernatant from *S. ghanaensis* YS1 and *S. ghanaensis* JS1 strains as compared to *S. ghanaensis* ATCC14672. Presence of extra copy of *SSFG_01411* (*S. ghanaensis* JS2) had no effects on moenomycin production (lanes 5M, 5S, Fig. 2). Finally, we determined the resistance to moenomycin A in *S. albus* JS1 and JS2 strains; no differences were found as compared to the wild type strain.

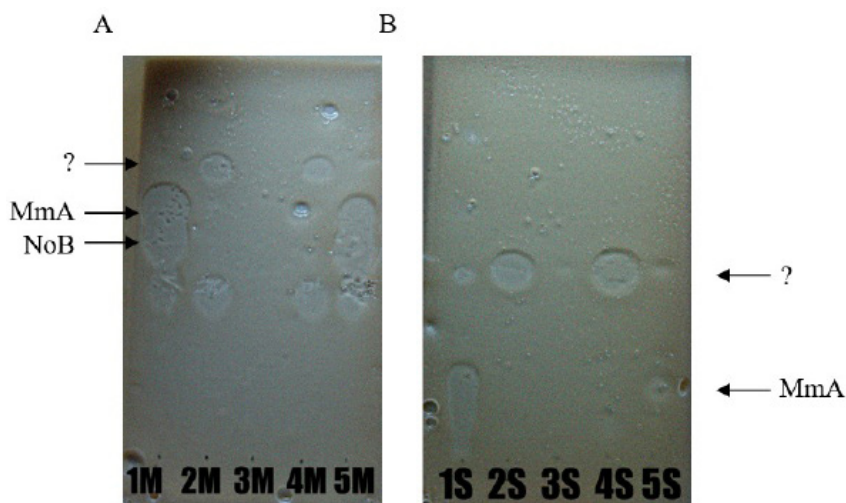


Fig. 2. Biochromatography of moenomycins extracted from mycelium (A) or supernatant (B) of following *S. ghanaensis* strains: ATCC14672 (lanes 1M(mycelium), 1S(supernatant)), YS1 (2M, 2S), YS3 (3M, 3S), JS1 (4M, 4S), JS2 (5M, 5S). Arrows mark bioactive spots corresponding to MmA and nosokomycin B (NoB). TLC plates shown on the photograph are representative of typical result of three independent repeats. Spot below NoB belongs to minor forms of moenomycin complex. Interrogation sign (?) marks unknown antibacterial compound, chemically unrelated to moenomycins

Complementation of *E. coli* NR1154 with putative *S. ghanaensis* flippase genes.

We attempted to complement *murJ* depletion strain *E. coli* NR1154 with either *SSFG_03627* or *SSFG_01411* genes. Briefly, *murJ* expression in *E. coli* NR1154 is under the control of arabinose-inducible promoter. Hence, growth (measured spectrophotometrically at OD₆₀₀) of NR1154 depends on the presence of arabinose in the medium. The plasmids pOOB99a (carries *SSFG_03627*) and pJS2 (*SSFG_01411*) were introduced through electroporation into *E. coli* NR1154 to obtain *E. coli* NR1154-99a and *E. coli* NR1154 JS2 strains respectively. Growth of the parental strain and both *E. coli* NR1154-99a and *E. coli* NR1154 JS2 strains was analyzed in presence of either arabinose or rhamnose; the latter, a nonmetabolizable sugar, caused cell lysis of *murJ* depletion strains. We observed no complementation in case of either plasmids. Unexpectedly, we observed growth of *E. coli* NR1154 strain in the absence of arabinose, which might point to some unanticipated changes in *E. coli* NR1154 genome.

To summarize, we have identified, *in silico*, two genes, candidates for Lipid II flippase in *S. ghanaensis*. We provide circumstantial evidence that one of them, *SSFG_03627*, is essential, at least under laboratory conditions. This gene also suppresses moenomycin production when natural expression mode is altered (e.g. when native copy is deleted or additional copy of *SSFG_03627* is introduced). All these data point to important role of Ssfg_03627 protein in *S. ghanaensis* biology, which might be related to transport of lipid-like substances across membrane. This work also underscores the importance of balanced transport processes for moenomycin production.

At the moment little can be told about function of the second gene, *SSFG_01411*. Its overexpression had no impact on the properties that we examined (resistance, morphology, antibiotic titers). More detailed investigation of this gene will be needed to uncover the role of this gene.

Acknowledgements. *B.O. was supported by the grant BG-41Nr from Ministry of Education and Science of Ukraine.*

REFERENCES

1. Bilyk B., Luzhetskyy A. Unusual site-specific DNA integration into the highly active pseudo-attB of the *Streptomyces albus* J1074 genome // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2014. Vol. 98. P. 5095–104.
2. Dereeper A., Guignon V., Blanc G. et al. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist // Nucleic Acids Res. 2008. Vol. 36. P. 465–469.
3. Gampe C. M., Tsukamoto H., Wang T. S. et al. Modular synthesis of diphospholipid oligosaccharide fragments of the bacterial cell wall and their use to study the mechanism of moenomycin and other antibiotics // Tetrahedron. 2011. Vol. 67. P. 9771–9778.
4. Gust B., Chandra G., Jakimowicz D. et al. Lambda red-mediated genetic manipulation of antibiotic-producing *Streptomyces* // Adv. Appl. Microbiol. 2004. Vol. 5. P. 107–128.
5. Kieser T., Bibb M. J., Buttner M. J. et al. Practical *Streptomyces* Genetics. Norwich: John Innes Foundation. 2000. 634 p.
6. Koshla O., Lopatniuk M., Rokyt'skyy I. et al. Properties of *Streptomyces albus* J1074 mutant deficient in tRNA(Leu)(UAA) gene *bldA* // Arch. Microbiol. 2017. May 20. doi: 10.1007/s00203-017-1389-7.
7. Ostash B., Campbell J., Luzhetskyy A., Walker S. MoeH5: a natural glycorandomizer from the moenomycin biosynthetic pathway // Mol. Microbiol. 2013. Vol. 90. P. 1324–38.
8. Ostash B., Doud E.H., Lin C. et al. Complete characterization of the seventeen step moenomycin biosynthetic pathway // Biochem. 2009. Vol. 48. P. 8830–8841.
9. Ruiz N. Lipid Flippases for Bacterial Peptidoglycan Biosynthesis // Lipid Insights. 2016. Vol. 13. P. 21–31.

10. Sambrook J., Russell D. W. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory. 2001. 450 p.
11. Siegl T., Luzhetskyy A. Actinomycetes genome engineering approaches // Antonie Van Leeuwenhoek. 2012. Vol. 102. P. 503–16.

Стаття: надійшла до редакції 31.05.17

доопрацьована 04.07.17

прийнята до друку 06.07.17

ВИВЧЕННЯ ГЕНІВ *STREPTOMYCES GHANAENSIS* ATCC14672 *SSF_{GH}_03627* ТА *SSF_{GH}_01411*, ЩО КОДУЮТЬ ІМОВІРНІ МЕМБРАННІ БІЛКИ

Ю. Сегін, Б. Осташ

Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: b.ostash@lnu.edu.ua

Streptomyces ghanaensis ATCC14672 – продуцент моеноміцину А, фосфогліколіпідного антибіотика, що діє на бактерійні пептидогліканові глікозилтрансферази (PGTs). Генетичні та біохімічні аспекти синтезу моеноміцину залишаються не цілком зрозумілими. Досі невідомо, як моеноміцини транспортуються назовні з клітини, і чи може активний транспорт моеноміцину бути важливим для набуття резистентності продуцента до власного потенційно токсичного вторинного метаболіта. Спостерігається загальна структурна і функціональна подібність між моеноміцином і ліпідом II – життєво важливим попередником пептидоглікану (схожа ліпідно-глікозидна основа, обидва зв'язують PGTs). Ми припускаємо, що продукти гена(ів), задіяні у транспорті ліпиду II через мембрану *S. ghanaensis* ATCC14672, аналогічно до MurJ *Escherichia coli*, можуть брати участь в експорті моеноміцину. У цій роботі ми виконали початкову генетичну характеристику двох ідентифікованих нами *murJ*-подібних генів *S. ghanaensis* ATCC14672, а саме *SSF_G_03627* і *SSF_G_01411*. Ген *SSF_G_03627* – життєво важливий, і його може бути делетовано з генома *S. ghanaensis* ATCC14672 тільки за наявності додатково внесеної копії гена *SSF_G_03627*. Спроби комплементувати *murJ*-дефектний штаб *E. coli* NR1154 вищезгаданими генами *S. ghanaensis* були невдалими. Маніпуляції з числом копій гена *SSF_G_03627* мали складний вплив на продукцію моеноміцину в *S. ghanaensis* ATCC14672.

Ключові слова: стрептоміцети, моеноміцин, стійкість до антибіотиків, фліппази ліпиду II

ЕФЕКТИВНІСТЬ ДНК ІНТЕГРАЦІЇ ТА ВИЖИВАНІСТЬ ЗИГОТ МИШЕЙ ЗА УМОВ ПРОНУКЛЕАРНОЇ МІКРОІН'ЄКЦІЇ

О. Штапенко^{1*}, А. Мадіч², С. Федорова¹

¹Інститут біології тварин НААН України України
вул. В. Стуса, 38, Львів 79034, Україна

²Кембриджський університет, CB10 1SA, Великобританія
e-mail: shtapenko31@gmail.com

Застосуванням методу мікроін'єкції у пронуклеус зигот мишей було продемонстровано, що трансгенна конструкція, яка містить ген *LOC 78634*, що кодує спермальний білок на акросомальній частині сперматозоїда, здатна інтегруватись у геном реципієнта з достатнім рівнем трансгенної експресії. Мікроін'єкції 2 і 4 пкл розчину ДНК, що містить 5,4 нг/мкл екзогенної ДНК, як і введення ТЕ буфера, знижує життєздатність зигот, однак нижча концентрація розчину ДНК (2 пкл) зумовлює кращу здатність ембріонів мишей розвиватися до стадії бластоцисти поза організмом і забезпечує кращу плацентажію ін'єктованих зигот після ембріональної трансплантації, порівняно з ін'єкціями розчину ДНК з концентрацією 4 пкл ($p < 0,05$). Рівень імплантації зигот після ін'єкції у пронуклеус трансгену у тій чи іншій концентрації був суттєво вищий за відсоток зигот, які досягнули стадії бластоцисти поза організмом: 36,7 % та 30 % за умов експерименту *in vivo* порівняно з 8,6 % і 5,7 % за умов *in vitro*, що доводить доцільність безпосередньої трансплантації ембріонів реципієнтові. Ефективність трансгенезу у групах становила 6,7 % та 3,3 % для концентрації екзогенної ДНК конструкції 2 і 4 пкл/мл, відповідно. Серед 20 народжених нащадків було ідентифіковано 3 трансгенні мишки (15 %), дві самки та один самець, що підтверджено електрофорезом продуктів ампліфікації ПЛР-аналізу з ДНК тканин.

Ключові слова: мікроін'єкція, інтеграція ДНК, імплантація, експресія

Розробка й удосконалення ефективності технології переносу генів дає змогу вивчати механізми функціонування окремих ділянок ДНК, регуляції їхньої експресії, активації промоторів на різних етапах онтогенезу. Внесення чужорідної генетичної інформації викликає дестабілізацію геному реципієнта. Важкопередбачуваним є подальший розвиток трансгенів, що пов'язують із частотою генної модифікації та неконтрольованою експресією. Це істотно утруднює використання трансгенезу як у дослідницьких, так і в прикладних цілях. У зв'язку з цим важливого значення набуває пошук найбільш ефективних форм генних конструкцій і умов їхнього введення, а також створення модельних систем для пошуку закономірностей взаємодії між трансгеном і геномом зиготи-реципієнта [5].

Здійснення трансгенної експресії у різних типах клітин досягається за рахунок використання генної конструкції, в якій основна кодуєча послідовність ДНК-ділянок розташована після клітино-специфічної промоторної частини гена. Використання такої з'єднаної конструкції для мікроін'єкції у пронуклеус заплідненої яйцеклітини, яку потім трансплантують у яйцепровід самки-реципієнта, спричиняє трансгенну інтеграцію [4, 15]. Позитивні трансгенні нащадки, які відрізняються від братів і сестер за фенотипом (у мишей використовують забарвлення хутра), схрещуються, а їхніх нащадків аналізують за експресією введених гетерогенних генів (прижиттєві зразки тканин). У разі позитивного аналізу таких нащадків використовують для накопичення генетичного матеріалу зі стабільною інтеграцією та експресією трансгена.

Мікроін'єкція плазмідних генно-інженерних конструкцій у пронуклеуси зигот є основним методом отримання трансгенних тварин. Суттєві зміни стосуються використання лентовірусів як методу модифікації трансгенів, або застосування принципово новітніх технологій, зокрема, систем ZNF, TALEN та CRISPR/Cas9 мРНК [7, 20]. Однак застосування лентовірусних трансгенів виявилось низькоефективним, а цитоплазматична ін'єкція Cas9 mRNA/sgRNA поки що утруднена через високий відсоток лізованих ооцитів після мікроін'єкції, хоча і є високорезультативною в окремих випадках. Хоча, на відміну від ZNF і TALEN, використання системи CRISPR/Cas9 потребує конструювання короткого олігомера, адже до системи CRISPR/Cas9 входять короткі некодуючі РНК (gRNA), які комплементарно взаємодіють з ДНК мішенню, маркуючи таким чином специфічну ділянку ДНК для подальшого розрізання Cas9 нуклеазою [2].

Застосування методу пронуклеарної мікроін'єкції ДНК-конструкцій у дослідницьких лабораторіях і ефективність переносу генів залишається досить низькою, що обмежує використання цього методу для отримання трансгенних сільськогосподарських тварин. Однією з причин, що стримує застосування трансгенних технологій, є низька частота інтеграції рекомбінантних генів у геном тварин-реципієнтів, механізм якої до кінця не з'ясовано [12]. Ефективність трансгенезу у мишей становить лише 2 %, а генетична інтеграція не перевищує 15 % [1]. Отримання стійкої інтеграції та експресії трансгену в геномі реципієнта (зиготи) зі стійкими заданими ознаками у ряді поколінь нащадків – основна мета трансгенезу і його суть.

Процедура виконання трансгенних мікроін'єкцій є технічно прецедентною, а результативність залежить від методичних підходів, які лежать у технічній і біологічній площині. Зокрема, ефективність методу обумовлена кількістю зигот, що залишилися життєздатними після мікроін'єкції генної конструкції у пронуклеус, їхньою здатністю до подальшого дроблення й утворення двобластомерних ембріонів та імплантації в організмі матері. Це спонукає до пошуку нових і вдосконалення наявних підходів [8, 16, 19].

Підвищити ефективність технології мікроін'єкції ДНК у пронуклеус зиготи можливо за рахунок оптимізації кожного з етапів. Більшість ембріонів гинуть після мікроін'єкції генних конструкцій, під час мікроін'єкції та у пренатальному періоді розвитку. На частоту інтеграції гена впливає ступінь очищення ін'єкційного розчину, форма і склад генної конструкції та концентрація ДНК, інгредієнти ін'єкційного буферу, якість зигот, а також виконання методу мікроін'єкції. Результати досліджень на різних видах тварин показали, що частота інтеграції окремих генів може залежати від форми плазміди. Зокрема, при введенні ДНК у пронуклеус зигот миші інтеграція кільцевої форми становила до 8 %, а лінійної – зростала до 24–31 % [10]. Метод мікроін'єкції ДНК добре відпрацьований і досить консервативний, тому його оптимізація передбачає ретельний підбір буферних середовищ та оптимальної концентрації розчину для мікроін'єкції.

Сперматогенез є одним із найбільш динамічних багатостадійних процесів, пов'язаних із диференціацією чоловічих гамет, який контролюється сотнями генів і перебуває під впливом багатьох внутрішніх та зовнішніх чинників. Дослідження особливостей дозрівання спермій, зокрема, змін структури мембран спермій і прояв акросомної реакції, що забезпечує злиття з оолеомою, penetрацію блискучої оболонки та запліднення яйцеклітини, допоможуть з'ясувати біохімічні закономірності сперматогенезу на молекулярному та клітинному рівнях. До одного з білків акросомного матриксу належить LOC 78634. Встановлено, що при дозріванні сперматозоїдів відбуваються зміни у розподілі LOC 78634-білка, який на початку формування акросоми локалізується в перинуклеальній частині біля елементів комплексу Гольджі та проакросомних гранулах сперматид, а також

спостерігається в акросомі епідидимальних спермій [14]. Також було показано, що LOC 78634 вивільняється при акросомній взаємодії, що вказує на важливу роль досліджуваного білка для забезпечення повноцінності проходження акросомної реакції та подальшого запліднення [18].

Метою досліджень було з'ясувати вплив різної концентрації екзогенної модифікованої форми лінійної ДНК для мікроін'єкції у пронуклеус зигот мишей.

Згідно з поставленою метою були окреслені такі завдання: 1. Встановити оптимальну концентрацію вибраної генно-інженерної конструкції, що містила ген *LOC78634* для мікроін'єкції у пронуклеус зигот мишей. 2. Дослідити умови для розвитку зигот мишей поза організмом з метою одержання ембріонів трансферабельних стадій. 3. Продемонструвати можливість імплантації ін'єктованих зигот після трансплантації.

Матеріали та методи

Як вихідний генний конструкт в експерименті було використано плазмиду *pLNCX2* ("Promega" США), що містила ген *LOC 78634* (ген, який кодує акросомальний білок) і репортерний ген *GFP* (ген зеленого флуоресцентного білка). Цей конструкт переклонували у плазмиду *pGEM2*, в якій ген *LOC 78634* перебував під контролем регуляторних ділянок гена *pHspa2* (ген, який кодує білки теплового шоку й індукується у відповідь на гіпертермію) та містив репортерний ген *GFP* [14].

Приготування розчину ДНК для мікроін'єкцій у пронуклеус. Генетичну конструкцію, яка містила потрібний фрагмент ДНК (розміром 4300 п.н.) шляхом гідролізу плазмідного вектора *pGEM2-LOC78634* за допомогою рестрикційних ендонуклеаз *Sall* і *SphI* та розділяли в 0,7 % агарозному гелі. Для елюювання фрагментів ДНК із агарози використовували колонки *Elutip minicolumns* (Scheicher Schuell, Germany) згідно з методикою фірми-виробника. Виділений і очищений фрагмент ДНК для мікроін'єкцій розводили у буфері TE (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,1 mM EDTA) до концентрації розчину ДНК 5,7 нг/мкл. Для мікроін'єкції у пронуклеуси зигот вводили розчин ДНК у концентраціях 2 та 4 пкл/мл, відповідно. Розчин ДНК у концентраціях 2 (Д1) та 4 пкл (Д2) вводили при мікроін'єкції у пронуклеуси зигот.

Вибір тварин і одержання зигот мишей. Дослідження були проведені на білих лабораторних мишах гібридної лінії ICR (CD-1) *Albino*. Зиготи отримували після індукції суперовуляції шляхом внутрішньочеревного (вч) введення самкам гонадотропіну сироватки жеребних кобил (PMSG, Biowet, Drwalew Poland) у кількості 5 МО. Через 48 год самкам вводили (вч) хоріонічний гонадотропін hCG (Pregnyl, Organon) у кількості 5 МО та підсаджували їх до самців. Результативність запліднення оцінювали за наявністю копулятивних корків наступного ранку. Евтаназію тварин здійснювали через 19–20 год після ін'єкції хоріонічного гонадотропіну, дислокацією шийних хребців. Зиготи на стадії двох пронуклеусів вимивали з ампульної ділянки яйцепроводів у середовищі M2 з гіалуронідазою (80 МО/мл) під біокуляром. За 2–3 хв зиготи переносили у чашку з чистим M2 для відмивання від кумулюсних клітин. Після відмивання всі зиготи розподілили на три категорії: зиготи з видимими пронуклеусами, дегенеровані/фрагментовані та сумнівні. Зиготи з видимими пронуклеусами були задіяні в експерименті, сумнівні становили додаткову групу і окремі з них через 1 год у культуральному середовищі виявилися також придатними до мікроін'єкції, дегенеровані/фрагментовані виключили з експерименту.

Отримані зиготи переносили у підготовлені завчасно краплі (500 мкл) культурального середовища KSMO з 5 % фетальною сироваткою теляти (ФСТ) під мінеральним маслом і культивували у термостаті при 37 °C до початку процедури мікроін'єкції.

Метод мікроін'єкції в пронуклеус. Для мікроін'єкції рекомбінантної ДНК використовували скляні капіляри з внутрішнім діаметром 5–10 мкм, виготовлені напередодні витягуванням із капілярної трубочки з мікрофіламентом (тонкостінне тугоплавке скло, діаметром 1 мм) на горизонтальному пулері *Sutter instrument Co P-97*. Мікроін'єкції здійснювали за допомогою механічного мікроманіпулятора *Leica* (German).

Зиготи переносили у мікроін'єкційну камеру зі середовищем M2 під мінеральною олією, по 15 зигот у кожній сесії. Перед початком роботи на мікроманіпуляторі фіксували утримуючу піпетку зліва та ін'єкційну голку справа. Мікроін'єкційну голку сполучали силіконовою трубкою з мікроін'єктором *Eppendorf*. Використовували підігрів столика мікроскопа, на якому розташовували камеру для проведення маніпуляцій. Розчином ДНК наповнювали ін'єкційну скляну голку, використовуючи дію капілярних сил, і закріплювали її в маніпуляторі. Положення обох мікроінструментів (фіксуючої піпетки та мікроін'єкційної голки) щодо мікроін'єкційної камери регулювали за допомогою лівого і правого мікроманіпуляторів. Мікроін'єкції проводили під інвертованим мікроскопом *Axiovert 35* при збільшенні 400×

Кожну зиготу утримували скляною піпеткою та ін'єктували 1–2 пкл розчину ДНК у чоловічий пронуклеус. Про успішність процедури вказувало візуальне збільшення об'єму пронуклеуса [11, 13]. Після завершення мікроін'єкції зиготи оцінювали морфологічно, відокремлювали від лізованих зародків (дегенерованих внаслідок мікроін'єкції) та продовжували культивування упродовж 3–4 діб до утворення кавітаційної порожнини (умови розвитку *in vitro*) або ж переносили у краплі M2 для безпосередньої трансплантації псевдовагітним реципієнтам (розвиток *in vivo*).

Трансплантація зигот. Статевозрілих самок вагою не менше 24 г, яких синхронізували за аналогічною схемою і спаровували з вазектомованими самцями, використовували як реципієнтів для ембріональної трансплантації. Загальну анестезію тварин проводили з використанням 2,5 % розчину авертину (*Avetun, Sigma*) з розрахунку 15 мкл на 1 г ваги.

Зиготи трансплантували в ампулу яйцепроводу самиці-реципієнта по 7–8 ембріонів у кожен яйцепровід. Після трансплантації ембріонів кожен самку утримували в окремій клітці упродовж усього періоду вагітності.

Аналіз зразків тканин. Аналіз інтеграції трансгена в геном зиготи реципієнта проводили методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). На 14-ту добу після народження у мишей відбирали зразки тканини кінчика хвоста для виділення ДНК [9] і аналізу інтеграції. Фрагмент гена *GFP* ампліфікували за допомогою *Taq*-полімерази у буфері з 2,5 мМ $MgCl_2$ за наявності 2 мМ *dNTP* та 10 пмоль кожного праймера у таких режимах: денатурація при 94 °C – 3 хв; далі 4 цикли при: 94 °C – 20 с, 62 °C – 30 с, 72 °C – 35 с; 8 циклів при: 94 °C – 20 с, 60 °C – 30 с, 72 °C – 35 с; 25 циклів при: 94 °C – 20 с, 58 °C – 30 с, 72 °C – 35 с та останній синтез при: 72 °C – 10 хв. Для ампліфікації репортерного гена *GFP* використовували праймери прямий F: 5-CAAAGGAGGAAAGTGGCAAA-3 і зворотний R: 3-GAACTTCAG-GGTCAGCTTGC-5, підібрані за допомогою комп'ютерної програми OLIGO 4.0. Величина продукту ампліфікації становила 377 п.н. Електрофоретичне розділення фрагментів ДНК проводили в горизонтальному 0,8 % агарозному гелі з бромистим етидієм [6].

Результати і їхнє обговорення

Важливим завданням введення генно-інженерної конструкції у пронуклеуси зигот є здатність зародків до подальшого розвитку. Відомо, що на виживаність зигот після мікроін'єкції рівень імплантації та частоту інтеграції трансгена впливає багато факторів, зокрема, концентрація робочого розчину ДНК-конструкції, склад буферу для розведення,

стадії клітинного циклу зигот і технічне виконання методу [17]. Представлені нижче результати досліджень відображають основні показники подальшого розвитку зигот унаслідок мікроін'єкції трансгенної конструкції, що містила ген *LOC78634*, у концентраціях 2 і 4 пкл/мл порівняно з ін'єктованим буфером ТЕ (позитивний контроль) та інтактними ембріонами мишей (негативний контроль) при культивуванні *in vitro*, а також після трансплантації реципієнтам.

Отже, зиготи, яким ін'єктували генно-інженерну конструкцію у концентрації 2 пкл/мл, належали до 1-ї дослідної групи. У пронуклеус зигот 2-ї дослідної групи ін'єктували трансген у концентрації 4 пкл/мл. До 3-ї дослідної групи належали зиготи, у пронуклеус яких вводили ТЕ буфер (позитивний контроль). Як негативний контроль використовували інтактні зиготи, які культивували в аналогічному середовищі упродовж 4 діб. Відсоток розвинутих зародків визначали від кількості життєздатних зигот на початковій стадії культивування (табл. 1).

Таблиця 1

Розвиток зигот мишей до стадії бластоцисти за умов мікроін'єкції у пронуклеус трансгена в різних концентраціях, n=160

Основні показники	Групи зигот			
	К ⁺	Д1	Д2	К ⁻
Ін'єктовані зиготи, n-%	21	105	120	–
Зиготи, які перенесли ін'єкцію, n-%	20	70	70	14
Ембріони на стадії 2-4 клітин, n-%	9 – 45%	30 – 42,9	25 – 35,7%*	10 – 71,4%
Ембріони на стадії бластоцисти, n-%	1 – 5%	6 – 8,6%	4 – 5,7%	3 – 21,4%

Примітка: * $p < 0,05$; К⁺ позитивний контроль, зиготи ін'єктовані ТЕ-буфером; Д1 – зиготи, мікроін'єктовані ДНК концентрацією 2 пкл/мл; Д2 – зиготи, мікроін'єктовані ДНК концентрацією 4 пкл/мл; К⁻ – негативний контроль, інтактні зиготи

За 1-шу і 2-гу добу культивування не спостерігали значних відмінностей між зиготами позитивного контролю (ТЕ буфер) та 1-ї дослідної групи (2 пкл). Зокрема, відсоток ембріонів, які подолали 2–4-клітинну стадію розвитку, становив 42,9 % у 1-й дослідній групі проти 45 % у позитивному контролі. Збільшення концентрації ДНК до 4 пкл/мл знизило здатність ін'єктованих зигот до подальшого розвитку. Тільки 35,7 % зигот досягнуло стадії дроблення 2–4-клітини, що становило вірогідну різницю із 1-ю дослідною групою ($p < 0,05$).

Відсоток зигот, які досягнули стадії бластоцисти у 1-й дослідній групі, був вищим порівняно з позитивним контролем: 8,6 % проти 5 %. Мікроін'єкція екзогенної ДНК у концентрації 4 пкл/мл стримала розвиток зигот до бластоцитарної стадії: лише 5 % ембріонів демонстрували ознаки кавітації та первинної диференціації бластомерів. Отримані результати вказують, що використана генетична конструкція не перешкоджає розвитку зародків і не чинить токсичного впливу, про що свідчить здатність зигот після мікроін'єкції розвиватися до стадії бластоцисти за умов *in vitro*.

У наступному експерименті вивчали рівень імплантації зигот за ін'єкції різних концентрацій трансгену у пронуклеус після хірургічної трансплантації псевдовагітним самкам. У результаті гормональної стимуляції 6-ти самок було вимито 255 зигот. Із них 120 оцінено як такі, що містять видимі пронуклеуси і можуть бути використані для мікроін'єкції вибраної генної конструкції у концентрації 2 пкл (n=60) і 4 пкл (n=60). Після проведення мікроін'єкції було відібрано і трансплантовано 60 із 84 зигот, які добре перенесли мікроін'єкцію у пронуклеус. Для цього було використано 4 самиці-реципієнти, кожній із яких хірургічно пересадили по 15 зигот. Через 21 день у 3-х із 4-х самок-реципієнтів вагітність закінчилася народженням здорового молодняка. Серед 20 народжених мишенят отримано 3 трансгенні нащадки, 1 самець і 2 самочки.

Дані ефективності інтеграції гена *LOC78634* у народжених мишей в результаті трансплантації зигот після мікроін'єкції у пронуклеус представлено нижче (табл. 2).

Таблиця 2

Інтеграція гена *LOC78634* внаслідок мікроін'єкції у пронуклеуси зигот миші, n=120

Основні показники	Групи зигот	
	Д1 – 2пкл	Д2 – 4пкл
Ін'єктовані зиготи, n	60	60
Зиготи, які перенесли ін'єкцію, n-%	53 – 88,3 %**	31 – 45,6 %
Трансплантовані зиготи, n	30	30
Використані самки-реципієнти, n	2	2
Вагітні самки-реципієнти, n-%	2 – 100 %	1 – 50 %
Народжені мишенята, всього, n	11	9
Рівень імплантації ін'єктованих зигот, %	11/30 – 36,7 %	9/30 – 30 %
із них трансгенних, n	2	1
Ступінь інтеграції, %	2/11 – 18,2 %	1/9 – 11,1 %
Загальна ефективність трансгенезу, %	2/30 – 6,7 %	1/30 – 3,3 %

Примітки: ** p<0,01; Д1 – дослідна група 1; Д2 – дослідна група 2

Аналізуючи вплив концентрації ДНК-конструкції, яка використана для пронуклеарної мікроін'єкції, на виживання ембріонів і ступінь інтеграції трансгена можна стверджувати, що трансплантація ін'єктованих генотом *LOC78634* зигот концентрацією 2 та 4 пкл була успішною в обох групах, однак рівень виживаності зигот унаслідок мікроін'єкції вірогідно відрізнявся, склавши 88,3 % і 45,6 %, у першій і другій дослідній групі, відповідно (p<0,01). В обох групах реципієнтам було трансплантовано 30 мікроін'єктованих зигот, по 7–8 зигот у кожен яйцепровід. Рівень імплантації становив 36,7 % та 30 % без вірогідної різниці між групами. Із 20 народжених нащадків одержано 3 трансгенних мишенят, що становить 15 % інтеграції гена *LOC78634* в експерименті, або 18,2 % за умов ін'єкції екзогенної ДНК у концентрації 2 пкл і 11,1 % – у концентрації 4 пкл/мл.

Загальна ефективність трансгенезу становила 6,7 % та 3,3 %, відповідно: серед народжених тварин було ідентифіковано 3 трансгенні мишки: дві самки та один самець. Електрофореграму продуктів ампліфікації ПЛР-аналізу з ДНК тканин хвостів народжених мишенят представлено на рис. 1.



Рис. 1. Електрофореграма ампліконів, обмежених праймерами EGF1 (s) і EGF1 (as), у ПЛР-аналізі геномної ДНК нащадків мишей, отриманих після трансплантації зигот мікроін'єктованих ДНК конструкцією *LOC78634*: 1–9, та 10–15 – зразки ДНК, виділені з тканин хвостів народжених нащадків («+» – трансгенні миші); K+ – позитивний контроль (плазміда pHst-GFP); K- – негативний контроль (mix PCR); M – маркер (pBS/MspI). Стрілка вказує на положення фрагмента розміром 377 п.н., що відповідає експресії гена GFP у трансгенних мишей

Ефективність інтеграції отриманого трансгена залежить від типу використаного при створенні конструкції вектора, розміру та форми рекомбінантної ДНК. Тому після створення нових генно-інженерних конструкцій важливим етапом є їхнє тестування з урахуванням, зокрема, впливу концентрації ДНК на життєздатність зародків після маніпуляцій, ступеня інтеграції трансгена, що дасть змогу при потребі модифікувати отриману генну конструкцію та вибрати найбільш перспективну для подальшого отримання трансгенних тварин.

В одній із робіт після аналізу результатів отримання трансгенних мишей мікроін'єкцією 12 генно-інженерних конструкцій автори дійшли до висновку, що загальна ефективність технології за однакових умов проведення мікрomanipуляцій залежить від використаної генної конструкції, ступеня її очищення у процесі підготовки до проведення операцій, тоді як ефективність інтеграції введеної генної конструкції не залежить від рівня приживлення мікроін'єктованих зигот [3]. При відносно низьких показниках приживлення зигот 3,3 % і 6,8 % для генних конструкцій *LTF 2* та *PU 2*, вихід трансгенних тварин становив 1,4 % і 1,6 % та був аналогічним як і при використанні конструкцій *PU 2* та *PU 4*, коли приживлення мікроін'єктованих яйцеклітин було значно вищим і становило 9,2 % та 11,8 %. Порівняно з іншими даними, у наших дослідженнях при використанні генної конструкції *LOC78634* в обох досліджуваних концентраціях трансгена і частота інтеграції (18,2 % та 11,1 %), і ефективність трансгенезу (6,7 % та 3,3 %) перебували на відносно високому рівні.

Аналізуючи результати розвитку мікроін'єктованих у пронуклеус зигот, можна припустити, що пріоритетним вибором є безпосередня трансплантація таких зигот псевдовагітним самкам, оскільки культуральне середовище не забезпечує достатніх умов для надолуження бластомерної критичної маси або ж не зумовлює утворення клітинних комплексів, необхідних для перетікання процесів, які супроводжують первинну диференціацію ембріональних бластомерів і перехід до наступної стадії. Зокрема, рівень імплантації зигот після ін'єкції у пронуклеус трансгена у тій чи іншій концентрації був вищий за відсоток зигот, які досягнули стадії бластоцисти поза організмом: 36,7 % та 30 % за умов *in vivo* експеримента порівняно до 8,6 % і 5,7 % за умов *in vitro*.

Використана генно-інженерна конструкція, яка містить ген *LOC78634*, за умов мікроін'єкції у пронуклеуси зигот мишей, характеризується здатністю до інтеграції у геном зиготи-реципієнта. Показано, що концентрація трансгена у кількості 2 пкл сприяє зростанню частоти інтеграції до 18,2 % та ефективності трансгенезу 6,7% порівняно з концентрацією 4 пкл/мл з 11,1 % та 3,3 %, відповідно. Пріоритетним вибором є безпосередня трансплантація таких зигот псевдовагітним самкам, оскільки культуральне середовище не забезпечує достатніх умов для надолуження бластомерної критичної маси ембріонами, навіть якщо вони успішно подолали двоклітинний блок дроблення. Рівень інтеграції та ефективність трансгенезу ін'єктованих зигот розвинутих у бластоцисти або повноцінні організми за концентрації вибраної екзогенної ДНК 2 і 4 пкл становить 8,6 % і 5,7 % за умов *in vitro* та 36,7 % і 30 % за умов експеримента *in vivo*.

Ця робота виконана в *M.Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, Gliwice* за підтримки гранту *National Cancer Institute, NCI, Bethesda (USA)*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Дзіцюк В., Себа М. Трансгенез у тваринництві – перспективи і проблеми // Наук.-техн. бюл. Ін-ту біології тварин та Держ. н.-д. контрол. ін-ту ветпрепаратів та корм. добавок. 2012. Вип. 13. № 3/4. С. 420–423.

2. *Зиновьева Н. А., Волкова Н. А., Багиров В. А., Брем Г.* Трансгенные сельскохозяйственные животные: современное состояние исследований и перспективы // *Экологическая генетика*. 2015. Т. XIII. 5, № 2. С. 58–76.
3. *Кадулин С. Г., Ермолкин Т. Г., Андреева Л. Е.* Анализ пересадки микроинъецированных зигот при получении трансгенных мышей // *Онтогенез*. 2006. Т. 37. № 2. С. 1–6.
4. *Козикова Л. В., Росохацкий С. И., Душевская А. М., Андреева Л. Е.* Паттерн экспрессии репортерных генов трансгенных эмбрионов домашних животных и рыб // *Достижения науки и техники АПК*. 2010. № 5. С. 55–57.
5. *Максименко О. Г., Дейкин А. В., Ходарович Ю. М., Георгиев П. Г.* Использование трансгенных животных в биотехнологии: перспективы и проблемы // *Acta Naturae*. 2013. Т. 5. № 1(16). С. 33–47.
6. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. К.: Мир, 1984. 479 с.
7. *Немудрый А. А., Валетдинова К. Р., Медведев С. Р., Закиян С. М.* Система редактирования геномов TALEN и CRISPR/CAS – инструменты открытий // *Acta Naturae*. 2014. № 3 (22). Т. 6. С. 20–42.
8. *Никитин В. А.* Методы введения веществ и органелл в клетку в технологиях клеточной инженерии // *Цитология*. 2007. Т. 49. № 8. С. 631–641.
9. Новое в клонировании ДНК. Методы / под ред. Д. Гловера. М.: Мир, 1989. 368 с.
10. *Brinster R. L., Chen H. Y., Trumbauer M. E. et al.* Factor affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1985. Vol. 82. P. 4438–4442.
11. *DeMayo J. L., Wang J., Liang D. et al.* Genetically Engineered Mice by Pronuclear DNA microinjection // *Curr. Protoc. Mouse Biol*. 2012. Vol. 1. N 2. P. 245–262.
12. *Hirabayashi M., Takahashi R., Ito K. et al.* A comparative study on the integration of exogenous DNA into mouse, rat, rabbit and pig genomes // *Exp. Anim*. 2001. Vol. 50(2). P. 125–131.
13. *Ittner L. M., Gotz J.* Pronuclear injection for the production of transgenic mice // *Nature protocols*. 2007. N 2. P. 1206–1215.
14. *Korfanty J., Toma A., Wojtas A. et al.* Identification of a new mouse sperm acrosome-associated protein // *Reproduction*. 2012. Vol. 143. P. 749–757.
15. *Madich A., Brown E., Pearson L. et al.* Generation of chimeric mice: Comparison of the effects of holding conditions of blastocysts to Embryonic Stem cells injection // 65th AALAS meeting (poster 168/abstract). San-Antonio, TX, October 19–23rd, 2014.
16. *Madich A., Brown E., Pearson L. et al.* Comparative analysis of the injectability of in vivo derived Morulae reaching Blastocyst stage in KSOM or M15 // 12th ICTT meeting. Edinburgh. October 4–6th, 2014. P. 74.
17. *Murakami M., Ideguchi S., Fahrudin M. et al.* Influence of the DNA amount per microinjection on the development and EGFP expression in bovine embryos // *Arch. Tierz., Dummerstorf*. 2003. Vol. 46 (1). P. 25–30.
18. *Nguyen E. B., Westmuckett A. D., Moore K. L.* SPACA7 is a novel male germ cell-specific protein localized to the sperm acrosome that is involved in fertilization in mice // *Biol. Reprod*. 2014. Vol. 90(1). P. 1–13.
19. *Park J. S., Han Y. M., Lee C. S. et al.* Improved development of DNA-injected bovine embryos co-cultured with mouse embryonic fibroblast cells // *Anim. Reprod. Sci*. 2000. Vol. 59. P. 13–22.
20. *Yang H., Wang H., Shivalila C. S. et al.* One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering // *Cell*. 2013. Vol. 154(6). P. 1370–1379.

Стаття: надійшла до редакції 04.04.17

доопрацьована 24.04.17

прийнята до друку 26.04.17

GENE INTEGRATION EFFICIENCY AND ZYGOTES SURVIVING IN MICE AT PRONUCLEAR MICROINJECTION

O. Shtapenko¹*, A. Madich², S. Fyodorova¹

¹*Institute of Animal Biology, NAAS of Ukraine
38, V. Stus St., Lviv 79034, Ukraine*

²*Cambridge University, CB10 ISA, UK
e-mail: shtapenko31@gmail.com*

By applying the microinjection into pronuclear of murine zygotes we demonstrated the successful integration of gene *LOC 78634* construction at a comparative level efficiency and transgenesis. The study showed the feasibility to increase the number of survived eggs and the capability to develop to blastocyst stage if gene concentration reduced to 2 pl/ml instead 4 pcl/ml, however both as gene and TE buffer microinjection are being led to less surviving in culture. The higher embryo implantation of the injected zygotes been noticed at lower gene concentration also ($p < 0.05$). We demonstrated that the percentage of implanted embryos at two different gene concentrations is elevated to compare to those that generated blastocysts in a Petri dish: 36.7 % and 30 % *in vivo* after embryo transfer versus 8.6 % and 5.7 % *in vitro* culture. Due to *in vitro* culture is leading to unstable transgene expression, the embryo transfer directly after gene microinjection is preferable. The method described here can provide a strong basis for transgenesis efficiency 6.7 % and 3.3 % for two different gene concentrations 2 and 4 pl/ml, accordingly. We also demonstrated that 3 transgenic offspring from 20 newborn pups been identified successfully with PCR amplification of tail tissue samples.

Keywords: microinjection, DNA integration, expression

ДОЦІЛЬНІСТЬ ВИКОРИСТАННЯ ВІТАМІННИХ ХІМІОПРЕВЕНТЕРІВ ДЛЯ КОРЕГУВАННЯ ІНДУКЦІЇ ХРОМОСОМНИХ АБЕРАЦІЙ СИНТЕТИЧНИМ ХАРЧОВИМ АРОМАТИЗАТОРОМ «КАРАМЕЛЬ»

І. Боднар, С. Горбулінська, Л. Боднар

Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: bodnarlidia@ukr.net

За дії ароматизатора «Карамель» виявлено в меристемних клітинах апікальної частини корінців *Allium cepa* індукування одинарних і парних фрагментів, а також дицентриків, які з'являються в результаті таких хромосомних аберацій як делеції та транслокації. У тесті на *Drosophila melanogaster* за різних концентрацій ароматизатора виявлено індукування пізніх домінантних летальних мутацій і підвищення появи незапліднених яєць, які можуть з'являтися внаслідок пошкодження сперматозоїдів або зниження статевої активності самців. Під час дослідження здатності розчинів ароматизатора індукувати хромосомні мутації в клітинах кісткового мозку *Mus musculus* виявлено широкий діапазон аномалій, який включав не лише мутації хромосом, але й геномні мутації. Це може свідчити про порушення функціонування веретена поділу та нерозходження хромосом у результаті впливу мутагенних агентів, серед яких можуть бути як самі складові ароматизаторів, так і їхні метаболіти, які з'являються у процесі біотрансформації в організмі ссавців. Результатами наших досліджень також показано, що за сумісного використання ароматизатора «Карамель» і вітамінів А або С як хіміопревентерів спостерігається зниження появи абераційних метафаз та індукування домінантних летальних мутацій.

Ключові слова: мутагенність, хромосомні аберації, хіміопревентери, харчові ароматизатори, домінантні летальні мутації

Сучасне харчування пов'язане з широким використанням харчових добавок, особливо групу серед яких становлять ароматизатори – речовини, які підсилюють смак і аромат готового продукту. Вони полікомпонентні, тобто складаються з певної кількості хімічних сполук, які далеко не завжди є безпечними для людини. Перелік інгредієнтів ароматизаторів включає речовини, які можуть мати як мутагенну, так і канцерогенну дію [1, 3, 9]. Окрім того, мутагенні й токсичні властивості компонентів ароматизаторів не завжди характеризуються простою сумою мутагенних властивостей кожного з них. Тому важливим підходом щодо розуміння мутагенного навантаження на геном людини, яке може нести той чи інший ароматизатор, є вивчення саме сумісної мутагенної активності його складових за різних концентрацій. Біотестування синтетичних складових продуктів харчування для визначення їхніх генотоксичних властивостей на різних тест-об'єктах набуває дедалі більшого значення, адже дає змогу з'ясувати мутагенну та/або цитотоксичну, та/або канцерогенну дію досліджуваних зразків, проте висновок про генотоксичну безпеку харчових добавок в Україні не є обов'язковим. Доказовим показником мутаційного процесу на клітинному рівні є виявлення хромосомних мутацій, підвищений рівень яких розглядається як хромосомна нестабільність, яка в подальшому може спричинити розвиток злоякісних новоутворень [2, 6].

Ароматизатор «Карамель» або цукровий колер виготовляють за участі солей амоніаку або солей амонію. Серед складових харчового ароматизатора «Карамель» є азотовмісні

гетероцикли, серед яких і 4-метилімідазол. Це гетероциклічна органічна сполука, що є похідним імідазолу, в якому атом водню в 4 положенні заміщений на метильну групу. Ця сполука може утворюватися під час карамелізації цукру, а також у інших смажених продуктах, у процесі ферментації. Інтерес до 4-метилімідазолу викликаний тим, що ця речовина була виявлена в карамельних барвниках, які зазвичай використовують під час приготування харчових продуктів і напоїв, а саме темне пиво, Coca-Cola, Pepsi – можуть містити більш ніж 100 мкг 4-метилімідазолу на порцію в 300 мл [12]. Дослідження National Toxicology Program показало, що високі дози 4-метилімідазолу є канцерогенними для мишей і щурів, тому його внесено до списку можливих канцерогенних речовин. Схожий ефект було отримано і для ізомеру 2-метилімідазол, який також виявлений у карамельних барвниках. Станом на сьогоднішній день спосіб виготовлення карамельних барвників, які застосовуються у Європі, є незмінним, вміст 4-метилімідазолу зберігається на попередньому рівні [12].

Виробництво функціональних продуктів харчування, які не лише забезпечують фізіологічні потреби організму в поживних речовинах і енергії, але й мають профілактичне або навіть лікувальне значення, є одним із перспективних напрямків харчової промисловості сьогодення. Серед речовин з антимутагенним ефектом є вітаміни, антиоксиданти (Е, А, аскорбінова кислота, бетакаротин), біологічні пігменти (гемоглобін, хлорофіли і цитохроми, лікопен), поліфеноли (флавоноїди, таніни, катехіни й інші циклічні сполуки), сполуки, що містять сірку, селен та ін. [4, 5]. Вітаміни, зокрема, А та С, є незамінними факторами живлення, які забезпечують нормальний розвиток організму, є необхідним захистом для тварин і людини та можуть бути використані для зняття або зменшення сумарних мутагенних фонів [10]. Цей підхід було нами використано для з'ясування можливих змін щодо мутагенної активності синтетичного харчового ароматизатора «Карамель» за одночасної дії ароматизатора та вітамінних хіміопревентерів.

Матеріали та методи

У роботі досліджували генотоксичну активність синтетичного харчового ароматизатора «Карамель» 700012 фірми ETOI. Добову дозу, рекомендовану виробником, яка розрахована на 1 кг готової продукції, приймали за 1 % (0,14 мг/л), збільшену в десять разів – за 10 % (1,4 мг/л). Компонентний склад ароматизатора «Карамель» включає: 4-метилімідазол, поліциклічні вуглеводи копильного диму, екстракт дуба, а також домішки – аміачний азот, діоксин сірки, фосфати, важкі метали, які з'являються внаслідок виробництва (виробник дає перелік хімічних складових без кількісного представлення в 1 г ароматизатора). Для зниження індукування мутагенної дії ароматизатора використовували відомі хіміопревентери з деяких вітамінів, а саме вітамін А (доза 0,1 мг/кг) та вітамін С (доза 100 мг/кг).

Дослідження проводили на трьох еукаріотичних тест-об'єктах: *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster* та насіння цибулі ріпчастої *Allium cepa*. Рослинні тест-системи в даний час отримують дедалі більшу розповсюдженість під час оцінки мутагенності, показано чітку кореляцію результатів цих систем із тваринними тест-системами. Для виявлення генотоксичного і цитотоксичного впливу розчинів ароматизатора «Карамель» на геном цибулі використовували метод ана-телофазного аналізу хромосомних аберацій у клітинах кореневої меристеми. У цьому тесті рееструються хромосомні мутації типу делецій і транслокацій, а також порушення веретена поділу за частотою відставання хромосом, багатопольності й асиметричних мітозів. Окрім того, одночасно можна фіксувати появу мікроядер, які утворюються з ацентричних фрагментів [7].

Дрозофіла є одним із найкраще вивчених модельних об'єктів генетики вищих еукаріот. Основні біохімічні процеси в клітинах дрозофіли та ссавців майже ідентичні, у про-

песі метаболізму у дрозоділі також відбувається мікросомальна активація речовин. Це дає змогу виявляти промутагени, які набувають генотоксичності у процесі метаболізму. У даній роботі дрозоділі використовували для виявлення індукування домінантних летальних мутацій (ДЛМ) у процесі сперматогенезу. Домінантні летальні мутації, які виявляються за дії хімічних сполук у сперматозоїдах, призводять до смерті зиготи, – це може відбуватися за рахунок дефіциту хромосомного матеріалу в геномі або за рахунок різноманітних пошкоджень, які приводять до блокування процесів редуплікації. Даним методом фіксують пізні ембріональні леталі (яйця коричневого, жовтого кольору) та ранні ембріональні леталі (яйця білого кольору, всередині у них видно білі непрозорі ущільнення ембріона). Також за дії на мух мутагенами підвищується імовірність незапліднених яєць унаслідок фізіологічного пошкодження сперматозоїдів або зниження статевої активності самців [8].

Індукування хромосомних аберацій у клітинах кісткового мозку *Mus musculus* проводили на молодих білих статевозрілих самцях масою 18–20 г. Досліджуваний зразок вводили перорально одноразово у вигляді водного розчину по 0,4 мл в дозах 1,4 та 0,14 мг/кг за допомогою металевго зонда. Препарати метафазних хромосом клітин кісткового мозку готували за методом Н.У. Evans [11]. Препарати забарвлювали розчином барвника Гімза. Аналізували по 500–700 метафаз на кожну з концентрацій. Статистичну обробку результатів проводили з використанням критерію Стьюдента *t*.

Результати і їхнє обговорення

Аналіз результатів ана-телофазного тесту на *Allium cepa* зразків ароматизатора «Карамель» показав різні типи порушень у правильному розходженні хромосом до полюсів веретена поділу (відставання хромосом, утворення одинарних фрагментів і дицентриків). Такі аномальні ана-телофази виявляються внаслідок делецій і транслокацій хромосом. Токсична дія не була зафіксована, відсоток пророслих насінин для всіх зразків перебував на високому рівні. Контролем була дистильована вода.

Як при 1 % концентрації, так і при 10 % рівень хромосомних аберацій за дії ароматизатора перевищував значення контролю (табл. 1). При 1 % концентрації показники індукування хромосомних мутацій становили $3,3 \pm 2,19$ (контроль $1,12 \pm 2,19$). Серед аномальї найчастіше траплялися хромосомні мости – парні дицентрики, які складаються з двох, переважно перехресних хроматид. Це результат транслокацій. Під час вивчення зразків 10 % концентрації показники хромосомних мутацій були ще вищими і становили $3,96 \pm 1,98$. Окрім дицентриків, нами виявлені ацентричні фрагменти хроматидного походження та парні фрагменти ізохроматидного або хромосомного походження. За дії цих зразків нами було зафіксовано чотири мікроядра, які переважно утворюються з ацентричних фрагментів. У всіх проведених дослідах цитотоксичної дії зразків ароматизатора «Карамель» нами не виявлено.

При комбінації ароматизатора «Карамель» з вітаміном С або вітаміном А у тесті на меристемних клітинах *Allium cepa* виявлено зниження індукування хромосомних мутацій. Проте зняти мутагенність до рівня контролю не вдалося, поєднання ароматизатора з вітаміном А знижувало частоту хромосомних аберацій приблизно на 30–50 %, а з вітаміном С – приблизно на 30–40 % (табл. 1).

Таким чином, результати досліджень показали чутливість ана-телофазного тесту на *A. cepa* для виявлення сумарної мутагенної активності ароматизаторів харчової промисловості як своєрідних хімічних композицій. Проте екстраполяція отриманих результатів щодо людини має базуватися не лише на результатах однієї тест-системи. Суттєвим доповненням до розуміння мутагенної дії сумішей хімічних речовин є

використання тестів на дрозоділі, шляхи метаболічних процесів якої є наближеними до відповідних у людини. Тому наступним етапом експерименту було проведення аналізу здатності розчинів харчового ароматизатора «Карамель» викликати появу домінантних летальних мутацій у *Drosophila melanogaster*.

Таблиця 1

Частота хромосомних аберацій, індукованих харчовим ароматизатором «Карамель» у меристемних клітинах корінців насінин *A. sepa*

Досліджуваний зразок	Всього ана-телофаз	Кількість аномальних ана-телофаз	Частота хромосомних аберацій, %	P
Карамель 1%	424	14	3,30±2,19	≤0,05
Карамель 10%	454	18	3,96±1,98	≤0,05
Карамель 1% +A	428	10	2,33±1,11	≥0,05
Карамель 10%+A	404	8	1,98±1,22	≥0,05
Карамель 1% +C	406	9	2,22±1,31	≥0,05
Карамель 10%+C	426	10	2,34±1,72	≥0,05
Контроль	534	6	1,12±2,19	

Частоту домінантних летальних мутацій вивчали на *D. melanogaster* за допомогою внесення зразків ароматизатора «Карамель» у поживне середовище та згодуючи личинок. Контролем служило стандартне поживне середовище без внесення зразків. Частоту домінантних летальних мутацій обчислювали з урахуванням появи незапліднених яєць, яєць із ранніми та пізніми мутаціями, які значно відрізнялися за кольором. Нами зафіксоване підвищення відсотків незапліднених яєць порівняно з контролем. Найвищий рівень таких аномалій виявлено при дослідженні зразка «Карамель» з концентрацією, в 10 разів вищою від добової – відсоток незапліднених яєць перевищував контрольні показники у 3 рази (табл. 2). Удвічі зафіксоване підвищення відсотків яєць із ранніми домінантними летальними мутаціями порівняно з контролем як під час вивчення добової дози, так і при збільшеній дозі в 10 разів. Проте найвищі показники смертності яєць виявлено з пізніми домінантними летальними мутаціями – порівняно з контролем індукування збільшене у 5–6 разів. За сумісної дії ароматизатора «Карамель» з вітаміном А спостерігалось часткове зниження відсотків індукування домінантних летальних мутацій, проте не до спонтанного рівня.

Таблиця 2

Індукція домінантних летальних мутацій у *D. melanogaster* за дії харчового ароматизатора «Карамель»

Досліджуваний зразок	Кількість відкладених яєць	Відсоток незапліднених яєць%	Відсоток яєць із раннім ДЛМ, %	Відсоток яєць із пізнім ДЛМ, %	Частота ДЛМ %	Коефіцієнт Стьюдента, t
Карамель 1%	1109	2,7	1,3	2,1	6,1±0,69	3,28
Карамель 10%	1076	3,9	1,4	2,4	7,7±1,64	2,96
Карамель 1% +A	1022	2,1	1,6	1,0	4,7±2,03	3,35
Карамель 10% +A	1187	1,5	1,1	1,3	3,9±0,72	3,1
Контроль	1253	1,3	0,6	0,4	2,3±0,8	–

Проведено аналіз здатності розчину харчового ароматизатора «Карамель» індукувати появу хромосомних мутацій у клітинах кісткового мозку *Mus musculus*. Середня частота метафаз із абераціями хромосом для максимально досліджуваної добової дози ароматизатора становив 1,47±0,49 %, що у 2,94 разу перевищує показники контролю (0,50±0,29 %). Серед аномалій було зафіксовано чотири метафазні пластинки з анеуплоїдією – 39 хромосом, три каріотиби – по 41 хромосомі, дві метафазні з 42 хромосомами та один поліплоїд

з анеуплоїдією – 78 хромосом (нормальний каріотип миші 2n=40). За дії концентрації, яка відповідає добовій дозі, частота хромосомних аберацій становила $1,15 \pm 0,19$, що майже утричі перевищує контроль (табл. 3). Серед аберацій за дії добової дози виявлено два анеуплоїди – по 38 хромосом із делеційними фрагментами, три анеуплоїди по 37 хромосом, а у двох випадках – каріотип становив 43 хромосоми. У контролі зафіксовано три випадки анеуплоїдів. Під час одночасного згодовування мишей досліджуваними зразками з вітамінними хіміопревертентами отримали позитивну динаміку. Так, під час згодовування мишей зразком 10 % концентрації ароматизатора з вітаміном С зафіксоване зменшення кількості аномальних метафаз у клітинах кісткового мозку приблизно удвічі. За одночасного згодовування 1 % зразком ароматизатора з вітаміном С кількість аномальних аберацій наблизилася до спонтанного рівня (табл. 3). Зменшення кількості аномальних метафаз виявлено і під час згодовування мишам зразків ароматизатора з вітаміном А, проте у разі поєднання вітаміну А з 1 % зразком «Карамелі» антимуагенної дії не виявлено. Таким чином, у нашому експерименті вдалося виявити широкий діапазон аномалій, оскільки за час аналізу фіксувалися не лише мутації окремих хромосом, але й геномні мутації (політа анеуплоїдії). Це може свідчити про порушення функціонування веретена поділу та нерозходження хромосом як результат впливу мутагенних агентів, серед яких можуть бути і самі складові ароматизаторів, і їхні метаболіти.

Таблиця 3

Рівні хромосомних аберацій у клітинах кісткового мозку *Mus musculus*,
індуковані харчовим ароматизатором «Карамель»

Досліджуваний зразок	Загальна кількість метафаз	Загальна кількість аномальних метафаз	Частота хромосомних аберацій, %	P
Карамель 1%	606	7	$1,15 \pm 0,19$	$\leq 0,05$
Карамель 10%	676	10	$1,47 \pm 0,49$	$\geq 0,05$
Карамель 1% +А	528	6	$1,13 \pm 1,11$	$\leq 0,05$
Карамель 10%+А	534	4	$0,74 \pm 0,22$	$\leq 0,05$
Карамель 1% +С	576	3	$0,52 \pm 0,31$	$\leq 0,05$
Карамель 10%+С	516	4	$0,78 \pm 0,72$	$\leq 0,05$
Контроль	758	3	$0,39 \pm 0,29$	

Проаналізовано сумісну мутагенну активність зразків ароматизатора «Карамель», який безпосередньо застосовується в кондитерському виробництві. Як при використанні рослинного тест-об'єкта *Allium cepa*, так і в експериментах на тваринному об'єкті *Mus musculus*, виявлено індукування хромосомних аберацій у проліферативних клітинах за дії даного ароматизатора для обох досліджуваних доз. У меристемних клітинах апікальної частини корінців *Allium cepa* виявлено утворення одинарних, парних фрагментів і дицентриків, які можуть виникати в результаті таких хромосомних аберацій як делеції та транслокації. У тесті на *Drosophila melanogaster* за різних концентрацій ароматизатора виявлено індукування домінуючих летальних мутацій, які виникають за дії хімічних сполук у сперматозоїдах, вони можуть приводити до дефіциту хромосомного матеріалу в геномі і, часто, до смерті зиготи. Вважати стимулюючою дією хромосомних і домінуючих летальних мутацій лише за рахунок 4-метилімідазолу не варто, оскільки зразки ароматизатора «Карамель» містять суміш хімічних речовин, серед яких є й інші азотовмісні поліциклічні вуглеводи та домішки.

Забезпечення цілісності та стабільності спадкових структур має багаторівневий, системний та ієрархічний характер, який умовно можна розділити на три рівні: 1) специфічна антимуагенна система клітин – комплекс ферментів з антиоксидантною активністю

(супероксиддисмутаза, каталаза); кон'югуючі ферменти (глутатіонтрансферазна система); ендogenous антиоксиданти (токофероли, вітамін К, вітаміни А і С, каротиноїди, поліаміни, пуринові рибозиди); 2) репаративні системи, об'єктом яких є премутаційні пошкодження ДНК; 3) захисно-відновні системи, які працюють на рівні організму (гормони, пігменти, плазма крові). Функціонування в організмі ферментних систем, які здійснюють метаболічну активацію багатьох ксенобіотиків, робить неоднозначний внесок у роботу антимутагенного апарату. Кінцевим результатом перетворення кожного конкретного мутагену може бути як його знешкодження, так і утворення нових, більш генотоксичних сполук. Фенотип антиоксидантної системи визначається активністю ферментів антиоксидантного захисту і стійкістю тканин до індукції перекисного окиснення ліпідів. Характерною особливістю антимутагенної системи організму є те, що кількість багатьох метаболізуючих ферментів підвищується відповідно до збільшення рівня чужорідних сполук, які надходять ззовні. Саме тому внесення в організм додаткової кількості речовин, зокрема, вітамінів, що є коферментами ензимів антиоксидантної й антимутагенної системи організму, дає змогу забезпечити додатковий захист від екзогенних генотоксикантів. У даному дослідженні отримано підтвердження такого припущення, оскільки одночасне додаткове згодовування мишам вітамінів А та С й ароматизатора «Карамель» дало змогу отримати суттєве зниження появи абераційних метафаз та індукування домінантних летальних мутацій.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Боднар І. В., Андрейко О. Ю., Боднар Л. С. Виявлення змін на генному рівні у *Salmonella typhimurium* за дії ароматизаторів продуктів харчування // Вісн. Харків. ун-ту. Сер. біол. 2015. Вип. 18. № 1079. С. 65–70.
2. Боднар І. В., Зубко О. С., Щербаківа О. В. та ін. Виявлення змін на хромосомному рівні в еукаріотичних організмів за дії синтетичних ароматизаторів продуктів харчування та корегування їх за допомогою вітамінних хіміопревентерів // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. праць. К., 2016. Т. 18. С. 67–71.
3. Булдаков А. С. Пищевые добавки: справочник. СПб., 1996. 240 с.
4. Гончаренко Т.П., Гончаренко О. Г. Харчові добавки як об'єкт моніторингових досліджень // Екологія довкілля та безпека життєдіяльності. 2008. № 4. С. 81–84.
5. Дурнев А. Д., Середенін С. Б. Мутагени (скрининг і фармакологічна профілактика впливів). М.: Медицина, 1998. 328 с.
6. Дурнев А. Д. Мутагени і антимутагени в продуктах харчування // Генетика. 1997. 33. С. 165–176.
7. Калаев В. Н., Карпова С. С. Цитогенетический мониторинг: методы оценки загрязнения окружающей среды и состояния генетического аппарата организма. Воронеж: ВГУ, 2004. 80 с.
8. Прохорова И. М., Фомичева П. Н., Ковалева М. И. Оценка митотоксического и мутагенного действия факторов окружающей среды: метод. указания. Ярославль: ЯрГУ, 2003. С. 23–26.
9. Смоляр В. І. Токсичні ефекти харчових добавок // Проблеми харчування. 2005. № 1. С. 5–15.
10. Стрижельчик Н. Г., Бариляк І. Р. Мутагенные и антимутагенные свойства пищевых добавок. Харьков: ХНУ им. Каразина, 2009. 152 с.
11. Evans H. J. Cytological methods for detecting chemical mutagens. In: Hollaender A. ed. Chemical mutagens: principles and methods for their detection // New York; London; Plenum Press. 1976. 4. P. 1–29.

12. *Jacobson M. F.* Petition to Bar the Use of Caramel Colorings Produced With Ammonia and Containing the Carcinogens 2-Methylimidazole and 4- Methylimidazole // Center for Science in the Public Interest, 2011. 37 p.

Стаття: надійшла до редакції 28.04.17

доопрацьована 28.09.17

прийнята до друку 06.10.17

**EXPEDIENCY OF USE VITAMIN CHEMIOPROTECTORS
FOR CORRECTION OF CHROMOSOME ABERRATION INDUCED
BY FOOD SYNTHETIC FLAVORS “CAMEL”**

I. Bodnar, S. Gorbulinska, L. Bodnar

*Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine*

e-mail: bodnarlidia@ukr.net

Flavors “Caramel” induced in root meristem cells of onion *Allium cepa* L. single and paired fragments of chromosome and dicentric chromosomes, which are the result of chromosomal aberrations such as deletions and translocations. It was found induction of dominant lethal mutations and unfertilized eggs by different concentration of flavors in *Drosophila melanogaster* test. As well as under flavors influence we have shown the induction of a wide range of chromosome aberrations in metaphase bone marrow cells of white mice *Mus musculus* L., which included not only chromosomes but also genomic mutations. This could be evidence of spindle apparatus disruption and chromosomes nondisjunction as an influence of mutagenic agents, which may include a flavoring component themselves as well as their metabolites appearing in the biotransformation in mammal’s organism. We observed a partial decrease of aberrant metaphases and dominant lethal mutations after vitamin A and C application.

Keywords: mutagenicity, chromosome aberrations, chemical preventers, flavors, dominant lethal mutations

**ВПЛИВ ВИПАЛЮВАННЯ НА ПОПУЛЯЦІЇ ДЕЯКИХ ЛУЧНИХ ВИДІВ
У ВИСОКОГІР'Ї УКРАЇНСЬКИХ КАРПАТ**

Ю. Кобів^{1,2}, В. Кобів²

¹Львівський національний університет імені Івана Франка

вул. Черемшину, 44, Львів 79026, Україна

²Інститут екології Карпат НАН України

вул. Козельницька, 4, Львів 79026, Україна

e-mail: ykobiv@gmail.com

Досліджено наслідки масштабної ненавмисної пожежі в субальпійській зоні на г. Говерла у Чорногорі в Українських Карпатах. Чагарнички (*Vaccinium* spp.), а особливо чагарники (*Juniperus communis* subsp. *alpina*) і підріст смереки (*Picea abies*), виявилися найвразливішими до випалювання. Домінантні представники злакових і ситникових (*Calamagrostis villosa*, *Luzula luzuloides*) були менш чутливими і швидше відновили рясність. Пожежа спричинила виникнення прогалін, що сприяло насінне-вому поновленню низки лучних видів різнотрав'я (зокрема, *Allium victorialis*, *Arnica montana*, *Gentiana acaulis*, *Hypochaeris uniflora*, *Pulsatilla alba*) та їхньому вегетативному розростанню. Спалах щільності генеративних пагонів більшості цих трав'яних видів спостерігали через рік, а максимальну кількість їхніх проростків – через два роки після випалювання, яке тимчасово призупинило насіннєве розмноження. Пожежа виявилася загалом сприятливою для цих видів. Вочевидь, випалювання чагарників, яке в минулому широко застосовували для підтримання полонин, істотно впливало на їхній видовий склад і сприяло поширенню багатьох видів на великих територіях вторинних лук у Карпатському регіоні.

Ключові слова: антропогенний вплив, випалювання, популяційні параметри, пірогенна сукцесія, Карпати

Антропогенний вплив відіграє величезну роль у формуванні рослинності, видового складу угруповань і структури популяцій їхніх компонентів. В Українських Карпатах досить докладно вивчено наслідки дії основних антропогенних чинників – вирубування, випасання і скошування [2, 6]. Однак, як впливає з досліджень українських [8] і закордонних авторів [15, 16], не менш дієвим фактором впливу на рослинний світ у Карпатському регіоні було випалювання чагарникової рослинності з метою розширення площ полонин, а також спалювання підстилки на луках задля збільшення їхньої кормової продуктивності. Подібні періодичні весняні заходи подекуди проводять і дотепер, незважаючи на ризик масштабної пожежі. Однак вони відбуваються дедалі рідше через занепад тваринництва, що спостерігається не лише в Карпатах, але й у всіх гірських системах Європи [13]. Тим більше, відійшло у минуле масштабне випалювання чагарникової чи чагарникової рослинності, що призводить до істотних трансформацій нелісових угруповань, хоча раніше такі заходи дуже широко застосовувалися і значною мірою спричинилися до формування сучасного рослинного покриву, зокрема, у високогір'ї Українських Карпат [15]. На жаль, механізм і швидкість змін рослинного покриву, зумовлених цим антропогенним фактором, залишалися докладно не з'ясованими.

Ми мали нагоду певною мірою заповнити цю прогалину завдяки спостереженню за наслідками інтенсивної ненавмисної пожежі, яка нещодавно виникла в субальпійському поясі у Чорногорі. Наші дослідження мали на меті виявити зміни в популяціях деяких лучних видів у ході початкового етапу пірогенної сукцесії рослинності.

Матеріали та методи

Нижченаведені результати отримано під час досліджень, що проводилися у 2014–2016 роках на ділянці, розташованій на висоті 1600–1650 м н.р.м. на східному схилі г. Говерла у Чорногорі. Ця територія є частиною Говерлянської полонини, яка упродовж століть зазнавала інтенсивного випасу до запровадження заповідного режиму наприкінці 1960-х років. На той час тут сформувалися вторинні луки з переважанням злаків. Тепер ця полонина входить до складу заповідної зони Карпатського національного природного парку, а після припинення випасання тут поступово відновлювався природний рослинний покрив унаслідок демутаційних процесів. Це зумовило заростання полонини підрослом дерев (*Picea abies* (L.) H. Karst.), чагарниками (*Juniperus communis* L. subsp. *alpina* (Suter) Čelak.), чагарничками (*Vaccinium myrtillus* L., *V. vitis-idaea* L., *V. gaultherioides* Bigelow) і формування угруповань *Juniperetum nanae* і *Vaccinietum myrtilli* (союз *Loiseleurio-Vaccinietum*). Значна частка території припадає на високозлакове угруповання *Hyperico grisebachii-Calamagrostietum villosae* (союз *Calamagrostion villosae*).

У квітні 2014 р. на згаданій ділянці відбулася масштабна пожежа, спричинена необережністю туристів. Цьому сприяли потужний вітер і займистість підстилки, що попередньо зазнала висихання через тривалу відсутність опадів. Наслідком стала поява згарища площею 6–7 га, спочатку майже цілковито позбавленого рослинності (рис. 1).

Улітку того ж року розпочато дослідження на вказаній ділянці, зокрема, закладено лінійну трансекту площею 15×1 м² для стеження за динамікою індивідуальних і групових параметрів трав'яних багаторічників – *Arnica montana* L. і *Hypochoeris uniflora* Vill. [12], що є фоновими компонентами багатьох лучних карпатських угруповань. Вони належать до різних біоморф. Зокрема, *Arnica montana* є кореневищним клональним видом [4], натомість *Hypochoeris uniflora* – стрижнекореневий аклональний багаторічник [3]. Водночас закладено п'ять дослідних квадратів 0,5×0,5 м² у місцях трапляння більш рідкісних трав'яних видів – *Allium victorialis* L., *Gentiana acaulis* L. і *Pulsatilla alba* Rehb. Спостереження, що тривали у подальші роки, мали на меті оцінити інтенсивність і характер впливу випалювання, а також з'ясувати механізм і швидкість змін у популяціях під час подальшого відновлення рослинності на згарищі.

Крім того, щорічно на початку липня було оцінено загальне проективне покриття і рясність видів [9].

На невипаленій ділянці, розташованій неподалік, також було визначено досліджувані показники, що слугували за контроль.

Реальну і потенційну насінневу продуктивність, а також урожай насіння встановлено за загальноживаною методикою [1]. Отримані дані опрацьовано статистично.

Назви видів рослин наведено за “Flora Europaea” [11], номенклатуру синтаксонів – згідно з К.А. Малиновським і В.В. Крічфалушієм [7].

Результати і їхнє обговорення

Серед видів, які мали найбільшу рясність на обстеженій ділянці (табл. 1), найвразливішими до дії випалювання виявилися *Juniperus communis* subsp. *alpina* і *Picea abies*, уся надземна фітомаса яких була відмерлою протягом сезону вегетації, що настав після весняної пожежі. Істотно постраждали також усі хамефітні види роду *Vaccinium*, натомість



Рис. 1. Згарище на східному схилі г. Говерла у червні 2014 р. через 2,5 місяця після пожежі трав'яні види (злакові, ситникові) – *Calamagrostis villosa* (Chaix) J.F. Gmel., *Luzula luzuloides* (Lam.) Dandy et Wilmott зазнали меншого впливу. Очевидно, це пояснюється зростанням вразливості до температурних впливів у ряду гемікриптофіти→хамефіти→фанерофіти, зокрема, через вигорання здерев'янілих багаторічних надземних пагонів у представників двох останніх життєвих форм. Відповідно, швидкість відновлення рясності домінантних видів за трирічний період продемонструвала протилежну тенденцію. Якщо *Calamagrostis villosa* наприкінці цього періоду назагал відновив свою рясність, то у *Picea abies* і *Juniperus communis* subsp. *alpina* лише окремі особини почали виявляти ознаки життєдіяльності. Чагарничкові види – *Vaccinium myrtillus*, *V. vitis-idaea*, *V. gaultherioides* – відновилися на 20–40 % площі, займаної ними на час пожежі. Прикметно, що найменш вразливим до випалювання виявився останній із них, для якого відзначено також відносну стійкість до ушкодження морозом [14].

Практично не постраждали поодинокі особини *Pinus mugo* Turra, які трапляються на згарищі, а також приурочені до вологих ділянок зарості високотрав'я.

Короткотерміновим наслідком впливу випалювання на досліджені лучні види (*Allium victorialis*, *Arnica montana*, *Gentiana acaulis*, *Hypochoeris uniflora*, *Pulsatilla alba*) стало тимчасове пригнічення їхніх особин, зокрема, відсутність генерування під час вегетаційного періоду 2014 р., що настав відразу ж після пожежі. Причиною стало пошкодження генеративних бруньок. Вигорання призвело також до відсутності проростків вказаних видів того ж року, що спричинене як їхнім безпосереднім знищенням, так і втратою запасу насіння у підстильці. Через згадане пригнічення генерування у 2014 р. не відбулося обсіменіння, що унеможливило появу проростків і в наступному, 2015 р. Таким чином, протягом двох вегетаційних сезонів після пожежі цілковито нівелювалася роль насінневого поновлення у самопідтриманні популяцій досліджених видів.

Натомість, випалювання значно стимулювало галушення кореневищ *Arnica montana* (табл. 2) і *Hypochoeris uniflora* у 2015 р., про що свідчить більша кількість рамет і пагонів, які входять до складу особини. Генеративні особини *H. uniflora* містили до 7-ми пагонів, що є високими показниками для цього виду [3]. У перший після пожежі вегетаційний сезон

діаметр приростів кореневищ *A. montana* значно зменшився, однак уже наступного року він майже повернувся до контрольних показників.

Таблиця 1

Фітоценотична характеристика ділянки на г. Говерла після випалювання

Тип ділянки	Випалена ділянка			Невипалена ділянка (контроль)
	Рік	2014	2015	2016
Дата	6.VII	2.VII	1.VII	6.VII
Площа опису, м ²	100	100	100	100
Загальне проєктивне покриття, %	25	50	80	95
Покриття трав'яного ярусу, %	25	50	80	70
Покриття чагарникового ярусу, %	0	0	2	30
DAss. <i>Hyperico grisebachii</i> - <i>Calamagrostietum villosae</i>				
<i>Calamagrostis villosa</i>	2	3	4	4
<i>Hypericum richeri</i> subsp. <i>grisebachii</i>	+	+	+	+
<i>Solidago virgaurea</i> subsp. <i>minuta</i>	+	+	+	+
<i>Hieracium alpinum</i>	+	+	+	+
DAll. <i>Calamagrostion</i>				
<i>Luzula luzuloides</i>	1	2	2	2
<i>Campanula patula</i> subsp. <i>abietina</i>	+	+	+	+
DAll. <i>Juniperion nanae</i>				
<i>Juniperus communis</i> subsp. <i>alpina</i>	.	+	1	3
DAll. <i>Rhododendro-Vaccinion</i>				
<i>Vaccinium myrtillus</i>	+	+	1	3
DAll. <i>Potentillo-Nardion</i>				
<i>Arnica montana</i>	+	1	+	+
<i>Homogyne alpina</i>	+	+	+	+
<i>Hypochoeris uniflora</i>	+	1	+	1
<i>Ligusticum mutellina</i>	+	+	+	+
DCI. <i>Loiseleurio-Vaccinietea</i>				
<i>Vaccinium gaultherioides</i>	+	+	1	2
<i>Vaccinium vitis-idaea</i>	+	+	1	2
Інші види				
<i>Allium victorialis</i>	+	+	+	+
<i>Gentiana acaulis</i>	+	+	+	+
<i>Juncus trifidus</i>	+	+	1	1
<i>Laserpitium krapfii</i>	+	+	+	+
<i>Picea abies</i>	.	.	+	1
<i>Potentilla aurea</i>	+	+	+	+
<i>Pulsatilla alba</i>	+	+	+	+
<i>Trollius altissimus</i>	+	+	+	+

Таблиця 2

Індивідуальні й популяційні параметри *Arnica montana* L. на випаленій ділянці на східному схилі г. Говерла

Ділянка	Випалена ділянка			Невипалена ділянка (контроль)
	Рік	2014	2015	2015
Кількість кошиків на генеративному пагоні, шт.	–	2,3±0,2	1,8±0,1	1,7±0,1
Висота генеративних пагонів, см	–	31,8±1,2	34,3±1,3	35,3±1,3
Діаметр приростів кореневищ, мм	3,1±0,3	4,5±0,3	4,8±0,3	5,1±0,4
Довжина приростів кореневищ, см	1,9±0,1	2,4±0,1	2,7±0,1	2,7±0,1
Кількість рамет/особину	5,6±0,4	4,7±0,3	2,8±0,2	2,2±0,1
Щільність генеративних пагонів/м ²	–	5,4±0,3	1,7±0,1	1,3±0,1
Щільність вегетативних пагонів/м ²	5,9±0,3	12,4±0,9	11,8±0,8	6,8±0,4
Щільність проростків/м ²	–	–	11,3±1,1	0,2±0,02

У видів, здатних до вегетативного розростання (*Allium victorialis*, *Arnica montana*, *Gentiana acaulis*, *Pulsatilla alba*), через 1–2 роки після випалювання помітно розширилися розміри клонів. Це спричинене як збільшенням відгалужень кореневищ, так і появою придатного для розростання простору, що виник унаслідок знищення або пригнічення обпалених сусідніх особин висококонкурентних домінуючих видів чагарничків і злаків.

У 2015 р., тобто наступного після пожежі вегетаційного сезону, відбувся різкий спалах генерування більшості досліджених видів, що виявилось у надзвичайно високій щільності їхніх генеративних пагонів (рис. 2), навіть порівняно з контрольною невідпаленою ділянкою (табл. 2–4). Крім того, в *Arnica montana* відзначено збільшення кількості кошиків на квітконосному пагоні. Таким чином, урожай насіння *Arnica montana* і *Hypochoeris uniflora* істотно зріс. Натомість, висота їхніх генеративних пагонів виявилася трохи меншою порівняно з контролем, що є наслідком кращого освітлення, завдяки значному зменшенню проективного покриття конкурентних видів унаслідок випалювання. У *Hypochoeris uniflora* у 2015 р. виявлено також максимальну кількість листків на генеративному пагоні (табл. 3).



Рис. 2. Спалах генерування *Arnica montana* L. і *Hypochoeris uniflora* Vill. у 2015 р. через два роки після пожежі

Важливим наслідком пожежі стала масова поява проростків більшості досліджуваних видів у 2016 р., тобто через два роки після випалювання (табл. 2, 3). Це зумовлено як інтенсивним минулорічним генеруванням, так і тим, що на значній частці площі згарища (20–25 %) ще не встигла відновитися рослинність. Такі вільні прогалини слугують мікроселищами, придатними для проростання насіння і проходження ранніх етапів онтогенезу багатьох видів, чому сприяв брак конкуренції у приземному ярусі [5, 10]. Переважна більшість проростків *Arnica montana* і *Hypochoeris uniflora* з'явилася неподалік (здебільшого у радіусі 0,5 м) від материнських особин, де на невеликих ділянках площею 25×25 см² їхня чисельність могла досягати 10 шт. (рис. 3). Однак окремі проростки було виявлено на достатньо віддалених прогалинах, придатних для заселення. Отже, випалювання сприяє розселенню згаданих видів.

Таблиця 3

Індивідуальні й популяційні параметри *Hypochoeris uniflora* Vill.
на випаленій ділянці на східному схилі г. Говерла

Ділянка	Випалена ділянка			Невипалена ділянка (контроль)	
	Рік	2014	2015	2016	2015
Висота генеративних пагонів, см	–	21,1±1,4	23,5±1,5	24,6±1,6	24,6±1,6
Кількість листків на генеративному пагоні, шт.	–	11,6±0,9	7,6±0,6	8,5±0,7	8,5±0,7
Потенційна насіннева продуктивність, насінних зачатків/пагін	–	221±18,2	174±16,3	185±15,5	185±15,5
Реальна насіннева продуктивність, насінин/пагін	–	191±16,3	146±12,5	156±14,1	156±14,1
Урожай насіння, шт./м ²	–	5549±380	905±71	1825±150	1825±150
Щільність пагонів/м ²	15,0±1,2	27,2±2,0	31,0±2,4	32,5±2,5	32,5±2,5
Частка вегетативних пагонів, %	100	39	80	76	76
Частка генеративних пагонів, %	–	61	20	24	24
Щільність проростків/м ²	–	–	15,0±1,3	0,4±0,03	0,4±0,03

Таблиця 4

Чисельність генеративних пагонів у клонах досліджених рідкісних видів
на пробних квадратах 0,5×0,5 м², шт.

Ділянка	Випалена ділянка			Невипалена ділянка (контроль)	
	Рік	2014	2015	2016	2015
<i>Allium victorialis</i>	–	4,3±0,3	2,7±0,2	3,2±0,2	3,2±0,2
<i>Gentiana acaulis</i>	–	0,8±0,1	3,3±0,2	2,8±0,2	2,8±0,2
<i>Pulsatilla alba</i>	–	12,3±0,9	4,8±0,3	6,4±0,4	6,4±0,4



Рис. 3. Скупчення проростків *Hypochoeris uniflora* Vill. через 2 роки після пожежі

Прикметно, що у 2016 р. на фоні відновлення покриву домінантних видів зменшилася щільність генеративних пагонів модельних видів – *Arnica montana* і *Hypochoeris uniflora*. Таким чином, стрибкоподібне зростання ролі генеративного поновлення їхніх популяцій виявилось нетривалим і надалі спадатиме у міру відновлення зімкненої рослинності.

Водночас у 2016 р. збільшилася вегетативна рухливість *Arnica montana* (табл. 2), що свідчить про відновлення ролі вегетативного розмноження, яке у цього виду назагал переважає [4].

Проведені упродовж 2014–2016 років дослідження випаленої ділянки Говерлянської полонини засвідчили поступове повернення морфометричних і групових параметрів досліджуваних видів, а також рясності компонентів угруповання (табл. 1–4) до показників, що передували пожежі (контроль).

На відміну від випасання чи скошування, що повторюються періодично, дія випалювання є короткотривалою і спричиняє помітні наслідки, серед яких – раптова трансформація рослинності й різка зміна рясності компонентів угруповань.

Найвразливішими щодо впливу цього антропогенного чинника є деревні, чагарникові та чагарничкові види, тому наслідком випалювання на луках є перерозподіл рясності їхніх компонентів на користь трав'яних рослин.

Випалювання традиційно застосовували не тільки для швидкого знищення чагарничків і чагарників на луках, але й задля зміни складу домінантних трав. Прикладом цього є весняне випалювання сухої мортмаси в біловусниках, яке призводить до відмирання особин низькопродуктивного щільнодернинного злаку *Nardus stricta* L., що ми спостерігали у Сколівських Бескидах.

Очевидно, випалювання, яке упродовж століть широко застосовували у Карпатах, не лише призвело до розширення площ полонин і збереження їхніх меж у минулому, але й істотно спричинилося до поширення низки трав'яних видів, зокрема, рідкісних (*Gentiana acaulis*, *Pulsatilla alba*), лікарських (*Allium victorialis*, *Arnica montana*) та кормових (*Hypochoeris uniflora*), на значних площах вторинних лук. Ймовірно, воно також сприяло низхідному розселенню багатьох видів із їхніх корінних альпійських наскельних чи лучних ценозів на розташовані нижче похідні луки, що утворилися внаслідок багатоговікової діяльності людини.

Одним із механізмів дії випалювання є поява значної кількості позбавлених рослинності прогалин, що сприяє насінневою розмноженню низькоконкурентних видів, а також вегетативному розростанню їхніх клонів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Вайнагий І. В. О методике изучения семенной продуктивности растений // Ботан. журнал. 1974. Т. 59. № 6. С. 826–831.
2. Дигрессия биогеоценологического покрова на контакте лесного и субальпийского поясов в Черногоре / под ред. К.А. Малиновского. К.: Наук. думка, 1984. 208 с.
3. Кобів В. М. Онтогенез *Hypochoeris uniflora* Vill. (Asteraceae) в Українських Карпатах // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2013. Вип. 63. С. 141–147.
4. Кобів Ю. Й. Екологія та популяційно-онтогенетичні особливості *Arnica montana* L. (Asteraceae) в Українських Карпатах // Укр. ботан. журнал. 1992. Т. 49. № 3. С. 46–51.
5. Кобів Ю. Й. Роль придатних мікрооселищ у самовідновленні популяцій рідкісних видів рослин Українських Карпат // Укр. ботан. журнал. 2012. Т. 69. № 2. С. 178–189.
6. Малиновський К. А. Рослинність високогір'я Українських Карпат. К.: Наук. думка, 1980. 278 с.
7. Малиновський К. А., Крічфалушій В. В. Рослинні угруповання високогір'я Українських Карпат. Ужгород, 2002. 244 с.
8. Стойко С. М. Типи верхньої межі лісу в Українських Карпатах, її охорона та заходи ренатуралізації // Наук. праці Лісівничої академії наук України. 2004. Вип. 3. С. 95–101.

9. Braun-Blanquet J. Pflanzensoziologie. Wien: Springer Verlag, 1964. 865 S.
10. Eriksson O., Ehrlén J. Seed and microsite limitation of recruitment in plant populations // Oecologia. 1992. Vol. 91. N 3. P. 360–364.
11. Flora Europaea. Vols 1–5. Cambridge; New York; Melbourne: Cambridge Univer. Press, 1964–1980.
12. Harper J. L. Population biology of plants. New York; London; San Francisco: Academic Press, 1977. 892 p.
13. MacDonald D., Crabtree J., Wiesinger G. et al. Agricultural abandonment in mountain areas of Europe: environmental consequences and policy response // J. Environ. Management. 2000. Vol. 59. P. 47–69.
14. Martin M., Gavazov K., Körner C. et al. Reduced early growing season freezing resistance in alpine treeline plants under elevated atmospheric CO₂ // Global Change Biology. 2010. Vol. 16. P. 1057–1070.
15. Sitko I., Troll M. Timberline changes in relation to summer farming in the Western Chornohora (Ukrainian Carpathians) // Mt. Res. Dev. 2008. Vol. 28. 3/4. P. 263–271.
16. Trąba C. Zróżnicowanie zbiorowisk trawiastych w Polsce // Łąkarstwo w Polsce. 2014. T. 17. S. 127–143.

Стаття: надійшла до редакції 23.03.17

доопрацьована 11.05.17

прийнята до друку 06.07.17

IMPACT OF BURNING ON POPULATIONS OF SOME GRASSLAND SPECIES IN THE HIGH-MOUNTAIN ZONE OF THE UKRAINIAN CARPATHIANS

Y. Kobiv^{1,2}, V. Kobiv²

¹Ivan Franko National University of Lviv
44, Cheremshyna St., Lviv 79014, Ukraine

²Institute of Ecology of the Carpathians, NAS of Ukraine
4, Kozelnytska St., Lviv 79026, Ukraine
e-mail: ykobiv@gmail.com

The study is focused on the consequences of massive unintentional fire in the sub-alpine zone on Mt. Hoverla in the Chornohora Mts, Ukrainian Carpathians. Dwarf shrubs (*Vaccinium* spp.) and especially shrubs (*Juniperus communis* subsp. *alpina*) and saplings of Norway spruce (*Picea abies*) proved to be most vulnerable to fire. Dominant graminoids (*Calamagrostis villosa*, *Luzula luzuloides*) were less sensitive to burning and faster restored their abundance. The fire caused gaps suitable for seed recruitment of many low-competitive forb species (for instance, *Allium victorialis*, *Arnica montana*, *Gentiana acaulis*, *Hypochaeris uniflora*, *Pulsatilla alba*) and their clonal growth. Most of these herbaceous species showed maximum numbers of their flowering shoots next year and a peak of seedlings two years after burning, which caused a temporary suspension of seed reproduction. In general, these species favored from the consequences of fire. Apparently, burning of shrubs, which has been widely used for maintenance of grasslands in the past, significantly influenced their floristic composition and facilitated dispersal of many species on the vast areas of secondary grasslands within the Carpathian region.

Keywords: anthropogenic impact, burning, population parameters, pyrogenic succession, Carpathians

ВПЛИВ ОДНОРАЗОВОГО ВНЕСЕННЯ КАЛІЙНИХ ДОБРИВ НА ІНТЕНСИВНІСТЬ МІГРАЦІЇ РАДІОЦЕЗІЮ У ЛІСОВИХ ЕКОСИСТЕМАХ

М. Вінічук

*Житомирський державний технологічний університет
вул. Чуднівська, 103, Житомир 10005, Україна
e-mail: mykhailo59@gmail.com*

У статті узагальнені результати багаторічних досліджень щодо ефективності одноразового внесення калійних добрив як контрзаходу, спрямованого на зниження інтенсивності міграції радіоактивного цезію із ґрунту в рослини та гриби у бореальних лісових екосистемах центральної Швеції, що зазнали радіонуклідного забруднення після аварії на ЧАЕС у 1986 р. Показано, що в результаті здійснення цього заходу питома активність радіонукліду в чагарникових рослинах (верес, брусниця та чорниця), у плодкових тілах низки видів найбільш поширених дикоростучих грибів (*Cortinarius*, *Lactarius*, *Rozites*, *Suillus*), а також у молодих пагонах сосни та ялини (хвоя та пагони одно-, дворічного і старшого віку) знижується більш ніж на 40 %. Встановлено, що залежно від видів рослин і грибів тривалість ефекту удобрення може коливатися від 8–9 до 18–20 років. Для чагарникових рослин і плодкових тіл *Suillus variegatus*, що зростали на удобрюваній (K⁺) та контрольній (без удобрення) ділянках (K⁻) різниця величин питомої активності радіонукліду у більшості випадків є статистично достовірною (p<0,005).

Ключові слова: брусниця, верес, лісові екосистеми, плодкові тіла грибів, радіоцезій, сосна, чорниця, ялина

За час, що минув після аварії на Чорнобильській АЕС у 1986 р., було запропоновано низку контрзаходів, спрямованих на зниження міграції радіонуклідів із ґрунту в рослини та тварини. Більшість із них стосувалися сільськогосподарських угідь і були спрямовані на виробництво радіаційно-безпечної сільськогосподарської продукції [2, 6]. Рівні забруднення лісових екосистем, порівняно з територіями, що не вкриті лісами, виявилися значно вищими. У результаті майже на 50 % території лісів України забруднення радіоцезієм (¹³⁷Cs) перевищувало 10 кБк/км² [1]. Оскільки даний радіонуклід переважно зосереджений у верхніх, багатих на органічну речовину шарах ґрунту й активно надходить через кореневу систему в лісову рослинність і плодіві тіла грибів, концентрація його у продуктах лісу все ще залишається високою. Вживання лісових харчових продуктів, таких як гриби та ягоди, спричиняє додаткові дози внутрішнього опромінення населення. Крім людини, гриби та інші продукти лісу споживають також дикі тварини, зокрема, козулі та дикі кабани. У результаті високі рівні забруднення спостерігаються у особин, виявлених навіть у віддалених від Чорнобиля районах, а саме у Фінляндії, Швеції, Норвегії, Австрії та Італії [9]. Нині доза внутрішнього опромінення, яку отримує сільське населення Українського Полісся від харчових продуктів лісу, становить 35–50 % дози, отриманої від усіх продуктів харчування [3]. Тому проведення контрзаходів в умовах природних екосистем, забруднених радіонуклідами, залишається хоча і складним, проте актуальним завданням. Аналіз літературних джерел показує, що використання деревної золи, отриманої після спалювання кори дерев (сосна та ялина), яка залишається після розпилювання деревини, сприяло, з одного боку, помітному зростанню концентрації калію

в лісових рослинах, а з іншого – зменшенню у них вмісту ^{137}Cs , зокрема, у ягодах брусниці [7]. Дво-п'ятикратне зниження інтенсивності переходу ^{137}Cs із лісового ґрунту в рослини папороті й ожини спостерігали на 11-й рік після внесення 2,5 т вапна (містить $\approx 5\%$ калію) у ялиновому лісі на півдні Німеччини [12]. Як короткострокові (5 років), так і довгострокові (20 років) ефекти зниження переходу радіоцезію із ґрунту у хвою сосни звичайної за умов використання калійних добрив спостерігали в лісових екосистемах у західній частині Фінляндії [5]. Ефект калійного удобрення на зменшення переходу радіоцезію із ґрунту в рослини та гриби бореальних лісових екосистем шляхом одноразового внесення калійних добрив показано в одній із наших попередніх робіт [10]. Мета цієї статті – доповнити наявні дані та проаналізувати, наскільки тривалим може бути подібний ефект.

Матеріали та методи

Дослідження проводили у лісових екосистемах центральної Швеції, що зазнали радіонуклідного забруднення (щільність забруднення у 1986 р. становила ≈ 40 кБк/м²). У складі деревостанів переважали сосна звичайна (*Pinus sylvestris* L.) та ялина європейська (*Picea abies* L.) з наявністю берези пониклої (*Betula pendula* Roth.) та пухнастої (*Betula pubescens* Ehrh.). У надґрунтовому покриві переважали верес (*Calluna vulgaris* L. Hill.), брусниця (*Vaccinium vitis-idaea* L.) та чорниця (*Vaccinium myrtillus* L.). Калійні добрива (калійна сіль, KCl) вносили одноразово (червень 1992 р.) шляхом розкидання по поверхні ґрунту з використанням розкидача з розрахунку 100 кг/га діючої речовини калію. Після удобрення періодично, впродовж 20 років (1992–2013) відбирали зразки рослин, що зростали як на удобряваній (K⁺), так і на контрольній (без удобрення) ділянках (K⁻). Питому активність ^{137}Cs визначали у рослинах вересу, брусниці та чорниці. У деревних порід аналізували молоді пагони сосни і ялини. Також відбирали й аналізували плодові тіла таких найпоширеніших видів грибів як хрящ-молочник гірчак (*Lactarius rufus* (Scop.) Fr., моховик жовто-бурий (*Suillus variegatus* (Sw.) Kuntze, ковпак (*Rozites caperata* (Pers. ex Fr.) Karst. і павутинник напівкривавий (*Cortinarius semisanguineus* (Fr.) Gillet). Зразки чагарникових рослин і плодових тіл грибів аналізували протягом трьох періодів спостережень: перший період – з 1992-го по 2000 (1) – щорічно, другий період – з 2000 (1) по 2009 – з інтервалом у 4 роки, і третій період – у 2011 і 2013 році. Зразки пагонів сосни і ялини відбирали у 2011 та 2013 роках, хвою й пагони (однорічного, дворічного і старшого віку) аналізували окремо для верхньої, середньої та нижньої частин крони. Питому активність радіоцезію визначали на суху вагу (с.в.) зразків.

Результати і їхнє обговорення

Щільність забруднення ґрунту за радіоцезієм у районі проведення досліджень становила у 1986 р. 35–40 кБк/м², а у 1994 ≈ 33 кБк/м² [10]. У 2011 р. питома активність ґрунту до глибини 30–32 см варіювала в даному районі у межах від 120 до 1850 Бк/кг і в середньому становила ≈ 800 Бк/кг сухої ваги ґрунту.

У рослинах вересу концентрація радіонукліду виявилась у 4–5 разів вищою порівняно з питомою активністю його у рослинах чорниці та брусниці (рис. 1, а). Протягом перших 8-ми років (1992–2000) після одноразового внесення калійного добрива рослини вересу (наземна частина) контрольного (K⁻) варіанта містили у середньому майже утричі більше ($13,6 \pm 2,2$ кБк/кг) радіонукліду, ніж рослини з удобреної (K⁺) ділянки – $4,6 \pm 1,7$ кБк/кг. Даний ефект удобрення виявився найбільш помітним з-поміж інших досліджуваних видів і статистично значущим при рівні значущості 1 та 0,1 % [10]. У подальші роки (2001–2009) різниця між величинами активності радіоцезію в рослинах із ділянок K⁻ та K⁺ зменшилась – $5,7 \pm 0,34$ та $4,4 \pm 0,55$ кБк/кг відповідно. У 2011 р. рослини варіанта K⁻ все

ще мали трохи вищу активність радіонукліду ($4,1 \pm 0,09$ кБк/кг), ніж рослини варіанта K+ ($3,2 \pm 0,07$ кБк/кг). Отже, одноразове внесення калійних добрив дає змогу знизити рівень питомої активності ^{137}Cs у рослинах вересу в середньому на 50 % (від 17 до 76 %) упродовж 20 років (табл. 1). У рослин брусниці загалом ефект удобрення виявився трохи нижчим порівняно з рослинами вересу, та все ж досить помітним (рис. 1, б).

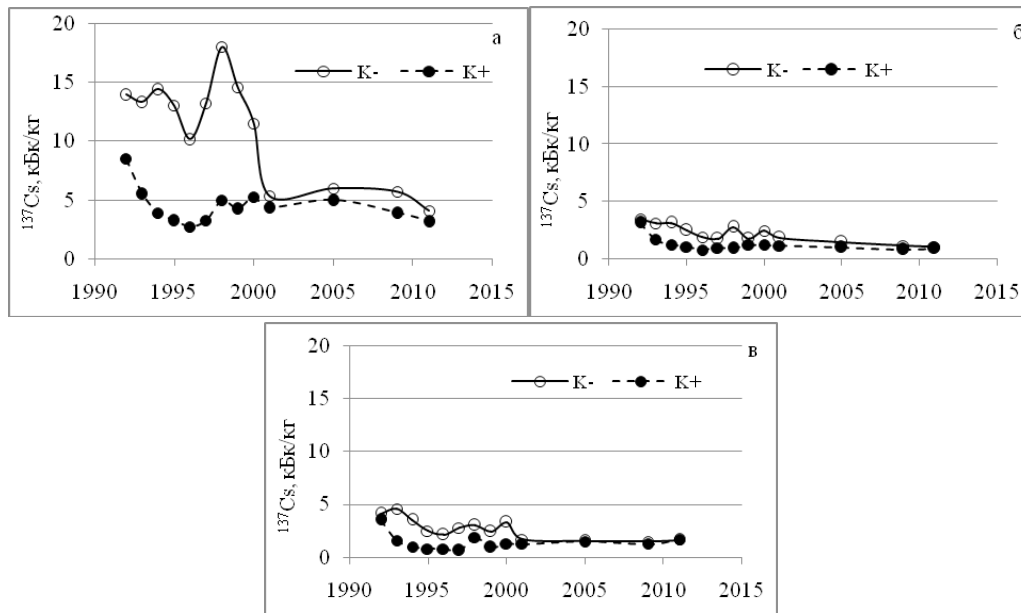


Рис. 1. Питома активність ^{137}Cs у рослинах: а – вересу звичайного (*Calluna vulgaris* L. Hill.); б – брусниці звичайної (*Vaccinium vitis-idaea* L.) та в – чорниці звичайної (*Vaccinium myrtillus* L.) у варіанті з одноразовим внесенням калійних добрив (K+) і на контролі (без удобрення, K–), кБк/кг с.в.

Так, найбільший ефект від удобрення ґрунту калійними добривами також спостерігали протягом перших 9-ти (1993–2001) років – питома активність радіоцезію становила відповідно $2,3 \pm 0,56$ та $1,1 \pm 0,29$ кБк/кг у рослин ділянки K– та K+. У період з 2005 по 2009 рр. концентрація радіонукліду у рослин контрольного та дослідного варіантів виявилася на рівні $1,28 \pm 0,24$ та $0,88 \pm 0,12$ кБк/кг, а у 2011 р. – на рівні $1,03 \pm 0,02$ та $0,89 \pm 0,05$ відповідно. У переважній більшості років спостережень різниця між питомою активністю радіонукліду в рослин з удобреної ділянки виявилася статистично значущою при рівнях значущості 5, 1 та 0,1 %. У середньому рослини брусниці дослідного варіанта містили \approx на 40 % (від 10 до 67 %) менше радіонукліду, ніж рослини на контролі (табл. 1).

Аналогічну закономірність спостерігали також у рослин чорниці. Протягом усіх років спостережень, за винятком останнього, рослини чорниці з удобреної ділянки мали помітно нижчий вміст радіонукліду, ніж рослини контрольного варіанта (рис. 1, в). Протягом перших 8-ми (1993–2000) років ефект від удобрення виявився найвищим – $3,0 \pm 0,77$ та $1,1 \pm 0,43$ кБк/кг відповідно у рослин на K– та K+ ділянках. У період з 2001-го по 2009-й роки ефект від удобрення помітно знизився – $1,6 \pm 0,09$ та $1,3 \pm 0,14$ кБк/кг, а у 2011 р. величина питомої активності рослин ділянки K– практично не відрізнялася від рослин ділянки K+ – $1,7 \pm 0,14$ та $1,6 \pm 0,16$ кБк/кг відповідно. У більшості випадків ефект від удобрення є статистично значущий при рівнях 5, 1 та 0,1 %. Результати показують, що в середньому у

рослинах чорниці за рахунок одноразового внесення калійних добрив можна забезпечити зниження рівня питомої активності ^{137}Cs на $\approx 40\%$ (табл. 1).

Вплив удобрення на рівень забруднення плодів грибів виявився неоднозначним, насамперед унаслідок значного варіювання значень їхньої питомої активності, навіть у межах одного й того ж виду. Інша складність полягала в тому, що не всі з досліджуваних видів грибів траплялися на обох ділянках, а це ускладнювало встановлення ефекту удобрення.

У плодівних тілах *Suillus variegatus* ефект удобрення спостерігали протягом 8-ми з 11-ти (1992–2009) років – $76,4 \pm 21,2$ та $34,1 \pm 18,8$ кБк/кг відповідно на варіантах К– та К+. У 3-х випадках (протягом 1992-го, 1998-го та 2000-го років), навпаки, у плодівних тілах на ділянці К– вміст радіоцезію виявився нижчим, ніж на ділянці К+. Протягом останніх років досліджень (2011 та 2013) цей вид траплявся лише у 2011 р. на ділянці К– (рис. 2, а). У період з 1992-го по 1997-й роки ефект удобрення для плодівних тіл *Suillus variegatus* виявився статистично значущий при рівнях 5 і 1 % протягом 4-х років, а протягом інших років досліджень – ні.

У плодівних тілах *Cortinarius semisanguineus* упродовж перших 6-ти років спостережень з 10-ти (1993–2009) вміст радіонукліду в середньому на варіанті без удобрення виявився удвічі вищим, ніж на удобряваній ділянці – $266,9 \pm 229,8$ та $143,4 \pm 195,9$ кБк/кг відповідно (рис. 2, б).

Протягом 2-х років досліджень результат виявився протилежним – плоді тіла грибів на ділянці К+ мали трохи вищу активність ^{137}Cs , ніж ті, що зростали на контролі (К–). У інші роки дослідження плоді тіла даного виду не траплялися, тому не аналізувалися. Ймовірно, саме тому ефект удобрення для цього виду не є статистично значущим.

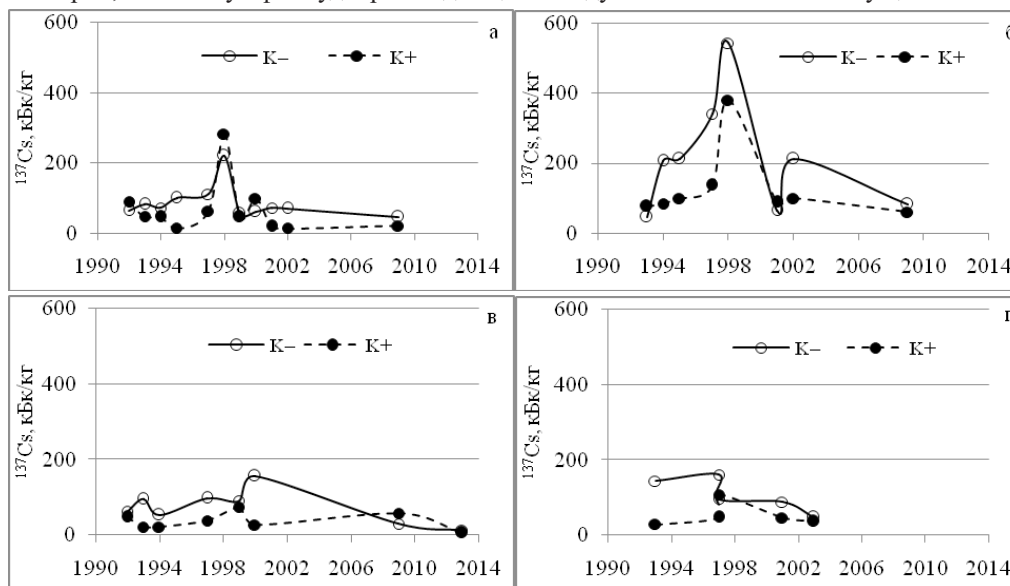


Рис. 2. Питома активність ^{137}Cs у плодівних тілах грибів: а – моховик жовто-бурий (*Suillus variegatus* (Sw.) Kuntze; б – павутинник напівкривавий (*Cortinarius semisanguineus* (Fr.) Gillet); в – гірчак (*Lactarius rufus* (Scop.) Fr., г – ковпак (*Rozites caperata* (Pers. ex Fr.) Karst. у варіанті з одноразовим внесенням калійних добрив (К+) та на контролі (без удобрення, К–), кБк/кг с.в.

У плодівних тілах *Lactarius rufus* помітний позитивний ефект удобрення також спостерігали протягом перших 6-ти років – $93,3 \pm 40,7$ та $31,2 \pm 11,4$ кБк/кг відповідно на ділянці

К– та К+ (рис. 2, е). У 2009 р., навпаки, плодові тіла контрольної ділянки мали майже удвічі нижчу питому активність ^{137}Cs порівняно з тими, що зростали на удобрений. У 2011 р. плодові тіла цього виду траплялися лише на ділянці К–, тоді як у 2013 р. знову спостерігали ефект удобрення для цього виду: питома активність радіонукліду у плодових тілах на контролі майже удвічі перевищувала питому активність ^{137}Cs плодових тіл дослідного варіанта – $12,3 \pm 1,2$ та $5,8 \pm 0,28$ кБк/кг відповідно. Статистично значущий ефект удобрення ($p < 0,05$) для даного виду спостерігали тільки у 1994 р.

У плодових тілах *Rozites caperata* (рис. 2, г) ефект удобрення спостерігали протягом 4-х років з 5-ти (1993–2003) років досліджень – $110,4 \pm 51,7$ та $39,9 \pm 8,8$ кБк/кг відповідно на ділянках К– та К+. У інші роки не спостерігали ефекту удобрення через відсутність плодових тіл цього гриба на досліджуваних ділянках. Окремі види грибів відбирали й аналізували тільки впродовж останніх (2011 та 2013) років досліджень. Серед них – хрящ-молочник неїстівний (*Lactarius helvius* (Fr.) Fr.), у плодових тілах якого питома активність радіоцезію на ділянці К– виявилась нижчою, ніж на ділянці К+ – $29,1 \pm 18,7$ та $36,6 \pm 6,3$ кБк/кг відповідно, що може свідчити про відсутність ефекту удобрення для цього виду гриба. Натомість, у плодових тіл іншого виду – сирійжка болотяна (*Russula paludosa* Britzelm), навпаки, вміст радіоцезію на ділянці К– виявився трохи вищим, ніж на ділянці К+ – $9,3 \pm 3,3$ та $7,2 \pm 3,4$ кБк/кг відповідно. Загалом ефект зниження питомої активності радіоцезію у плодових тілах грибів унаслідок калійного удобрення менш виражений, ніж у судинних рослинах.

Ефект калійного удобрення також спостерігали у молодих (одно-, дворічного і старшого віку) пагонах сосни та ялини (рис. 3).

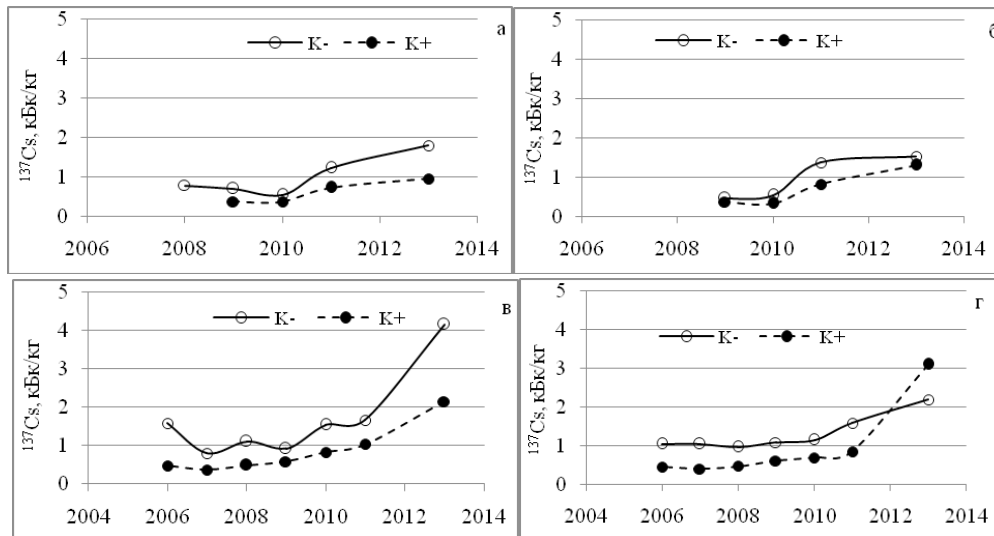


Рис. 3. Питома активність ^{137}Cs у гілках (а) та хвої (б) сосни звичайної (*Pinus sylvestris* L.) і у гілках (в) та хвої (г) ялини європейської (*Picea abies* L.) у варіанті з одноразовим внесенням калійних добрив (К+) і на контролі (без удобрення, К–), кБк/кг с.в.

Так, гілки та хвоя сосни 2013-го, 2012-го, 2011-го та старшого віку на ділянці К– у середньому містили майже у 1,5–2 рази більше радіонукліду, ніж гілки з ділянки К+ (рис. 3, а, б). Ефект одноразового внесення калійних добрив виявився довготривалим, оскільки забезпечував у середньому 30–40 % зниження питомої активності радіонукліду в гілках і хвої сосни різного віку через 20 років. Результативним встановлено удобрення також у ялини – в гілках і хвої на ділянці К– у середньому питома активність радіоцезію виявилася

на 40–50 % вищою, ніж на ділянці K+, за винятком останнього (2013) року спостереження (табл. 1).

Таблиця 1

Усереднені дані ефективності одноразового внесення калійних добрив за роки спостережень, %

Види	Роки спостережень	Різниця між K– та K+, %
Чагарникові рослини		
Брусниця	1992–2011	42,1
Верес	1992–2011	52,4
Чорниця	1992–2011	43,0
Гриби		
Ковпак	1993–2003	41,8
Моховик жовто-бурий	1992–2009	27,5
Павутинник напівкривавий	1993–2009	22,3
Хрящ-молочник гірчак	1992–2013	34,9
Дерева		
Сосна:		
пагони	2008–2013	41,2
хвоя	2008–2013	27,9
Ялина:		
пагони	2006–2013	50,0
хвоя	2006–2013	36,8

Отримані дані досить добре узгоджуються з результатами інших досліджень [5, 7, 9, 12]. Причини довготривалого результату одноразового внесення калійних добрив у лісових екосистемах не зовсім зрозумілі, але можна припустити, що у ґрунті можуть мати місце конкурентні відносини між іонами цезію та калію як хімічними аналогами. До тих пір, поки у ґрунті наявний у доступній для рослин формі калій, рослини, ймовірно, поглинатимуть його у більших кількостях, що, у свою чергу, призведе до зниження у них концентрації ^{137}Cs . Поступове зниження ефекту удобрення може бути пов'язане з тим, що з часом наявний у ґрунті калій дедалі більше залучається у біологічний колообіг і акумулюється у рослинах.

Очевидно, значний вплив калійного удобрення на зменшення переходу радіоцезію з ґрунту в рослини може бути пояснений також зазвичай низьким рівнем забезпеченості калієм ґрунтів бореальних лісових екосистем. Важливу роль у колообігу поживних речовин у цих лісах відіграють мікоризні гриби. Вважається, що в бореальних лісових екосистемах основні потоки поживних речовин проходять переважно саме через гриби (як сапротрофи, так і мікоризні), рослини та лісову підстилку, в той час як обмін мінеральними речовинами через ґрунтове середовище є менш важливим для живлення рослин [8].

Отже, одноразове внесення калійних добрив у бореальних лісових екосистемах може забезпечувати помітне (до 40 % і більше) зниження переходу радіонуклідів з ґрунту в чагарникові рослини, такі як верес, брусниця та чорниця, у плоді тіла низки видів дикоростучих грибів, таких як *Lactarius*, *Suillus*, *Rozites* та *Cortinarius*, а також у молоді пагони (хвоя та пагони одно-, дворічного і старшого віку) сосни та ялини. Тривалість такого ефекту може коливатися від 8–9 до 18–20 років. Для чагарникових рослин і плодівих тіл *Suillus variegatus* різниця між варіантами K– та K+ у більшості випадків є статистично достовірною ($p < 0,005$).

Робота виконана на кафедрі ґрунтів і навколишнього середовища Шведського університету сільськогосподарських наук. Автор висловлює подяку Шведському університетові сільськогосподарських наук та Житомирському державному технологічному університетові за фінансову підтримку цього проекту. Автор також вдячний професорові Karl J. Johanson, докторові Ivanka Nikolova за цінні поради та допомогу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Израэль Ю. А., Матвиенко И. И., Табачный Л. Я. и др. Загрязнение окружающей среды вследствие Чернобыльской аварии // Пятнадцать років Чернобыльської катастрофи. Досвід подолання. Київ, 2001. С. 80–95.
2. Пристер Б. С. Последствия аварии на Чернобыльской АЭС для сельского хозяйства Украины. К., 1999, 103 с.
3. Фурдичко О. І. Радіоекологічна безпека аграрних і лісових екосистем у віддалений період після аварії на ЧАЕС // Агроєкологічний журнал. 2016. № 1. С. 6–13.
4. Чоботько Г. М., Райчук Л. А., Пісковий Ю. М., Ясковець І. І. Формування дози внутрішнього опромінення населення Українського Полісся внаслідок споживання харчових продуктів лісового походження // Агроєкологічний журнал. 2011. № 1. С. 37–42.
5. Aro L., Rantavaara A. Long-term effect of fertilization on ¹³⁷Cs concentration in Scots pine needles // Radioprotection. 2011. Vol. 46. N 6. P. 479–482.
6. Deville-Cavelin G., Alexakhin R. M., Bogdevitch I. M. et al. Fifteen years after the Chernobyl accident. Lessons learned. Kyiv, 2001. P. 118–128.
7. Levula T., Saarsalmi A., Rantavaara A. Effects of ash fertilization and prescribed burning on macronutrient, heavy metal, sulphur and ¹³⁷Cs concentrations in lingonberries (*Vaccinium vitis-idaea*) // Forest Ecol. Managem. 2000. Vol. 126. P. 269–279.
8. Lindahl B. O., Taylor A. S. F., Finlay R. Defining nutritional constraints on carbon cycling in boreal forests – toward a less “phytcentric” perspective // Plant and Soil. 2002. Vol. 242. P. 123–135.
9. Møller A. P., Mousseau T. A. Assessing effects of radiation on abundance of mammals and predator–prey interactions in Chernobyl using tracks in the snow // Ecol. Indic. 2013. N 26. P. 112–116.
10. Rosén K., Vinichuk M., Nikolova I., Johanson K. Long-term effect of a single potassium fertilization on ¹³⁷Cs levels in plants and fungi in a boreal forest ecosystem // J. Environ. Radioact. 2011. Vol. 102. N 2. P. 178–184.
11. Strandberg M., Johansson M. ¹³⁴Cs in heather seed plants grown with and without mycorrhiza // J. Environ. Radioact. 1998. N 40. P. 175–184.
12. Zibold G., Klemm E., Konopleva I., Konoplev A. Influence of fertilizing on the ¹³⁷Cs soil–plant transfer in a spruce forest of Southern Germany // J. Environ. Radioact. 2009. Vol. 100. P. 489–496.

Стаття: надійшла до редакції 16.03.17

доопрацьована 28.04.17

прийнята до друку 16.05.17

EFFECT OF SINGLE POTASSIUM FERTILIZERS APPLICATION ON RADIOCAESIUM MIGRATION IN FOREST ECOSYSTEMS

M. Vinichuk

*Zhytomyr State Technological University
103, Chudnivska St., Zhytomyr 10005, Ukraine
e-mail: mykhailo59@gmail.com*

The results of long-term studies on the efficiency of a single application of potassium fertilizers as a countermeasure aimed at reducing the radiocesium uptake by forest plants and fungi in contaminated boreal forest ecosystems of central Sweden are presented and summarized. It is shown that the implementation of this countermeasure decreases radionuclide uptake by low-growing perennial shrubs (heather, lingonberry and blueberry), the fruit bodies of several commonly occurring species of wild fungi (*Cortinarius*, *Lactarius*, *Suillus* and *Rozites*), as well as young shoots of pine and spruce (needles and branches of one-, two-year and older) at least by 40 % or more. Fertilization effect depends on the types of plants and fungi and may be long lasting from 8–9 to 18–20 years. The difference in activity concentration of radiocesium in low-growing perennial shrubs and fruit bodies of *Suillus variegatus* grown on fertilized (K +) and unfertilized (control) areas (K-) in most cases is found to be statistically significant ($p < 0.005$).

Keywords: blueberry, heather, forest ecosystems, fruiting bodies of fungi, lingonberry, pine, radiocesium, spruce

ВПЛИВ ФУНКЦІОНУВАННЯ ЯВІРСЬКОЇ ГЕС НА УГРУПОВАННЯ БЕЗХРЕБЕТНИХ ГІДРОБІОНТІВ Р. СТРИЙ (УКРАЇНСЬКІ КАРПАТИ)

Т. Микітчак, В. Штупун

*Інститут екології Карпат НАН України
вул. Козельницька, 4, Львів 79026, Україна
e-mail: tarasmukitchak@yahoo.com*

Найбільш негативний вплив Явірської ГЕС на угруповання безхребетних гідробіонтів р. Стрий відзначено на чотирикілометровій ділянці нижче греблі. На цьому відтинку таксономічне різноманіття, чисельність і біомаса угруповань зменшуються у 2–3 рази порівняно з відтинком ріки вище Явірського водосховища. На відстані 6 км нижче греблі угруповання безхребетних відновлюються до природного стану (створи вище ГЕС). Чисельність особин дрефту після проходження водосховища та греблі в середньому зменшується у 10 разів. Вода досліджуваного відтинку ріки за сумарними показниками біоіндикаційних індексів Вудівісса, Пантле-Бука та Гуднайта-Вітлі є слабо забрудненою (створи, які перебувають поза межами прямого впливу функціонування ГЕС) і помірно забрудненою (водосховище і створи, розташовані у зоні впливу ГЕС). Отримані результати вказують, що основними негативними чинниками впливу на угруповання гідробіонтів р. Стрий є лімітні умови водосховища в континуумі річкової системи, накопичення мулу і глинистих наносів на його дні та берегах і знесення цих осадів на нижчі ділянки русла, руйнування субстрату дна у руслі нижче ГЕС під час швидкого спуску великих мас води, різке обміління русла Стрия нижче греблі після закриття шлюзів у червні та гідроземельні роботи нижче греблі.

Ключові слова: угруповання безхребетних гідробіонтів, Явірська гідроелектростанція, ріка Стрий, Українські Карпати

За останнє десятиліття на водотоках Українських Карпат збудовано й оновлено десятки гідроелектростанцій. На території гірської частини Львівської області діє лише Явірська гідроелектростанція на р. Стрий (с. Явора Турківського р-ну). Зважаючи на фрагментарне вивчення впливу гідроелектростанцій на біоту карпатських водотоків, метою цієї роботи є дослідження впливу функціонування Явірської ГЕС на угруповання водяних безхребетних р. Стрий. Основні завдання полягали в оцінці різноманіття, чисельності та біомаси угруповань безхребетних русла Стрия та визначення якості води із застосуванням методів біоіндикації. Безхребетні гідробіонти формують основну кормову базу риб, земноводних та інших тварин, забезпечують екологічні особливості свого середовища існування і стабільне функціонування гідроecosystem. Зміни в кількісній і якісній структурі їхніх угруповань чітко вказують на зміни умов існування. Тому дослідження безхребетних гідробіонтів є обов'язковим під час вивчення антропогенного впливу на гідроecosystemи.

Матеріали та методи

Явірська ГЕС введена в експлуатацію у 1961 р. і пропрацювала до 1975 р. ТОВ «Енергоінвест» придбало залишки ГЕС, і у 2008 р. станція відновила свою роботу. За період експлуатації розчищували русло р. Стрий з боку нижнього б'єфу, проводили роботи з берегоукріплення та модернізації ГЕС [29].

Низка наукових праць містить дані про наявний і прогнозований вплив гідроелектростанцій на стан ecosystem карпатських річок – Тересви [4], Шипоту [23],
© Микітчак Т., Штупун В., 2017

Тереблї й Рїки [11], Шипоту, Черемошу, Тереблї, Рїки, Тересви [25]. У цих працях вказано, що такий вплив або докорінно змінює сформовану річкову екосистему (р. Теребля, Рїка), або істотно знижує якість води чи призводить до збіднення й перебудови угруповань гідробіонтів за рахунок вселення та розвитку алохтонних видів (р. Черемош, Шипот).

Дослідження якісного й кількісного складу угруповань водяних безхребетних проводили загальноприйнятими в гідроекології методами [1, 10]. Проби відбирали планктонною сіткою Апштейна, якою фільтрували товщу води, перемивали поверхню каміння, підводних предметів і рослин, пересівали дрібні фракції донних осадів. Низку таксонів відбирали шляхом ручного збору. У проби потрапляли організми бентосу, перифїтону, сиртону, планктону і нейстону. Для визначення таксонів використовували десятки наукових праць [6–8, 15–18, 22 та ін.]. Зважаючи на методику відбору, в роботі не висвітлено угруповання багатьох груп мікробентосу (менших за 0,1–0,2 мм).

Біомасу безхребетних, більших за 0,5 см, визначали на місці відбору проб [1], біомасу дрібніших організмів – за коефіцієнтами індивідуальної маси [4, 12 та ін.]. До еудомінантів залучали види, частка яких у загальній чисельності сягала більше 10 % [27].

Оцінку різноманїття, вирівняності й подібності вибірок проводили за допомогою індексів Шенонна, Сїмпсона, Піелу й Серенсена-Чекановського [19]. Якість води оцінювали за допомогою індексів ТВІ й ЕВІ Вудівїсса [20, 28], Пантле-Бука [26] та Гуднайта-Вїтлі [24]. Бальна оцінка якості води за біотичними індексами переведена у стандартизовані категорії якості води за державними нормами України [1, 9, 13].

Для порівняння впливу функціонування Явірської ГЕС на біоту р. Стрий дослідженнями охоплено 6-кілометрові відтинки ріки вище й нижче Явірського водосховища (8 постійних створів), саме водосховище та лентичні водойми річкової долини (рис. 1). Упродовж досліджень здійснено 8 польових виїздів – 28.11.2015, 28.01.2016, 28.03.2016, 28.04.2016, 28.05.2016, 23.06.2016, 28.07.2016, 10.10.2016, під час яких відібрано 228 бентичних проб, 20 проб дрефту і 28 проб планктону.

Дно на всіх створах переважно кам'янисте, з невеликими глинисто-мулистими ділянками, здебільшого біля берегів. Значну частину дна на створах № 1–4 вкривають зарості водопериці (*Myriophyllum spicatum* L.), інколи трапляються рдести (*Potamogeton crispus* L., *P. pectinatus* L.) та елодея (*Elodea canadensis* Michx.). На створі № 5 водяних і напівводяних рослин немає. На створах № 6–8 водопериця трапляється спорадично. Береги дослідженого відтинку ріки перебувають переважно під сільською забудовою (села Завадівка і Явора, околиці міста Турка), частково під пасовищами, луками, чагарниками або лісом.

Водосховище (вдсх) досліджували на трьох стаціях, із них дві – постійні (рис. 1). Його фізико-географічні параметри істотно змінюються упродовж року, залежно від функціонування Явірської ГЕС. Під час тривалого наповнення водосховища (під час наших досліджень – це листопад-березень, червень-жовтень) береги вкриті мулом і глинистим осадом товщиною більше метра, який повністю вкриває кам'янистий субстрат дна. Під час спуску водосховища більшість мулу зноситься вниз, оголюється кам'янисте дно й річка швидко набирає типового для цього району вигляду. Після чергового затоплення водосховище знову заноситься мулом і глинами.

У складі рослинних угруповань течії ріки, водосховища, ставів, технічних водойм тощо за попередніми даними виявлено 45 видів гідрофільної флори. У прибережній зоні ріки та водосховища найбільш поширеними є *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud., *Typha latifolia* L., *T. laxmanii* Lepech., *T. angustifolia* L., *Scirpus sylvaticus* L., *Carex acuta* L., *C. vesicaria* L., *C. hirta* L., *C. rostrata* Stokes, *C. vesicaria* L., *C. vulpina* L., *Equisetum fluviatile* L., *Alisma plantago-aquatica* L., *Ranunculus repens* L. тощо. Лише у водосховищі

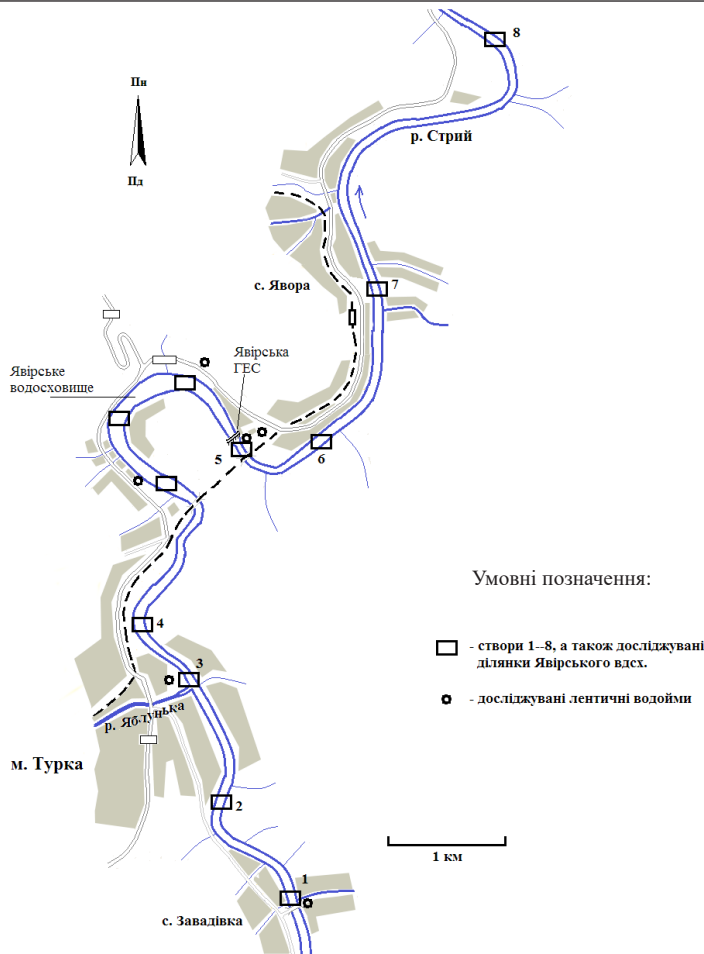


Рис. 1. Досліджені створи та лентичні водойми р. Стрий

відзначено *Polygonum amphibium* L. і *Batrachium circinatum* (Sibth.) Spach. Латинські назви рослин наведені за “Визначником вищих рослин України” [14].

Середня глибина досліджених створів сягала 0,3–0,7 м. Справжню витрату води обчислювали за стандартними методиками [3, 21]. На створі № 4 28.03.2016 (стічні шлюзи греблі частково відкриті) цей показник сягав 9,5 м³/с, № 6 – 14,2 м³/с, 28.05.2016 (шлюзи відкриті) – 10,4 і 10,6 м³/с, 23.06.2016 (шлюзи закриті) – 7,2 і 0,8 м³/с. Під час наповнення водосховища у червні витрата води на нижньому б’єфі зменшується майже у 10 разів, що призводить до істотного обміління русла.

Найменші значення температури води на досліджуваній ділянці р. Стрий сягали +1–2 °С (січень), найбільші – +22–23 °С (створи вище ГЕС, червень) і +25–29 °С (створи нижче ГЕС, червень). У цьому ж місяці проведено гідрохімічні дослідження (дані к.г.н. Ю. Боруцької, геологічний факультет ЛНУ ім. І. Франка). Для більшості показників не відзначено певних тенденцій. Незначні відмінності властиві значенням рН: на верхніх створах 8,0–8,1, на нижніх – 8,0–8,7. Після греблі у воді значно зростає концентрація розчиненого кисню: вище водосховища – 7,9–8,8 мг О₂/дм³, нижче – 8,6–12,6 мг О₂/дм³, що, очевидно, пов’язано з функціонуванням греблі та є позитивним явищем для екосистеми р. Стрий.

Результати і їхнє обговорення

Досліджуваний відтинок ріки за структурними показниками угруповань безхребетних для зручності розділили на п'ять ділянок: відтинок ріки 2–6 км вище водосховища (створи № 1–3), які перебувають поза межами впливу ГЕС і стан яких сприймаємо як типовий (природний) для території досліджень; відтинок 0–2 км вище водосховища (створ № 4), де періодично відбувається підпір річкових вод тілом водосховища; водосховище, яке більшість часу є лімнічною водоймою; відтинок 0–5 км нижче греблі (створи № 5–7), на якому здійснюється прямиий вплив діяльності ГЕС; відтинок 5–6 км (створ № 8), де вплив ГЕС послаблюється і періодично є малопомітним. У межах цих ділянок відзначено подібні тенденції розвитку гідробіонтів.

Динаміка видового різноманіття на створах упродовж досліджень показана на рис. 2, а, чисельності – рис. 2, б, біомаси – 2, в.

На створах р. Стрий і в акваторії Явірського водосховища відзначено 199 таксонів безхребетних гідробіонтів, з яких до виду ідентифіковано 109. На створі № 1 – 109 видових таксонів, № 2 – 79, № 3 – 80, № 4 – 70, у водосховищі – 64, на створі № 5 – 27, № 6 – 39, № 7 – 38, № 8 – 76. У листопаді траплялися 44 таксони, у січні – 13, у березні – 45, у квітні – 24, у травні – 30, у червні – 29, у липні – 67, у жовтні – 45.

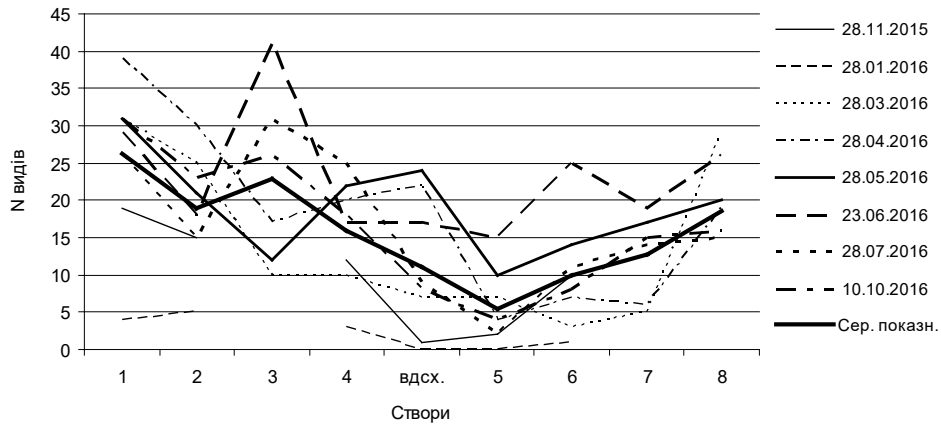
У листопаді й березні під час тривалого заповнення Явірського водосховища високі показники різноманіття (10–31 вид), чисельності (14–53 ос./м²) та біомаси (20–310 мг/м²) спостерігаємо на створах № 1–4. У водосховищі й на створах № 5–7 відзначено поодинокі особини безхребетних. На створі № 6 видове різноманіття відновлюється до показників верхніх створів, а показники чисельності (104–136 ос./м²) та біомаси (342–412 мг/м²) є найбільшими. Узимку (січень) якісний і кількісний склад угруповань є вирівняним.

Після відкриття шлюзів у квітні ситуація різко змінюється. Кількість видів на верхніх створах коливається у межах 17–39, чисельність – 58–157 ос./м², біомаса – 209–1699 мг/м². Водосховище в цей час перетворюється на русло ріки, яке активно заселяють безхребетні (кількість видів – 22, чисельність – 96 ос./м², біомаса – 260 мг/м²). Створам № 5–7 притаманні набагато нижчі показники: кількість видів – 4–7, чисельність – 12–78 ос./м², біомаса – 4–156 мг/м². На створі № 6 кількість видів є досить високою – 19, проте чисельність (86 ос./м²) та біомаса (145 мг/м²) – набагато нижчі, ніж на створах вище водосховища. Безхребетні організми на ділянці нижче греблі представлені переважно особинами дрефту й сиртону. Такий розподіл вказує на значну зміну умов існування гідробіонтів унаслідок руйнування субстрату дна стоком великих мас води під час відкриття шлюзів. У травні показники різноманіття (10–31 видів) та чисельності (55–150 ос./м²) вирівнюються на дослідженому відтинку ріки. Щодо біомаси, то на створах № 1–4, 7 і 8 її показники коливаються в межах 1023–1762 мг/м², тоді як у водосховищі й на створах № 5 і 6 – у межах 101–200 мг/м².

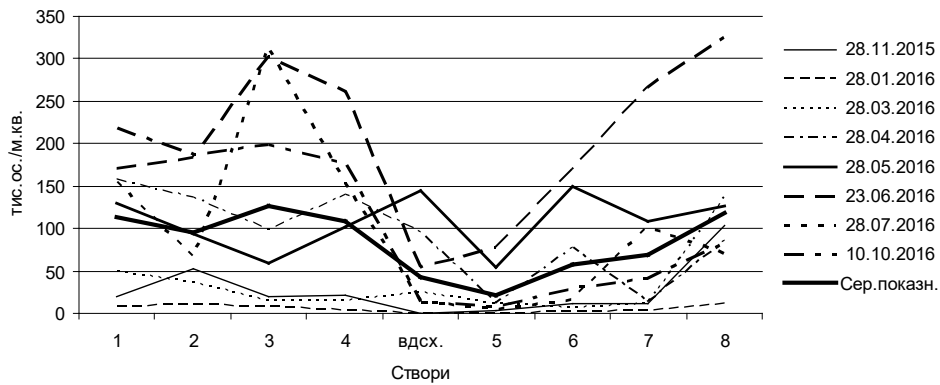
У червні кількість видів (41) є найбільшою на створі № 3 після впадіння р. Яблуньки за рахунок внесення до річкового угруповання низки видів, толерантних до органічного забруднення. На створах № 1, 2, 4, 6–8 й у водосховищі відзначено 17–26 видів. Найменше таксонів зареєстровано на створі № 5–15. У водосховищі й на створі нижче греблі переважають організми планктону й сиртону. Чисельність і біомаса на цих ділянках є низькими: водосховище – 54 ос./м² і 22 мг/м²; створ № 5 – 77 ос./м² і 106 мг/м². На інших створах ці показники коливаються у межах 170–325 ос./м² і 607–2114 мг/м².

У липні й жовтні (тривале заповнення водосховища) кількість видів на створах вище водосховища сягає 15–31, у водосховищі – 8–9, на створі № 5 – 2–4, на створах нижче греблі – 11–16. Подібний розподіл відзначено і для показників чисельності й біомаси: створи № 1–4 – 65–314 ос./м² і 510–2071 мг/м², водосховище – 13–14 ос./м² і 4–5 мг/м²,

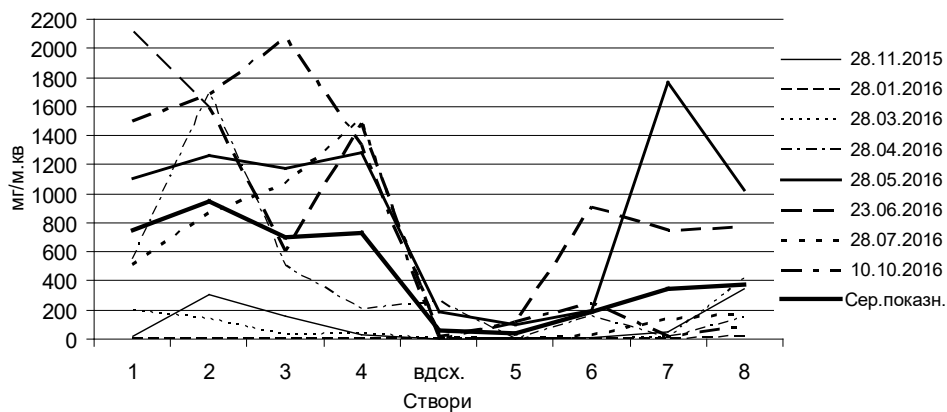
створ № 5 – 5–8 ос./м² і 1–121 мг/м², створи № 6–8 – 16–102 ос./м² і 22–245 мг/м². Ці показники свідчать про деградацію річкових угруповань безхребетних у водосховищі й на створах нижче греблі.



а



б



в

Рис. 2. Сезонні зміни видового різноманіття (а), чисельності (б), біомаси (в) безхребетних гідробіонтів на досліджуваному відтинку р. Стрий

Для аналізу видового різноманіття створів р. Стрий застосували індекси Шеннона (I SH), Сімпсона (I Sa) й Пієлу (I E). Згідно з показниками I SH, найбільш різноманітними є угруповання на створах № 1-4 і 8 (I SH – 2,0), тоді як угруповання водосховища (1,3) і трьох створів нижче Явірської ГЕС (1,2–1,4) є якісно збідненими. Для угруповань створу № 6 значення I SH повертаються до 2,0. Значення I Sa показують таку ж тенденцію, як I SH (створи № 1–4 – 0,8; водосховище і створи № 5 і 6 – 0,6, створ № 7 – 0,7 і створ № 8 – 0,8). Значення індексу Пієлу свідчать, що найбільш вирівняні за чисельністю і якісним складом угруповання притаманні водосховищу та створам № 4–6 (1,9–2,0), тоді як іншим ділянкам властива складніша структура угруповань (I E – 1,8).

Для створів, розташованих вище за течією від водосховища, відзначено 161 видовий таксон, для водосховища – 64, для створів нижче греблі – 98. Значення індексу Серенсена-Чекановського (I QS) для фаун створів вище ГЕС і водосховища дорівнює 0,29, водосховища і створів нижче ГЕС – 0,35, створів вище й нижче ГЕС – 0,40. Ці показники свідчать про відокремленість гідрофауни Явірського водосховища як лентичної водойми від фаун сусідніх лотичних ділянок р. Стрий. Різниця видового різноманіття і значень I QS дає змогу говорити про зміну якісного складу нижніх створів на 60 % порівняно з верхніми.

У червневих пробах з гирла р. Яблунька відзначено 17 видів безхребетних гідробіонтів, із яких лише два не траплялися у р. Стрий. Склад фауни гирла притоки подібний до фауни русла р. Стрий, однак тут чисельно переважають види, пристосовані до органічного забруднення. Вагомої зміни якісного і кількісного складу угруповань р. Стрий після впадіння притоки Яблуньки не відзначено.

У досліджених лентичних водоймах (рис. 1) відзначено 72 види безхребетних, із яких 39 траплялися тільки в лентичних водоймах. Фауна безхребетних створу № 5 на 45 % складається із вселенців сусідніх лентичних водойм, створу № 6 – на 26 %, Явірського водосховища – на 25 %. Організми, які мігрують або зносяться у складі сиртону з лентичних водойм у р. Стрий, відіграють важливу роль у формуванні загального біорізноманіття ріки та включаються в харчові ланцюги інших гідробіонтів. Наприклад, на створі № 5 у харчових грудках 20 особин *Gobio gobio carpathicus* Vladykov, 1925 99 % захоплених безхребетних належали лентичним видам. У цей же час ріка заселяється невластивими для лотичних біотопів видами, що істотно змінює річкову екосистему у зоні впливу ГЕС.

Найбільш поширеними на верхніх створах (№ 1–4) є представники п'явок (20 % від загальної чисельності угруповання), кліщів і одноденок (по 13 %), двокрилих (33 %). У водосховищі переважають малоцетинкові черви (30 %), одноденки (11 %, тільки за рахунок збільшення їхньої кількості у квітні й травні), двокрили (30 %). На нижніх створах (№ 5–8) – малоцетинкові черви (12 %), одноденки (15 %) та двокрилі (43 %).

Основними еудомінантами за чисельністю упродовж вегетативного періоду на верхніх створах є *Herpobdella octoculata* (Linnaeus, 1758) й *Orthocladius saxicola* Kieffer, 1911, у певні місяці – *Parakiefferiella bathophila* (Kieffer, 1912), *Nais pseudobtusa* Piquet, 1906 (найбільш численні у березні) та низка інших видів. На створі № 1 лише в листопаді й березні до еудомінантів належав *Gammarus pulex* (Linnaeus, 1758). У інші місяці бокоплави на досліджуваному відтинку р. Стрий не відзначені. У водосховищі найбільш численними в різні періоди є *N. pseudobtusa* й *O. saxicola*. Ці два види є основними еудомінантами й на нижніх створах № 5–8. Періодично до еудомінантного складу на нижніх створах належать *Chaetogaster* sp. (листопад), *P. bathophila* (березень), *Paraleptophlebia submarginata* (Stephens, 1835) (червень) та низка інших менш численних видів.

Униз за течією в чисельності угруповань безхребетних відзначено поступове зростання частки олігохет і двокрилих, що особливо чітко помітно нижче Явірської ГЕС.

Натомість чисельність п'явок, бабок і водяних клопів зменшується. На нижніх створах представники веснянок відзначені лише дрифтовими особинами, крім однієї особини *Perala abdominalis* Guérin-Méneville, 1838 на створі №8 у червні.

Найбільш чіткі зміни у розподілі біомаси відзначено для малошетенкових черв'яків: 2 % від загальної біомаси угруповань вище і 8 % – нижче Явірської ГЕС. На нижніх створах значно зростає біомаса одноденок: 3 % до і 12 % після ГЕС. Це відбувається в основному за рахунок масового розвитку *P. submarginata* у червні. Зростає і частка двокрилих: з 8 до 17 %. Частка п'явок у загальній біомасі знижується: 68 і 38 %. У більшості випадків основним еудомінантом на всіх створах є *Herpobdella octoculata* (Linnaeus, 1758) – звичайний вид для рівнинних лентичних водойм, тоді як до еудомінантів верхніх створів часто належить і *Herpobdella monostriata* (Gedroye, 1911) – вид, який поширений переважно в Карпатах.

Поширення гідробіонтів на дослідженому відтинку р. Стрий у зоні впливу Явірської ГЕС пояснюється типовими процесами формування угруповань безхребетних гірських водотоків: 45 % зообентосу рік у Карпатах формується за рахунок дрефту. У природних умовах дрефт відбувається переважно під час підняття рівня води (повені, паводки). Сигналом для його початку є збільшення каламутності води, що часто має місце через антропогенний вплив, незалежно від гідрологічних умов [2]. Зважаючи на велику частку вторинноводних безхребетних у видовому різноманітті досліджуваного відтинку р. Стрий (55 %), дрефт є важливим у розселенні місцевих таксонів гідробіонтів.

Із природного русла ріки Стрий дрифтові особини переносяться в лімнічні умови Явірського водосховища, де швидкість течії знижується. Осідаючи на дно, вони не потрапляють у відповідні умови для свого розвитку – відсутній стабільний субстрат дна. Більшість дрифтових особин гине у верхній частині водосховища. Після проходження особинами дрефту тіла водойми та греблі їхня чисельність і в березні, й у червні зменшувалася в 6,5 разу, а в жовтні – у 18 разів (рис. 3). Отже, водосховище є істотною перепорою для поширення видів безхребетних гідробіонтів униз за течією.

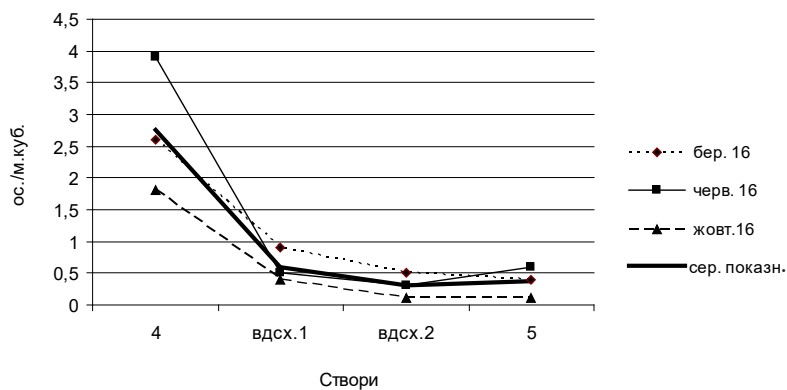


Рис. 3. Зміни чисельності дрефту в зоні функціонування Явірської ГЕС

Значення індексу ТВІ вказують, що вода створів № 1–4 і 8 є слабо забрудненою, створів № 3, 4 і 7 – помірно забрудненою, а водосховища й створів № 5 і 6 – брудною. Найбільш забрудненою вода є у січні, листопаді й березні; найбільш чистою – у травні. Індекс ЕВІ показав аналогічні до ТВІ результати. Значення індексу сапробності показують трохи іншу ситуацію: підвищений сапробний статус притаманний верхнім створам, у водосховищі й

на нижніх створах вода очищується від органіки, яка, очевидно, переходить в осад. Особливо чітко ця тенденція помітна в осінній період. За показниками індексу Гуднайта-Вітлі (I G&W) середні показники часток олігохет у загальній чисельності не перевищують 60 %, тобто на досліджуваному відтинку ріка перебуває в хорошому стані. Сумнівна якість води за категоріями I G&W властива лише літоралі водосховища у травні (частка олігохет 64 %), створу № 5 загалом у травні (61 %) та літоралі створу № 6 у листопаді (67 %). Загалом вода досліджуваного відтинку р. Стрий належить до третього класу якості. Варто зауважити, що за показниками біотичних індексів впадіння р. Яблуньки, яка під час досліджень слугувала каналізаційним руслом для м. Турка, суттєво не впливає на якість води р. Стрий.

Вплив Явірської ГЕС на угруповання водяних безхребетних містить низку небезпечних тенденцій, які з часом можуть досягти критичного рівня. Основними негативними чинниками є бар'єр у континуумі річкової системи, створений лімнічною водоймою водосховища, накопичення мулу та глинистих наносів на його дні та берегах і знесення цих осадів на нижчі ділянки русла, руйнування субстрату дна у руслі нижче ГЕС під час швидкого спуску великих мас води, різке обміління русла Стрия нижче греблі після закриття шлюзів у червні та гідроземельні роботи нижче греблі. Проте ця гідроспорада може приносити набагато меншу шкоду річковій екосистемі або навіть певну користь за умови усунення чи зменшення впливу цих чинників.

Якісний і кількісний склад угруповань безхребетних р. Стрий зазнає істотної деградації на відстані до 5 км нижче греблі Явірської ГЕС, порівняно з угрупованнями ріки вище від водосховища: таксономічне різноманіття і чисельність на цій ділянці знижуються удвічі, біомаса – втричі. На відстані 6 км нижче греблі угруповання безхребетних відновлюються до стану, властивого для ріки вище ГЕС, крім періоду повного відкриття шлюзів. Явірське водосховище слугує істотною перепоною для дрефту гідробіонтів. У ньому під час наповнення формується не типова для р. Стрий фауна із видів-вселенців із лентичних водойм. Водосховище також погіршує якість води дотичних до нього ділянок р. Стрий.

Робота виконана на замовлення МБО «Екологія-Право-Людина» (Цивільно-правовий договір № 12–11/ 2015-МТ).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Арсан О. М., Давидов О. А., Дьяченко Т. М.* та ін. *Методи гідроекологічних досліджень поверхневих вод.* К.: ЛОГОС, 2006. 408 с.
2. *Афанасьев С. О.* Реакция биоты горных рек на залповые загрязнения // *Гидробиол. журнал.* 2002. Т. 38. №2. С. 42–50.
3. *Барышников Н. Б.* *Гидравлические сопротивления речных русел: уч. пособ.* СПб: Изд-во РГГМУ, 2003. 47 с.
4. *Боруцкий Е. В.* К методике определения размерно-весовой характеристики беспозвоночных организмов, служащих пищей рыб // *Вопр. ихтиологии.* 1958. № 11. С. 181–187.
5. *Гулейкова Л. В.* Особливості розвитку планктофауни р. Тересви (басейн Тиси) в умовах гідробудівництва // *Гідрологія, гідрохімія і гідроекологія.* 2010. Т. 3 (20). С. 148–153.
6. *Лепнева С. Г.* Ручейники. Личинки и куколки подотряда кольчатощушиковых (Annulipalpia). М.; Л.: Наука, 1964. 563 с.
7. *Лепнева С. Г.* Ручейники. Личинки и куколки подотряда цельнощупиковых (Integrilpalpia). М.; Л.: Наука, 1966. 564 с.

8. Лукін Є. І. П'явки. Фауна України. К.: Вид-во АН УРСР, 1962. Т. 30. 196 с.
9. Методика екологічної оцінки якості поверхневих вод за відповідними категоріями. К.: Символ, 1998. 28 с.
10. Методические рекомендации по сбору и обработке материалов при гидробиологических исследованиях на пресноводных водоемах. Зообентос и его продукция. Л.: ГосНИОРХ, ЗИН АН СССР, 1983. 51 с.
11. Микитчак Т. І. Вплив функціонування Тербле-Ріцької ГЕС на угруповання безхребетних гідробіонтів рік Ріка й Тербля (Українські Карпати) // Наукові основи збереження біотичного різноманіття. 2015. Т. 6 (13). № 1. С. 249–262.
12. Мордохай-Болтовский Ф. Д. Материалы по среднему весу водных беспозвоночных бассейна Дона // Тр. пробл. и темат. совещ. ЗИН. 1954. Т. 2. С. 75–88.
13. Оксюк О. П., Жукинський В. Н., Брагинський Л. П. и др. Комплексная экологическая классификация качества поверхностных вод суши // Гидробиол. журнал. 1993. Т. 29. № 4. С. 62–76.
14. Определитель высших растений Украины. К.: Наук. думка, 1987. 548 с.
15. Определитель пресноводных беспозвоночных России и сопредельных территорий. СПб.: Наука. Т. 2. Ракообразные. 1995. 629 с.; Т. 3. Паукообразные и низшие насекомые. 1997. 440 с.; Т. 4. Высшие насекомые: двукрылые. 1999. 998 с.; Т. 5. Высшие насекомые. 2001. 836 с.; Т. 6 : Моллюски. Полихеты. Немертины. 2004. 528 с.
16. Панкратова В. Я. Личинки и куколки комаров подсемейства Orthoclaadiinae фауны СССР (Diptera, Chironomidae-Tendipedidae). Л.: Наука, 1970. 344 с.
17. Панкратова В. Я. Личинки и куколки комаров подсемейств Podonominae и Tanypodinae фауны СССР (Diptera, Chironomidae-Tendipedidae). Л.: Наука, 1977. 154 с.
18. Панкратова В. Я. Личинки и куколки комаров подсемейства Chironominae фауны СССР (Diptera, Chironomidae-Tendipedidae). Л.: Наука, 1983. 296 с.
19. Песенко Ю. А. Принципы и методы количественного анализа в фаунистических исследованиях. Владивосток; Ленинград: Наука, 1982. 286 с.
20. Семенченко В. П. Принципы и системы биоиндикации текучих вод. Минск: Орех, 2004. 125 с.
21. Слабожанин Г. Д. Гидрометрия: уч. пособ. по гидрологии. Томск: Изд-во Томск. гос. архит.-строит. ун-та, 2014. 58 с.
22. Стадниченко А. П. Прудовиковые и чашечковые (Lymnaeidae, Acroloxidae) Украины. К.: Центр учебн. лит-ры, 2004. 327 с.
23. Сухарева О. Ю., Рябухіна Т. С., Делеган-Кокайко С. В., Сухарев С. М. Вплив греблі малої ГЕС на стан річки Шипот // Наук. вісн. Ужгород. ун-ту. Сер. хім. 2015. № 2 (34). С. 51–54.
24. Goodnight C. I., Whitley T. S. Oligochaetes as indicators of pollution // Proc. 15th Industr. Waste Conf. Pardus Univ. Ext. End. 1961. Vol. 106. P. 139–142.
25. Kovalchuk A., Obodovskiy O., Shcherbak V. et al. Issues and challenges of small hydropower development in the Carpathians region (hydrology, hydro-chemistry, and hydrobiology of watercourses). Uzhgorod; Lviv; Kyiv: Hydroecological Society "Uzh", 2016. 195 p.
26. Pantle R., Buck H. Die biologische Überwachung der Gewässer und Darstellung der Ergebnisse // Gas- und Wasserfach. 1955. Vol. 96. No 18. 604 S.
27. Tishler W. Einführung in die Ökologie. Stuttgart; New York: Gustav Fischer Verlag, 1979. 215 S.
28. Woodiwiss F. S. A biological system to stream classification used by Trent River Board // Chem. Ind. 1964. Vol. 11. P. 443–447.
29. <http://turka.org.ua/content/Informatsiya-pro-robotu-yavirskoï-ges> (15.12.2016).

**INFLUENCE OF YAVIRSKA HYDROELECTRIC POWER PLANT ON THE
COMMUNITIES OF INVERTEBRATE HYDROBIONTS OF THE STRYI RIVER
(UKRAINIAN CARPATHIANS)**

T. Mykitchak, V. Shtupun

*Institute of Ecology of the Carpathians, NAS of Ukraine
4, Kozelnytska St., Lviv 79026, Ukraine
e-mail: tarasmykitchak@yahoo.com*

The most negative impact of Yavirska HPP on the aquatic invertebrate communities of river Stryi is noted along four kilometers stretch below the dam. Taxonomic diversity, abundance and biomass of the communities on this part of the river decreases in two to three times compare to the sampling sites above Yavirske reservoir. At a distance over six kilometers below the dam structural parameters of the invertebrate groups are restored to the natural status (like the sampling sites above the reservoir). The number of individuals of the drift after passing through the reservoir and the dam decreases tenfold on average. Water of the investigated river stretch is slightly polluted (the sites, which are outside from the direct influence of the HPP functioning) and moderately polluted (the reservoir by it self and the sites located in the zone of HPP influence). The results of our investigations point out the main negative factors, that are as follows: limnetic conditions of the reservoir in the river continuum, accumulation of silt and clay sediments on the bottom and the banks of the reservoir, demolition of sediments in the lower stretch of the river, destruction of the river bottom substrate below the dam due to the rapid descent of large masses of water, instant shallowing of the Stryi river bed below the dam after the closing of station sluice in June, and some hydro-ground works below the dam.

Keywords: communities of invertebrate hydrobionts, Yavirska hydroelectric power plant, the Stryi river, Ukrainian Carpathians

МЕХАНІЗМИ ПРИСТОСУВАННЯ БРІОФІТІВ ДО СОЛЬОВОГО СТРЕСУ НА ТЕРИТОРІЇ ХВОСТОСХОВИЩА СТЕБНИЦЬКОГО ГІРНИЧО-ХІМІЧНОГО ПІДПРИЄМСТВА «ПОЛІМІНЕРАЛ»

Н. Кияк¹, Л. Буньо²

¹Інститут екології Карпат НАН України
вул. Стефаника, 11, Львів 79005, Україна
e-mail: kyuk_n@i.ua

²Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: bioza@ukr.net

Досліджували особливості метаболізму вуглеводів і катіонообмінну здатність клітинних стінок мохів *Barbula unguiculata* Hedw., *Funaria hygrometrica* Hedw., *Didymodon tophaceus* (Brid.) Lisa, *Bryum caespitium* Hedw. і *Brachythecium campestre* (Müll. Hal.) Schimp. залежно від рівня засолення субстрату на території хвостосховища відходів видобутку калійних солей Стебницького гірничо-хімічного підприємства «Полімінерал». Визначено хімічний іонний склад водних витяжок із проб субстрату, відібраних із території хвостосховища. За аніонним складом встановлено сульфатний тип засолення субстрату. Показано, що пристосування бріофітів до засолення субстрату забезпечується зміною спрямованості метаболічних процесів, яка проявляється у збільшенні загального вмісту вуглеводів і перерозподілі вуглеводного обміну в напрямі гідролізу полісахаридів та накопичення розчинних вуглеводів. Зміна активності α -амілази у пагонах мохів є чутливим маркером сольового стресу. Підвищення амілазної активності призводить до збільшення пулу розчинних вуглеводів і посилення резистентності бріофітів до сольового стресу. Катіонообмінна ємність клітинних стінок мохів має важливе значення у формуванні солестійкості бріофітів. Це величина непостійна, залежить від видових особливостей мохів та інтенсивності сольового стресу.

Ключові слова: сольове забруднення, метаболізм вуглеводів, амілаза, катіонообмінна ємність, хвостосховище, бріофіти

Неефективна технологія переробки полімінеральних руд Стебницьким калійним комбінатом гірничо-хімічного підприємства (ГХП) «Полімінерал» (м. Стебник, Львівська обл.) призвела до утворення величезної кількості відходів флотаційного збагачення калійних руд, які займають площу близько 125 га. Наявність солей у субстраті хвостосховищ впливає на ріст і розвиток рослин. За їх надлишку ґрунтовий розчин набуває високого осмотичного тиску, тому в більшості рослин порушуються основні біосинтетичні функції.

Особливістю заростання територій хвостосховища є формування піонерних стадій із рослин галофітних і солестійких екологічних груп [10]. Представників автохтонної флори на цих стадіях немає, що свідчить про невідповідність цієї території умовам природних ґрунтів. Мохоподібні є піонерами заростання засоленних субстратів хвостосховища, оскільки їхнє поширення пов'язане з піонерними угрупованнями початкових стадій рослинних сукцесій на цих територіях. Сьогодні є мало інформації як щодо впливу сольового стресу на бріофіти, так і щодо механізмів, які забезпечують їхнє виживання в умовах засолення [15, 24, 28, 35]. Серед бріофітів немає галофітів, не виявлено спеціалізованих механізмів

солестійкості, як у судинних рослин, тому важливим є пізнання особливостей їхньої адаптивної стратегії в умовах засолення.

У рослинному організмі зміна спрямованості метаболічних процесів на адаптацію до сольового стресу виражається в акумуляції осмопротекторів, серед яких важливими є цукри. Посилення гідролізу полімерних форм вуглеводів, у тому числі низькомолекулярних олігосахаридів, і акумуляція розчинних вуглеводів забезпечує внутрішню регуляцію водного потенціалу та сприяє активному поглинанню води рослинним організмом, що є важливим в умовах засолення [7, 21]. Цукри чинять антиденатураційний вплив на білково-ліпідний комплекс мембран. Вони також перехоплюють активні форми кисню (АФК) і гальмують процеси вільнорадикального окислення біологічних молекул у процесі розвитку окиснювального стресу, індукованого дією сольового стресу [8]. Крім протекторної й антиоксидантної дії, деякі вуглеводи можуть виконувати сигнальну роль [29].

У формуванні солестійкості рослини значну роль відіграє клітинна стінка. Це складноорганізований, динамічний компартмент клітини, який завдяки наявності фіксованих негативно заряджених груп забезпечує модифікацію зовнішнього розчину в результаті реакцій обміну між іонообмінними групами полімерного матриксу й іонами середовища. Дослідженню особливостей функціонування клітинних стінок рослин як природних іонообмінників в умовах засолення присвячено небагато публікацій [12, 20]. Практично немає робіт щодо оцінки іонообмінної здатності клітинних стінок мохів [17].

У зв'язку з цим досліджували особливості метаболізму вуглеводів і катіонообмінну здатність клітинних стінок бріофітів в умовах засолення на території хвостосховища Стебницького ГХП «Полімінерал».

Матеріали та методи

Для досліджень відбирали зразки мохів *Barbula unquiculata* Hedw., *Funaria hygrometrica* Hedw., *Didymodon tophaceus* (Brid.) Lisa, *Bryum caespiticium* Hedw. і *Brachythecium campestre* (Müll. Hal.) Schimp. упродовж квітня-травня 2016 р. із двох дослідних трансект на території хвостосховища Стебницького ГХП «Полімінерал», які суттєво відрізнялися за рівнем засолення субстрату. У роботі використовували свіжозібраний рослинний матеріал.

Визначення вмісту водорозчинних іонів у верхньому шарі субстрату хвостосховища (0–3 см) здійснювали комплексометричним методом. Хімічний іонний склад фільтратів водних витяжок, приготованих із досліджуваних зразків субстрату, визначали за стандартними методиками: HCO_3^- [3], Cl^- [4], SO_4^{2-} [5], Ca^{2+} і Mg^{2+} [6]. Суму катіонів (Na^+ ; K^+) визначали за різницею між сумою аніонів (HCO_3^- ; Cl^- ; SO_4^{2-}) і сумою катіонів (Ca^{2+} ; Mg^{2+}) у мг-екв. на 100 г субстрату.

Загальний вміст вуглеводів визначали фенол-сульфатним методом після кислотного гідролізу проб [31]. Вміст водорозчинних вуглеводів, моноцукрів і крохмалю оцінювали в одній наважці спектрофотометрично із застосуванням пікринової кислоти [9]. Для цього рослинний матеріал екстрагували у дистильованій воді при 40–50 °С протягом 1 год, охолоджували та центрифугували (4000 об./хв, 5 хв). Надосадову рідину використовували для визначення моноцукрів. Для визначення суми водорозчинних вуглеводів до супернатанту додавали 10 % розчин HCl і витримували на киплячій водяній бані упродовж 5 хв. Для визначення крохмалю осад, сформований після центрифугування проб, гідролізували у 2 % HCl протягом 2 год на киплячій водяній бані. Реакційна суміш містила насичений розчин пікринової кислоти і 20 % розчин Na_2CO_3 . Проби фотометрували за довжини хвилі 490 нм на спектрофотометрі Specord 210 Plus.

Клітинні стінки пагонів мохів виділяли за методом Д. Стассарта [33] з використанням 1 %-ного розчину тритону X-100. Катіонообмінну ємність клітинних стінок визначали

за методом Ф. Блемея [13]. Метод базується на почерговому витримуванні рослинних проб у розчині HCl (0,1 моль/л) та KCl у концентрації 1 моль/л, рН 7,0. Кількість адсорбованих іонів водню виявляли, оцінюючи зміну величини рН розчину KCl до та після експозиції з рослинним матеріалом. КОЕ виражали в мг-екв/100 г сухої речовини.

Результати і їхнє обговорення

Едафотопи осушених хвостосховищ Стебницького ГХП «Полімінерал» визначають як техногенні субстрати із властивостями не характерними для ґрунтів автохтонних природних екосистем [2, 10]. Основним обмежувальним чинником для заселення рослин на цих територіях є засолення субстрату, тому процеси формування фітоценозів відбуваються за градієнтом зниження вологості й концентрації солей.

Для дослідів було відібрано дві ділянки, які суттєво відрізнялись як за хімічним складом субстрату (табл. 1), так і, відповідно, за видовим складом рослин.

Ділянка 1 – росли переважно галофіти і солестійкі види судинних рослин *Salicornia europaea* L., *Tripolium vulgare* Nees, *Sagina nodosa* Fenzl., *Puccinella distans* Parl., *Artemisia vulgaris* L. Тут відбирали зразки мохів *Barbula unquiculata*, *Funaria hygrometrica* та *Didymodon tophaceus*.

Ділянка 2 – розташована на окраїні хвостосховища, де серед різнотрав'я відбирали зразки мохів *Bryum caespiticium* і *Brachythecium campestre*.

Хімічний аналіз проб субстрату на обох ділянках показав найбільший уміст сульфатів, що, згідно з класифікацією ґрунтів Н.І. Базилевич і Є.І. Панкової за ступенем засолення [1], вказує на сульфатний тип засолення. Вміст істотно домінуючого в хімізмі SO_4^{2-} -іона на ділянці 1 становив 23,6 мг-екв/ 100 г ґрунту, вміст Cl^- -іона – 12,4 мг-екв /100 г ґрунту, що свідчить про дуже високий ступінь засолення субстрату [1]. На ділянці 2 вміст SO_4^{2-} іонів та Cl^- -іона був майже удвічі меншим, що вказує на високий ступінь засолення [1]. Серед катіонів водних витяжок на обох ділянках істотно домінували іони Ca^{2+} та Mg^{2+} . Сумарний уміст катіонів і аніонів був майже удвічі більшим у субстраті ділянки 1, що й зумовило поселення тут переважно галофітів і солестійких видів судинних рослин, а також мохів із життєвою формою низької дернини, які є характерними для порушених територій.

Таблиця 1

Вміст водорозчинних йонів у субстраті хвостосховища Стебницького ГХП «Полімінерал»

Місце відбору проб субстрату	Вміст водорозчинних йонів, мг-екв/100 г субстрату							
	$\text{Na}^+\text{+K}^+$	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Сума катіонів	HCO_3^-	Cl^-	SO_4^{2-}	Сума аніонів
Ділянка 1	6,7±0,2	17,6±0,9	15,8±1,1	40,1	3,7±1,6	12,4±0,6	23,6±1,4	39,7
Ділянка 2	1,2±0,1	10,2±0,5	8,8±0,4	20,2	2,2±0,1	7,6±0,2	10,4±0,5	20,2

Фізіологічна дія сольового стресу пов'язана зі зневодненням, оскільки високі концентрації іонів солей призводять до гіперосмотичного шоку й іонного дисбалансу. Компенсація осмотичного тиску за таких умов відбувається за рахунок накопичення у цитозолі відповідних осмопротекторів і осмолітів, які майже не впливають на внутрішньоклітинний рН та підтримують нормальну активність багатьох клітинних ферментів в умовах впливу надмірних концентрацій солей.

У бріофітів одним із найважливіших механізмів адаптації до осмотичного стресу є підвищення концентрації розчинних вуглеводів, що супроводжується підвищенням

осмотичного потенціалу клітини. Розчинні цукри (насамперед, сахароза та рафіноза) приєднуються до полярних кінцевих груп фосфоліпідів мембран і, таким чином, стабілізують мембранну структуру клітин мохів у стресових умовах. Окрім того, високі концентрації цукрів у клітині забезпечують вітрифікацію цитоплазми та мембран, що надає клітинним структурам стабільності й мінімізує денатурацію білків [22].

Показано, що досліджувані види мохів відрізнялися за загальним вмістом вуглеводів. Найбільшу кількість визначено у *Didymodon tophaceus* і *Barbula unquiculata* (1315,3–1462,2 мкг/г маси с.р. відповідно). Для *Funaria hygrometrica* цей показник становив 1013,6 мкг/г маси с.р. У мохів із угруповання трав'яних рослин сумарний вміст карбогідратів був меншим: 782,4 мкг/г маси с.р. у *Bryum caespiticium* та 514,3 мкг/г маси с.р. – у *Brachythecium campestre* (табл. 2). Тобто нагромадження вуглеводів залежало як від рівня сольового стресу, так і від видових особливостей мохів. Вищий уміст цих сполук характерний для видів із життєвою формою низької щільної (чи пухкої) дернини, які приурочені до місцевиростань із дефіцитом вологи. Крім того, вже сама структура дернини є пристосуванням для поглинання й утримання вологи, дефіцитної в умовах засолення ґрунту.

Таблиця 2

Вміст вуглеводів у пагонах мохів із дослідних ділянок на території хвостосховища Стебницького ГХП «Полімінерал», мкг/г маси сирової речовини

Види мохів	Загальний вміст вуглеводів	Вміст крохмалю	Вміст водорозчинних вуглеводів	Вміст моноцукрів
Ділянка 1				
<i>Barbula unquiculata</i>	1462,2±84,3	70,2±2,1	382,5±15,6	74,2±2,2
<i>Funaria hygrometrica</i>	1013,6±54,4	76,3±1,8	251,2±16,2	46,8±1,8
<i>Didymodon tophaceus</i>	1315,3±45,8	56,6±2,2	220,3±12,8	29,5±1,4
Ділянка 2				
<i>Bryum caespiticium</i>	782,4±32,2	63,4±3,1	109,5±4,5	21,4±1,6
<i>Brachythecium campestre</i>	514,3±18,6	45,8±1,8	61,7±2,8	23,8±1,8

Відомо, що осмотичний стрес посилює гідроліз полімерних форм вуглеводів, передусім, крохмалю, оскільки для багатьох видів мохів, стійких до висушування, в умовах нестачі води характерними є високі концентрації моно- та дицукрів і низький вміст крохмалю [17]. В умовах сольового стресу виявлено певні закономірності спрямування вуглеводного обміну у бріофітів.

Аналіз вмісту крохмалю показав найнижчу концентрацію цього полісахариду у мохів із дослідної ділянки з високим рівнем засолення (4,3–4,9 % від загального вмісту вуглеводів у рослинах). Зокрема, найменшу кількість крохмалю у пулі карбогідратів зафіксовано у пагонах мохів в умовах сильного засолення субстрату – у *Didymodon tophaceus* і *Barbula unquiculata* (56,6–70,2 мкг/г маси с.р. відповідно). В умовах меншого засолення зафіксовано більшу частку полісахариду в сумарному пулі вуглеводів мохів – 8,1–8,8 % від загального вмісту карбогідратів, що, відповідно, становило 63,4 мкг/г маси с.р. у *Bryum caespiticium* і 45,8 мкг/г маси с.р. у *Brachythecium campestre*. Тобто в умовах сольового стресу в клітинах бріофітів виявлено низьку концентрацію крохмалю, що зумовлено посиленням його гідролізу, причому інтенсивність процесу деградації полісахариду перебувала у прямій залежності від рівня засолення субстрату.

Враховуючи те, що кінцевими продуктами гідролізу крохмалю є низькомолекулярні вуглеводи, досліджено вплив сольового стресу на вміст розчинних цукрів і моноцукрів, які сприяють розвитку витривалості в умовах засолення. Вуглеводний обмін у стресових умовах змінюється в бік накопичення розчинних цукрів, які виступають як осморегулятори,

що підвищують водоутримувальну здатність рослин. Інші функції розчинних вуглеводів можуть бути пов'язані з нейтралізацією вільних радикалів, метаболічною детоксикацією. Зафіксовано більше нагромадження осмолітів у пагонах мохів в умовах сильного засолення: у *Barbula unquiculata* їхній вміст був найвищим (382,5 мкг/г маси с.р.), у пагонах *Didymodon tophaceus* та *Funaria hygrometrica* – 220,3–251,2 мкг/г маси с.р. відповідно. На субстраті з меншим рівнем засолення у рослинах визначено у 2–2,5 рази меншу кількість осмолітів (61,71–109,53 мкг/г маси с.р.). Загалом, в умовах сильного сольового стресу вміст розчинних вуглеводів становив 16–26 % від загального пулу карбогідратів у рослинах та 11–14 % – за меншого засолення субстрату. Аналогічна тенденція виявлена й щодо вмісту моноцукрів у пагонах досліджуваних видів мохів. Їхню кількість у пагонах рослин також залежала від рівня сольового стресу, хоча частка моноцукрів у сумарному пулі розчинних вуглеводів становила менше 20 %. Наприклад, у пагонах *Barbula unquiculata* та *Funaria hygrometrica* визначено 74,2–46,8 мкг/г маси с.р., у *Didymodon tophaceus* – 29,5 мкг/г маси с.р. Можна припустити, що у бріофітів в умовах сольового стресу у складі розчинних вуглеводів переважають дисахариди, оскільки відомо, що нагромадження дисахаридів (насамперед сахарози) у клітинах мохів чітко корелює зі стійкістю до осмотичного стресу [27, 36].

Оскільки молекулярний рівень адаптації рослин є визначальним як генетично найбільш детермінований, активність ферментів може бути використана як один із показників стійкості до сольового стресу. Проаналізовано активність α - і β -амілаз, які каталізують гідроліз крохмалю. Виявлено, що α -амілазна активність у 3–5 разів перевищувала активність β -амілази, що свідчить про ключову роль цього ферменту в деградації крохмалю (рис. 1). Її активність коливалась у досить широкому діапазоні (1,97–4,08 мкг гідролізованого крохмалю/хв/мг білка). Найнижчу активність ферменту визначено у пагонах *Brachythecium campestre* – 1,97 мкг /хв/мг білка. В умовах сильного сольового стресу α -амілазна активність була високою у *Didymodon tophaceus* і *Funaria hygrometrica* (3,16–4,08 мкг/хв/мг білка), що свідчило про посилення гідролізу полісахаридів із наростанням сольового стресу. Водночас у *Barbula unquiculata* амілазна активність була трохи нижчою (2,38 мкг/хв/мг білка), хоча у пагонах цього виду зафіксовано найбільшу кількість розчинних цукрів, порівняно з рештою досліджуваних видів. Імовірно, попереднє накопичення розчинних вуглеводів призвело до часткової інактивації амілази за принципом зворотного зв'язку [23] для запобігання подальшому гідролізу полісахаридів.

Отже, у клітинах досліджуваних видів мохів ключову роль у гідролізі крохмалю відіграє α -амілаза, β -амілазна активність у всіх видів мохів була низькою. Отримані результати дають підстави підсумувати, що активність α -амілази залежить як від виду рослини, так і від рівня сольового стресу.

Підтримка росту рослин в умовах засолення пов'язана як із регуляцією водного й осмотичного гомеостазу, так і зі зміною властивостей клітинних стінок рослин. Полімери клітинних стінок є первинним бар'єром, який зменшує токсичну дію багатьох іонів в умовах сольового стресу. Ця бар'єрна функція, насамперед, залежить від катіонообмінної ємності (КОЄ) клітинних стінок. Встановлено, що КОЄ клітинних стінок мохів є значно вищою, порівняно зі судинними рослинами, і на 70–90 % визначається карбоксильними групами поліуронових кислот (насамперед, галактуранової кислоти) й частково карбоксильними групами, зв'язаними з целюлозою і геміцелюлозою [17]. Білкові компоненти також беруть участь у адсорбції катіонів, на їхню частку припадає 10–30 % іонообмінної здатності, не пов'язаної з пектиновими речовинами. Клітинні стінки також мають невелику аніоннообмінну здатність, яка, ймовірно, обумовлена фіксованими органічними катіонами матриксу клітинних стінок – вільними аміногрупами білків [19].

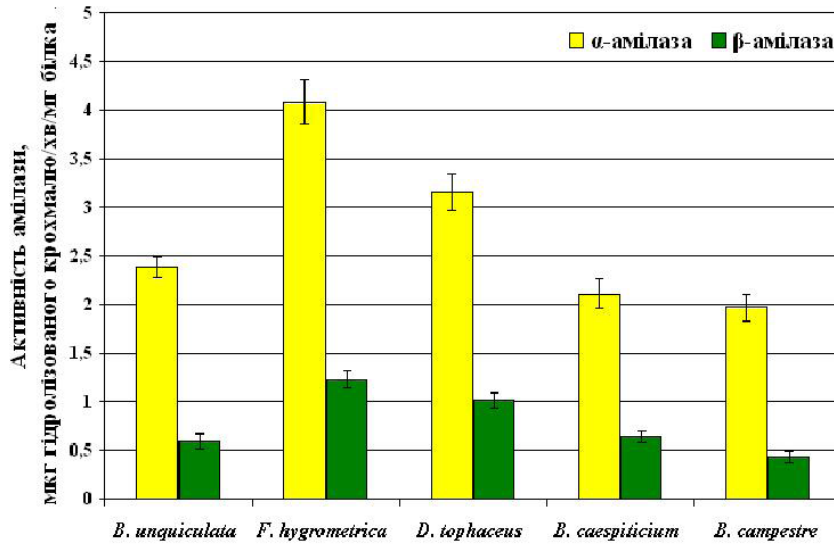


Рис. 1. Активність α - і β -амілаз у пагонах мохів із території хвостосховища Стебницького ГХП «Полімінерал»

Відомо, що КОЕ клітинних стінок є непостійною величиною і суттєво залежить від віку та виду рослини, умов навколишнього середовища [14]. Оцінено КОЕ клітинних стінок досліджуваних видів мохів і виявлено широкий діапазон цього показника (3,04–11,59 мг-екв/100 г маси сухої реч.), який зумовлений як рівнем засолення субстрату, так і, ще більшою мірою, видовими особливостями мохів (рис. 2).

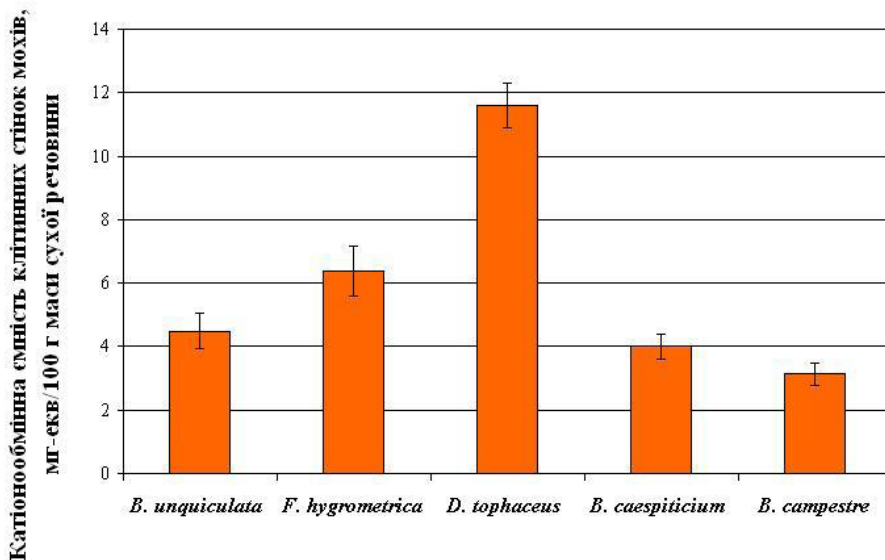


Рис. 2. Катіонообмінна ємність клітинних стінок мохів із території хвостосховища Стебницького ГХП «Полімінерал»

Наприклад, в умовах сильного засолення субстрату КОЄ рослин *Barbula unquiculata* становила 4,49 мг-екв/100 г маси сухої реч., *Funaria hygrometrusca* – 6,38 мг-екв/100 г маси сухої реч., водночас у *Didymodon tophaceus* цей показник сягав 11,59 мг-екв/100 г маси сухої реч. *Didymodon tophaceus* – кальцефіл і його чітка приуроченість до субстратів із високим вмістом катіонів Ca^{2+} значною мірою пов'язана з великою катіонообмінною ємністю клітинної стінки. Відомо, що у більшості кальцефільних видів бріофітів величина КОЄ у 3–5 разів перевищує аналогічний показник у інших видів мохів [11]. Поряд із цим, висока спорідненість катіонообмінних сайтів клітинної стінки рослин *Didymodon tophaceus* до іонів кальцію створює захисний бар'єр від проникнення у клітину токсичних концентрацій інших катіонів в умовах засолення. Нижчі показники КОЄ визначено в пагонах мохів на субстраті з меншим рівнем засолення – у *Bryum caespiticium* 4,01 мг-екв/100 г маси сухої реч., *Brachythecium campestre* – 3,14 мг-екв/100 г маси сухої реч.

Відомо, що на величину КОЄ впливають високі концентрації солей у середовищі. Наприклад, засолення субстрату зазвичай призводить до збільшення КОЄ, що регулюється ферментом метилпектинестеразою [25]. Цей фермент деметилує пектини і, таким чином, сприяє збільшенню КОЄ клітинних стінок. Його активність залежить від наявності поліамінів в апопласті, а отже, від азотного живлення рослин. Тому, використовуючи молекулярно-генетичні підходи до регулювання активності цього ферменту, можна впливати на катіонозв'язувальну здатність клітинних стінок [32].

Таким чином, аналізуючи літературу щодо впливу сольового стресу на мохоподібні, а також отримані результати, варто відзначити, що ця група рослин не має спеціалізованих механізмів пристосування до умов засолення. Взагалі, морська вода – це єдине середовище існування, яке не освоїли бріофіти. Але водночас вони поширені на прибережних скелях, де постійно зрошуються солоною водою (наприклад, *Schistidium maritimum* (Turner ex Scott, Robert) Bruch & Schimp). Деякі види мохів трапляються і на засоленних ґрунтах. Наприклад, *Enthostodon hungaricus* (Boros) Loeske росте на солончаках [26], *Henediella heimii* (Hedw.) R.H. Zander – на ділянках із мулистими засоленними ґрунтами [30]. Також відомо про формування бріофітних угруповань на засоленних субстратах. Наприклад, у Канаді в регіоні нафтоносних пісків на природних солоних болотах із підвищеною концентрацією солей Na сформувалися солестійкі угруповання рослин, до складу яких входять і бріофіти *Bryum pseudotriquetrum* (Hedw.) G. Gaertn., B. Mey. & Scherb., *Campylium stellatum* (Hedw.) C.E.O. Jensen і *Drepanocladus aduncus* (Hedw.) Warnst. [34]. Також показано, що такі види мохів як *Tomenthypnum nitens* (Hedw.) Loeske and *Sphagnum warnstorffii* Russow є толерантними до підвищених концентрацій натрію і трапляються на засоленних субстратах [16]. Однак, незважаючи на поширення мохоподібних в умовах засолення, у них немає еволюційно сформованих механізмів солестійкості, як, наприклад, у галофітів. Тобто, якщо адаптація судинних рослин до засоленості відбувалася шляхом формування спеціалізованих субклітинних, біохімічних і молекулярних механізмів солестійкості, то адаптація бріофітів до сольового стресу відбувалася за рахунок ефективного механізму стійкості до висушування, важливим критерієм якого (як і солестійкості) є здатність до осморегуляції, стабільність водного й осмотичного потенціалів рослинних клітин. Хоча серед мохоподібних задокументовано лише 210 стійких до висушування видів, однак припускають [18], що більшість наземних мохоподібних певною мірою є адаптованими до нестачі води. Це, очевидно, й зумовило їхню толерантність до різноманітних осмотичних стресів і значною мірою забезпечується наявністю у клітинах мохів високих концентрацій осмолітів і катіонообмінною здатністю клітинних стінок.

Приспособлення бріофітів до засолення субстрату на території хвостосховища Стебницького гірничо-хімічного підприємства «Полімінерал» забезпечується зміною спрямованості метаболічних процесів, яка проявляється у збільшенні загального вмісту карбогідратів і перерозподілі вуглеводного обміну в напрямі гідролізу полісахаридів і накопичення розчинних вуглеводів.

Зміна активності α -амілази у пагонах мохів є чутливим маркером сольового стресу. Підвищення амілазної активності призводить до збільшення пулу розчинних вуглеводів і посилення резистентності бріофітів до сольового стресу.

Катіонообмінна ємність клітинних стінок мохів має важливе значення у формуванні солестійкості бріофітів. Це величина непостійна, залежить від видових особливостей мохів та інтенсивності сольового стресу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Базилевич Н. И., Панкова Е. И.* Учет засоленных почв. Методические рекомендации по мелиорации солонцов и учету засоленных почв. М.: Колос, 1970. С. 80–112.
2. *Білоніжска П., Дяків В.* Хімічний та мінеральний склад відходів збагачення калійних руд Стебницького родовища та їхній вплив на довкілля // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. геол. 2009. Вип. 23. С. 162–174.
3. *ГОСТ 26424-85.* Почвы. Метод определения ионов карбоната и бикарбоната в водной вытяжке. Введен 1986-01-01. М.: Изд-во стандартов, 1985. 5 с.
4. *ГОСТ 26425-85.* Почвы. Методы определения иона хлорида в водной вытяжке. Введен 1986-01-01. М.: Изд-во стандартов, 1985. 9 с.
5. *ГОСТ 26426-85.* Почвы. Методы определения иона сульфата в водной вытяжке. Введен 1986-01-01. М.: Изд-во стандартов, 1985. 8 с.
6. *ГОСТ 26428-85.* Почвы. Методы определения кальция и магния в водной вытяжке. Введен 1986-01-01. М.: Изд-во стандартов, 1985. 8 с.
7. *Ісаєнков С. В.* Фізіологічні та молекулярні аспекти сольового стресу у рослин // Цитологія і генетика. 2012. № 5. С. 50–71.
8. *Карпець Ю. В., Колупаєв Ю. Е.* Ответ растения на гипертермию: молекулярно-клеточные процессы // Вісн. Харків. аграр. ун-ту. Сер. біол. 2009. Вип. 1. С. 19–39.
9. Практикум по агрохимии: учеб. пособ. 2-е изд., перераб. и доп. / под ред. В.Г. Минеева. М.: Изд-во МГУ, 2001. 689 с.
10. *Сабат І., Цайтлер М.* Відновлення фітоценозів на хвостосховищах Стебницького ДГХП «Полімінерал» // Acta Carpatica. 2014. № 12. С. 65–71.
11. *Bates J. W.* Quantitative Approaches in Bryophyte Ecology. In: Smith, A.J.E. (Ed.). Bryophyte Ecology. 1982, London: Chapman and Hall Ltd. P. 1–44.
12. *Bigot J., Binet P.* Study of the cation exchange capacity and selectivity of isolated roots cell walls from the of *Cochleria anglica* and *Phaseolus vulgaris* grown in media with different salinities // Can. J. Bot. 1986. N 64. P. 955–958.
13. *Blamey F. P. C.* Role of root cation-exchange capacity in differential aluminium tolerance of litus species // J. Plant Nutr. 1990. Vol. 13. N 6. P. 729–745.
14. *Chamuah G. S., Dev J. K.* Root cation exchange capacity in relation to nutrient uptake of rice // Indian Soc. Soil Sci. 1987. Vol. 35. P. 132–134.
15. *Garbary D.J., Miller A.G., Scrosati R.* et al. Distribution and salinity tolerance of intertidal mosses from Nova Scotia // Bryologist. 2008. N 111. P. 282–291.
16. *Gignac L. D., Vitt D. H.* Responses of northern peatlands to climate change: effects on bryophytes // J. Hattori Bot. Lab. 1994. N 75. P. 119–132.

17. *Glime J. M.* (2007 onwards). Bryophyte Ecology. Volume 1. Physiological Ecology. E-book sponsored by Michigan Technological University and the International Association of Bryologists. <http://www.bryoecol.mtu.edu/> (15.08.2015).
18. *Greenwood J. L., Stark L. R.* Rate of drying determines extent of desiccation tolerance in *Physomitrella patens* // *Funct. Plant Biol.* 2014. Vol. 41. P. 460–467.
19. *Haynes R. J.* Ion exchange properties of root and ionic interactions within the root apoplast: Their role in ion accumulation by plants // *Bot. Rev.* Vol. 45. P. 75–99.
20. *Meychik N. R., Nikolaeva J. I., Yermakov I. P.* Ion exchange properties of the root cell walls isolated from halophyte plants (*Suaeda altissima* L.) grown under conditions of different salinity // *Plant and Soil.* 2005. Vol. 277. N 1–2. P. 163–174.
21. *Munns R., Tester M.* Mechanisms of salinity tolerance // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2008. Vol. 59. P. 651–681.
22. *Nagao M., Minami A., Arakawa K.* et al. Rapid degradation of starch in chloroplasts and concomitant accumulation of soluble sugars associated with ABA-induced freezing tolerance in the moss *Physcomitrella patens* // *J. Plant Physiol.* 2005. N 162. P. 169–180.
23. *Oudjeriouat N., Moreau Y., Santimone M.* et al. On the mechanism of α -amylase // *Eur. J. Biochem.* 2003. Vol. 270. P. 3871–3879.
24. *Peng C. A., Oliver M. J., Wood A. J.* Is the rehydrin TrDr3 from *Tortula ruralis* associated with tolerance to cold, salinity and reduced pH? Physiological evaluation of the TrDr3-orthologue, HdeD from *Escherichia coli* in response to abiotic stress // *Plant Biol.* 2005. N 7. P. 315–320.
25. *Pilling J., Willmitzer L., Fisahn J.* Expression of a *Petunia inflata* pectin methyl esterase in *Solanum tuberosum* L. enhances stem elongation and modifies cation distribution // *Planta.* 2000. Vol. 210. P. 391–399.
26. *Pisarenko O. Yu., Ignatova E. A., Ignatov M. S.* *Entosthodon hungaricus* (Boros) Loeske (Funariaceae, Musci) in Altai territory, South Siberia // *Arctoa.* 2001. N 10. P. 97–102.
27. *Phillips J., Oliver M., Bartels D.* Molecular genetics of desiccation-tolerant systems. In: M. Black and H.W. Pritchard (eds.). *Desiccation and survival in plants: Drying without dying.* Wallingford: CABI Publishing, 2002. P. 319–341.
28. *Pouliot R., Rochefort L., Graf M.* Impacts of oil sands process water on fen plants: Implication for plant selection in required reclamation projects // *Environmental Pollution.* 2012. N 167. P. 132–137.
29. *Rolland F., Sheen J.* Sugar sensing and signalling networks in plant // *Biochem. Soc. Trans.* 2005. Vol. 33. P. 269–271.
30. *Sabovljević M., Sabovljević A.* Contribution to the coastal bryophytes of the Northern Mediterranean: Are there halophytes among bryophytes? // *Phytol. Balc.* 2007. Vol. 13. N 2. P. 131–135.
31. *Sadasivam S., Manickam A.* *Biochemical methods.* New Delhi: New Age International, 2007. 284 pp.
32. *Serrano R., Culiñán-Maciá A., Moreno V.* Genetic engineering of salt and drought tolerance with yeast regulatory genes // *Scientia Horticulture.* 1999. N 78. P. 261–269.
33. *Stassart J. M., Neirinckx L., Dejaegere R.* The interactions between monovalent cations during their adsorption on isolated cell walls and adsorption by intact barley roots // *Ann. Bot.* 1981. Vol. 47. N 5. P. 647–652.
34. *Trites M., Bayley S. E.* Vegetation communities in continental boreal wetlands along a salinity gradient. Implications for oil sands mining reclamation // *Aquatic Bot.* 2009. Vol. 91. P. 27–39.

35. Wang X., Liu Zh., He Y. Responses and tolerance to salt stress in bryophytes // *Plant Signal. Behav.* 2008. Vol. 3. N 8. P. 516–518.
36. Zhu J. K. Salt and drought stress signal transduction in plants // *Ann. Rev. Plant Biol.* 2002. 53. P. 247–273.

Стаття: надійшла до редакції 26.04.17

доопрацьована 19.06.17

прийнята до друку 22.06.17

MECHANISMS OF ADAPTATION OF BRYOPHYTES TO SALT STRESS ON THE TERRITORY OF TAILING OF STEBNYK MINING AND CHEMICAL ENTERPRISE “POLIMINERAL”

N. Kyiak¹, L. Bunio²

¹*Institute of Ecology of the Carpathians, NAS of Ukraine
11, Stefanyk St., Lviv 79000, Ukraine
e-mail: kyyak_n@i.ua*

²*Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskyyi St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: bioza@ukr.net*

Peculiarities of carbohydrate metabolism and cation exchange capacity of the cell walls of mosses *Barbula unguiculata* Hedw., *Funaria hygrometrica* Hedw., *Didymodon tophaceus* (Brid.) Lisa, *Bryum caespiticium* Hedw. and *Brachythecium campestre* (Müll. Hal.) Schimp. depending on the substrate salinity on the territory of tailing waste mining potassium salt of Stebnyk Mining and Chemical Enterprise «Polimineral» were investigated. Chemical ionic composition of water extracts of the substrate samples taken from the tailing was defined. Sulfate type of salinity was established. It was shown that bryophyte adaptation to substrate salinity provided by the change of direction of the metabolic processes, which manifested in an increase of the total carbohydrate content and reconstruction of the carbohydrate metabolism in the direction of polysaccharides hydrolysis and accumulation of soluble carbohydrates. It was indicated that change of the α -amylase activity in mosses shoots is a sensitive marker of salt stress. Rise of the α -amylase activity leads to increase of the soluble carbohydrates pool and strengthening of the bryophyte resistance to salt stress. It was established that cation exchange capacity of the moss cell walls is determinative in salt resistance formation. It is unstable value and depends on the species peculiarities of the mosses and salt stress intensity.

Keywords: salt contamination, metabolism of carbohydrates, amylase, cation exchange capacity, tailing, bryophytes

МОРФОЛОГІЧНА ІНТЕГРОВАНІСТЬ РЕПРЕЗЕНТАТИВНИХ АВТОХТОННИХ РАРИТЕТНИХ ХАМЕФІТІВ УКРАЇНСЬКОГО ПОЛІССЯ

М. Шерстюк

Гетьманський національний природний парк
вул. Миру, 6, Тростянець 42600, Україна
e-mail: maryna_skljar@ukr.net

Для трьох репрезентативних видів автохтонних раритетних хамефітів Українського Полісся (*Ledum palustre* L., *Chimaphila umbellata* (L.) W. Barton та *Oxycoccus palustris* Pers) здійснена оцінка морфологічної інтегрованості (цілісності) рослин, яка, зокрема, ґрунтувалася на вивченні кореляційних взаємозв'язків між морфопараметрами. У роботі запропоновано чотири показники, за якими для різних видів здійснено порівняльний аналіз кореляційних дендритів і плеяд, сформованих досліджуваними морфопараметрами. Результати проведеного на основі цих показників аналізу засвідчили, що *Ledum palustre* за рівнем морфологічної інтегрованості поступається *Chimaphila umbellata* та *Oxycoccus palustris*. Оцінка морфологічної цілісності рослин доповнювалася визначенням і порівнянням значень двох індексів: індексу морфологічної інтеграції та його модифікованого варіанта. Встановлено, що у досліджуваних видів значення цих індексів коливаються в межах 60,95–78,7 % та 0,84–1,09, відповідно. У підсумку за результатами кореляційного аналізу та величинами індексів доведено, що ступінь морфологічної інтегрованості рослин досліджуваних видів зростає в такій послідовності: *Ledum palustre* → *Chimaphila umbellata* → *Oxycoccus palustris*.

Ключові слова: морфоструктурна інтегрованість, морфометричний аналіз, кореляційний аналіз, *Ledum palustre* L., *Chimaphila umbellata* (L.) W. Barton, *Oxycoccus palustris* Pers

Важливим показником стану будь-якої особини рослини є рівень її морфоструктурної та фізіологічної інтегрованості – цілісності. Наявні наукові факти свідчать, що у рослин її рівень істотно варіює залежно від умов росту [13]. Часто за стресових чинників у рослин інтегрованість морфологічної структури зменшується [8, 10, 14]. Має місце і протилежний процес, коли при наростанні стресів вона збільшується [2, 12]. Для низки видів встановлено, що рівень морфоструктурної цілісності їхніх особин закономірно змінюється уздовж градієнта наростання стресу. У такому разі морфологічна цілісність у деяких рослин спочатку знижується, а потім – зростає [8, 11]. Ці факти свідчать, що питання морфологічної інтегрованості рослин не належить до числа остаточно з'ясованих і тому дослідження в цьому напрямі тривають. Зокрема, значну увагу йому приділяють у роботах із вивчення популяцій [4–7]. Вважаємо, що проведення оцінки морфологічної інтегрованості є доцільним для видів, які репрезентують раритетну складову фіторізноманіття певного регіону, наприклад, належать до місцевих видів, які мають офіційний статус відповідних рангів охорони (міжнародний, загальнодержавний і регіональний) [3]. Ступінь морфоструктурної цілісності рослин може виступати одним із провідних показників, які беруться до уваги під час розробки заходів із їхньої охорони чи формування фітоценокомпозицій.

Провідним методом оцінки цілісності рослини є вивчення кореляції між ознаками на основі визначення коефіцієнта парної кореляції та формування кореляційної матриці [6]. Однак традиційні підходи, що застосовуються для оцінки морфоструктурної інтегрованості рослин, здебільшого є ефективними для оцінки типового рівня інтеграції у осо-

бин, які ростуть в оптимальних екоумовах. На сьогодні актуальною науковою проблемою є вдосконалення наявних підходів, яке дало би змогу не тільки ґрунтовніше досліджувати питання морфологічної цілісності рослин, а й вивчати і порівнювати цю характеристику у рослин різних видів.

Матеріали та методи

Дослідженням було охоплено три репрезентативні види автохтонних раритетних хамефітів Українського Полісся: *Ledum palustre* L., *Chimaphila umbellata* (L.) W. Barton та *Oxycoccus palustris* Pers. Кожен із них має офіційний статус охорони у тій чи іншій адміністративній області, розташованій у межах Українського Полісся [1]. У цих рослин визначено величини, відповідно, 21, 17 та 20 морфопараметрів. Оцінювали значення як статичних метричних (табл. 1), так і статичних алометричних величин (табл. 2).

Використовуючи традиційні підходи щодо оцінки морфологічної інтегрованості, для *Ledum palustre*, *Chimaphila umbellata* та *Oxycoccus palustris* детально проаналізували кореляційні взаємозв'язки між морфопараметрами, що характеризують стан рослин цих видів. За результатами кореляційного аналізу побудовано кореляційні дендрити і виділено плеяди.

Таблиця 1

Перелік використаних статичних метричних морфопараметрів для досліджених видів

Назва морфопараметра	Умовні позначення	Одиниця виміру
Загальна маса рослини	W	г
Загальна маса вегетативних органів	Wveg	г
Загальна фітомаса листків	WL	г
Фітомаса стебла	Wst	г
Фітомаса одного листка	W1L	г
Загальна площа поверхні листків	A	см ²
Площа одного листка	A1L	см ²
Загальна кількість листків	NL	шт.
Кількість бічних пагонів першого порядку	B	шт.
Кількість бічних пагонів другого порядку	B2	шт.
Висота рослини	H	см
Довжина верхівкового пагона	L	см
Діаметр стебла	D	см
Загальна маса репродуктивних органів	Wgen	г
Маса одного суцвіття або супліддя	Wgen1	г
Загальна кількість генеративних органів	Ngen	шт.

Примітка. Тут і в табл. 2 умовні позначення та розрахункові формули подані за Ю.А. Злобіним [4], І.В. Кармановою [9] та Р. Хантом [15], а також із доповненнями автора

Таблиця 2

Перелік використаних статичних алометричних морфопараметрів для досліджуваних видів

Назва морфопараметра	Умовні позначення та розрахункові формули морфопараметрів	Одиниця виміру
Площа листків на одиницю фітомаси	$LAR = A / W$	см ² /г
Фотосинтетичне зусилля	$LWR = WL / W$	г/г
Відносний приріст	$HWR = H / W$	см/г
Відношення загальної площі листків до діаметра стебла	$ADR = A / D$	см ² /мм
Співвідношення між висотою рослини та діаметром стебла	$HDR = H / D$	см/см
Репродуктивне зусилля	$RE1 = (Wgen / W) \times 100$ $RE2 = (Wgen / A) \times 100$	%
Кількість бічних пагонів першого порядку на одиницю висоти	$Bh = B / H$	шт./см
Кількість бічних пагонів першого порядку на одиницю довжини верхівкового пагона	$BL = B / L$	шт./см

Для оцінки морфологічної цілісності рослин також було використано запропонований Ю.А. Злобіним індекс морфологічної інтеграції (цілісності) [4]. Його розраховували за формулою:

$$I = \frac{B}{(n^2 - n) / 2} \cdot 100\%$$

де I – індекс морфологічної інтеграції, тобто цілісності особини; B – кількість у матриці статистично достовірних (на рівні ймовірності 0,95) коефіцієнтів кореляції; n – загальна кількість оцінених морфометричних параметрів.

Окрім того, під час дослідження морфоструктурної інтегрованості особин використовували ще й такий оригінальний показник – модифікований індекс морфологічної інтеграції (I_m). Цей показник був успішно апробований під час оцінки морфологічної цілісності рослин трьох контрастних біоморф: *Ledum palustre*, *Nymphoides peltata* (S.G. Gmel.) O. Kuntze, а також дрібного підросту *Pinus sylvestris* L. [16]. Його розраховували так:

$$I_m = \frac{1B \leq 0,5 + 2B > 0,5 \dots < 0,8 + 3B \geq 0,8}{(n^2 - n) / 2}$$

де I_m – модифікований індекс морфологічної інтеграції; $B \leq 0,5$ – кількість у матриці статистично достовірних (на рівні ймовірності 0,95) коефіцієнтів кореляції, значення яких за модулем перебувають у діапазоні від 0 до 0,5 включно; $B > 0,5 \dots < 0,8$ – кількість у матриці статистично достовірних (на рівні ймовірності 0,95) коефіцієнтів кореляції, значення яких за модулем є більшими за 0,5 і меншими за 0,8; $B \geq 0,8$ – кількість у матриці статистично достовірних (на рівні ймовірності 0,95) коефіцієнтів кореляції, значення яких за модулем дорівнюють або є більшими за 0,8; n – загальна кількість оцінених морфометричних параметрів.

Результати і їхнє обговорення

За результатами кореляційного аналізу для *Ledum palustre* було виділено три плеяди, а для *Chimaphila umbellata* та *Oxycoccus palustris* – по чотири (рис. 1–3). У *Ledum palustre* вони сформовані на рівні кореляційного зв'язку $r=0,80$ і вище, а у *Chimaphila umbellata* і *Oxycoccus palustris* при $r=0,85$ і вище.

Вважаємо, що при дослідженні морфоструктурної цілісності особин рослин необхідно не тільки здійснювати загальний аналіз значень коефіцієнтів кореляції, а й проводити комплексну оцінку низки показників, які деталізують кореляційні взаємозв'язки між морфопараметрами та провідні характеристики кореляційних дендритів і плеяд (табл. 3). Також вважаємо за доцільне визначати такий оригінальний показник, як частка морфопараметрів у плеядах (*The share of morphoparametrs in the pleiades* – SMP), який представляє виражену у відсотках частку кількості морфопараметрів, що увійшли до складу кореляційних плеяд (N_{ple}), від загальної кількості врахованих морфопараметрів (N_{total}):

$$\text{Частка морфопараметрів у плеядах (SMP)} = (N_{ple} / N_{total}) \times 100 \%$$

Таблиця 3

Комплекс ознак кореляційних дендритів і плеяд досліджених видів

№ з/п	Ознака та її одиниці виміру	Види рослин		
		<i>Ledum palustre</i>	<i>Chimaphila umbellata</i>	<i>Oxycoccus palustris</i>
1	Значення коефіцієнта парної кореляції, на рівні якого виділено кореляційні плеяди	0,8	0,85	0,85
2	Кількість кореляційних плеяд у складі кореляційного дендриту, шт.	3	4	4
3	Середня кількість морфопараметрів у складі плеяди, шт.	3	2,3	2,5
4	Частка морфопараметрів у плеядах (SMP), %	42,9	52,9	50,0

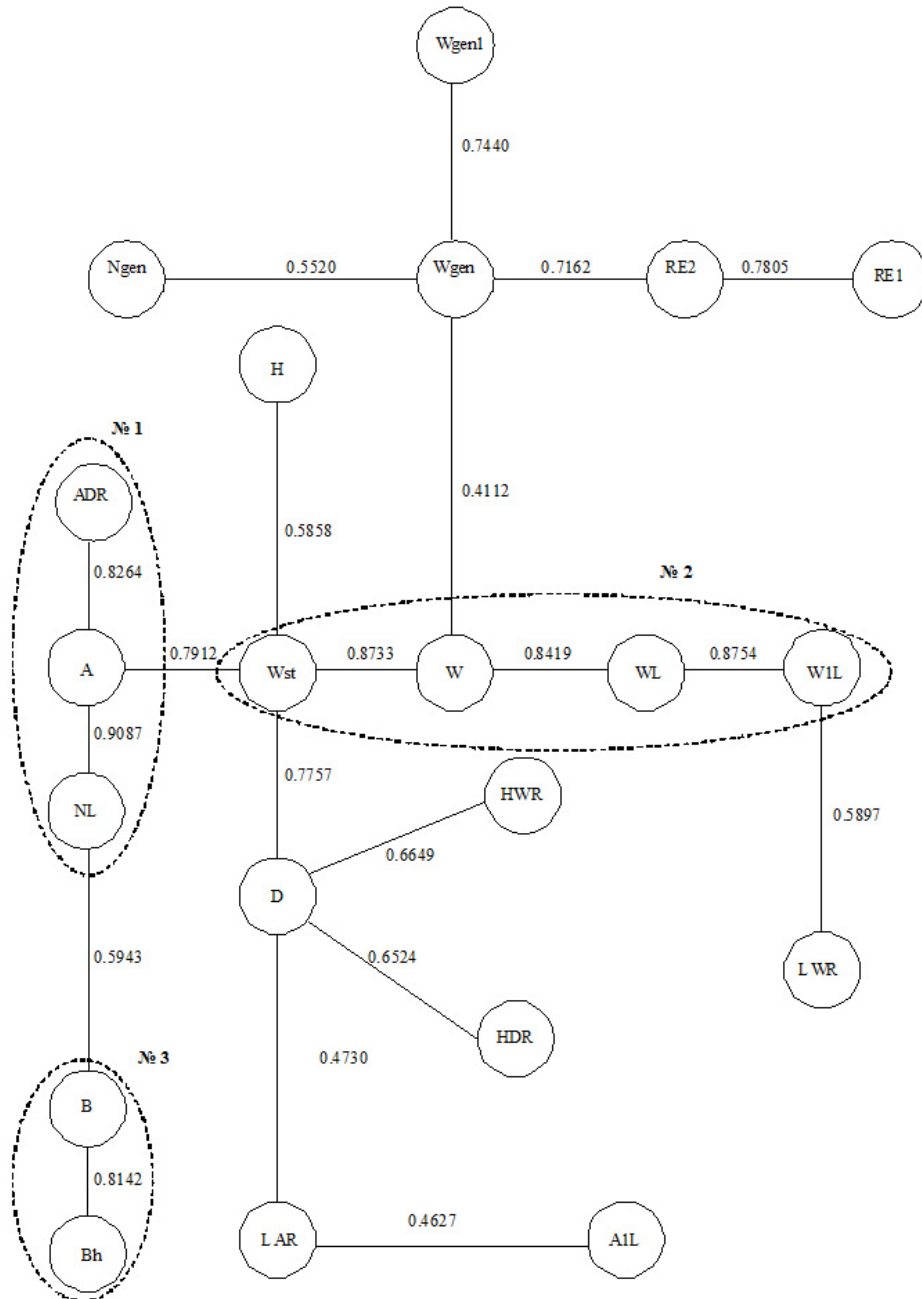


Рис. 1. Кореляційний дендрит і плеяди морфопараметрів рослин *Ledum palustre*. Тут і на рис. 2, 3 використано такі позначення: (W) морфопараметр і його умовне позначення відповідно до табл. 1, 2; пунктирним контуром окреслено морфопараметри, що увійшли до складу певної плеяди, позначеної відповідним номером; 0,7709 та інші – значення коефіцієнта парної кореляції Пірсона (r)

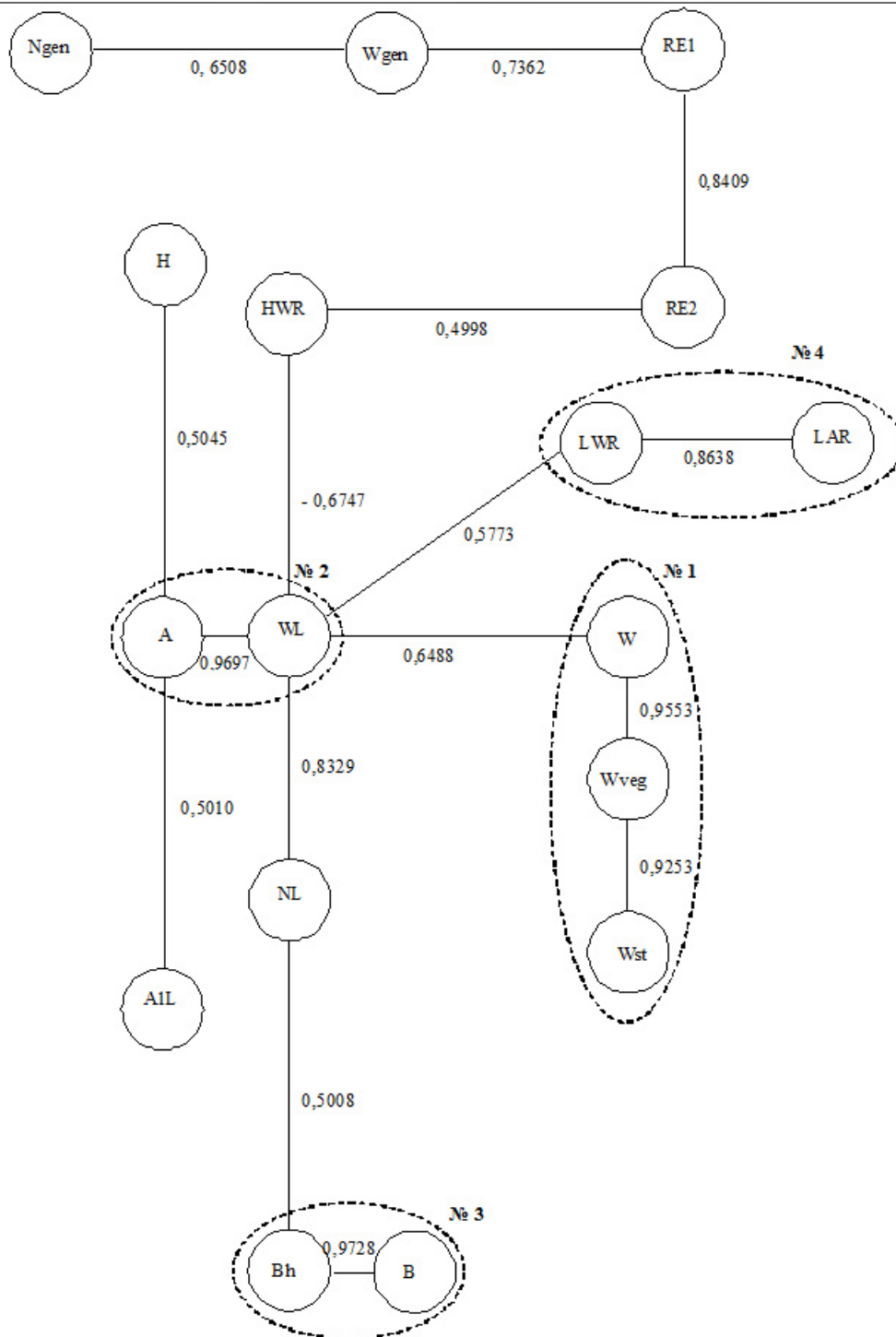


Рис. 2. Кореляційний дендрит і плеяди морфопараметрів рослин *Chimaphila umbellata*

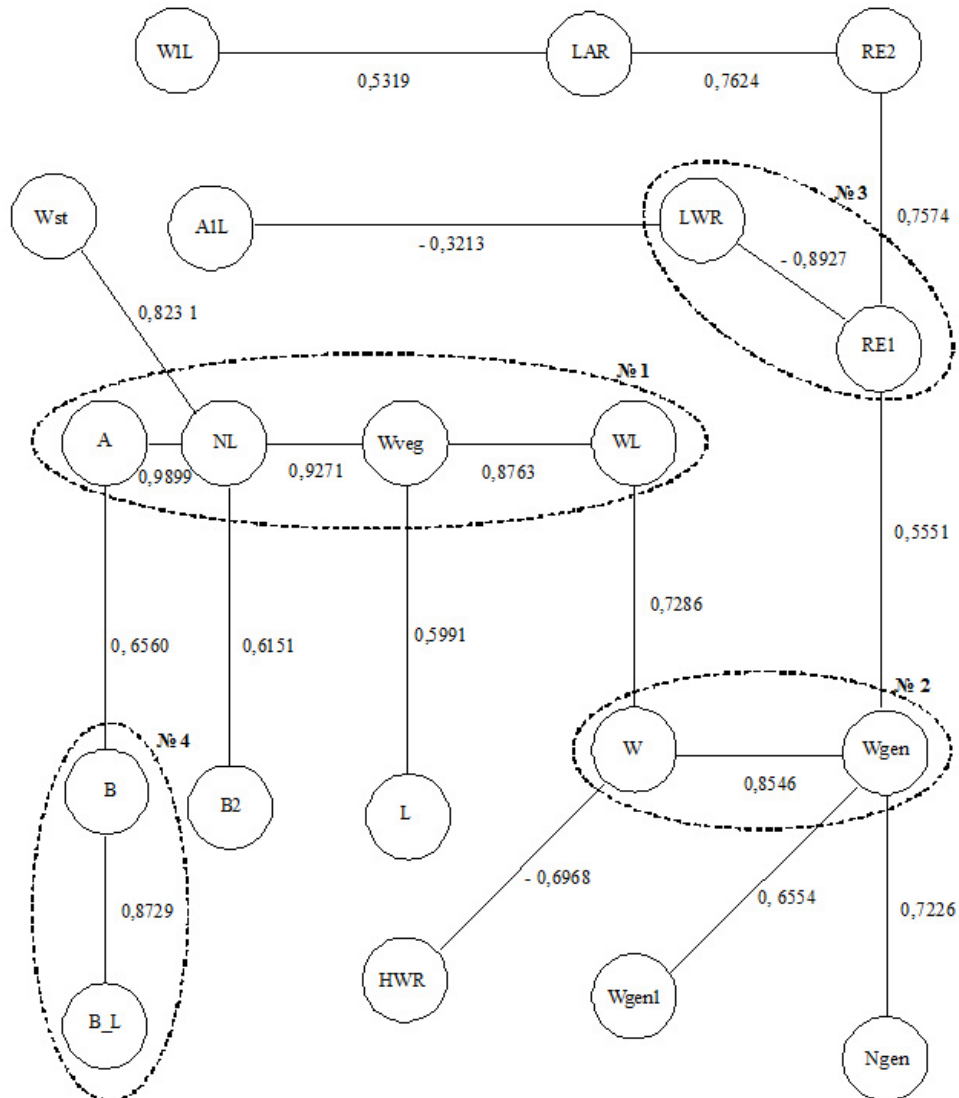


Рис. 3. Кореляційний дендрит і плеяди морфопараметрів рослин *Oxycoccus palustris*

Значення комплексу ознак кореляційних дендритів і плеяд свідчать, що *Chimaphila umbellata* та *Oxycoccus palustris* проявляють значну подібність за рівнем морфоструктурної інтегрованості, тоді як *Ledum palustre* за цією ознакою трохи поступається їм. Зокрема, у *Ledum palustre* кореляційні плеяди виокремлюються на нижчих показниках коефіцієнта кореляції (0,80 проти 0,85 у *Chimaphila umbellata* та *Oxycoccus palustris*). При цьому досліджувані морфопараметри *Ledum palustre* формують і меншу кількість кореляційних плеяд (три проти чотирьох), якими охоплюється і менший відсоток розмірних значень (42,9 % проти 50,0–52,9 %).

Визначення індексу морфологічної цілісності рослин на основі підходів Ю.А. Злобіна є доцільним та інформативним. Він дає змогу кількісно оцінити й охарактеризувати

ступінь морфологічної інтегрованості рослин того чи іншого виду. Однак запропонований цим вченим індекс не враховує того, що статистично достовірні коефіцієнти кореляції можуть суттєво відрізнятися за своїм значенням. Тому, власне, спираючись на розроблений Ю.А. Злобіним показник, запропонували для встановлення морфоструктурної інтегрованості особин застосувати ще й модифікований індекс морфологічної інтеграції. Він передбачає не тільки виявлення в матриці статистично достовірних (на рівні ймовірності 0,95) кореляцій, а й їхню диференціацію на три градації, кожній із яких відповідає свій (від 1 до 3) ваговий коефіцієнт. Вважаємо, що спільне використання індексу морфологічної інтеграції (цілісності) Ю.А. Злобіна та його модифікованого варіанта розкриває можливості для глибшого та ґрунтовнішого аналізу морфоструктурної інтегрованості рослин (табл. 4).

Таблиця 4

Результати оцінки морфологічної цілісності рослин досліджуваних видів на основі визначення індексів морфологічної інтеграції

№ з/п	Показник	Види рослин		
		<i>Ledum palustre</i>	<i>Chimaphila umbellata</i>	<i>Oxycoccus palustris</i>
1	Індекс морфологічної інтеграції (цілісності) Ю.А. Злобіна (<i>I</i>)	60,95 %	68,4 %	78,7 %
2	Індекс морфологічної інтеграції (цілісності) модифікований (<i>Im</i>)	0,84	1,03	1,09

Отже, запропонована методика дає змогу на основі комплексу ознак здійснити об'єктивну кількісну оцінку морфологічної інтегрованості рослин різних видів. Завдяки їй застосуванню доведено, що досліджувані автохтонні раритетні хамафіти в порядку збільшення морфологічної інтегрованості становлять таку послідовність: *Ledum palustre* → *Chimaphila umbellata* → *Oxycoccus palustris*. Вважаємо, що рослини видів із вищим ступенем морфологічної цілісності своїми змінами розміру й архітеконики будуть активніше та комплексно реагувати на поліпшення і погіршення умов місцезростань. Зазначена особливість може суттєво впливати на стійкість існування рослин відповідних видів як у природних угрупованнях, так і у складі штучних фітоценокомпозицій.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Андрієнко Т. Л., Перегрим М. М. Офіційні переліки регіонально рідкісних рослин адміністративних територій України. К., 2012. 148 с.
2. Веселкова Н. Р. Особенности морфогенеза *Dactylis glomerata* L. на территории Удмуртской республики // Популяційна екологія рослин: сучасний стан, точки росту. Суми: СНАУ, 2012. С. 310–314.
3. Дендрозологічний каталог природно-заповідного фонду Лісостепу України / [під ред. С.Ю. Поповича]. К.: Аграр Медіа Груп, 2011. 800 с.
4. Злобин Ю. А. Принципы и методы изучения ценотических популяций растений. Казань: Изд-во Казанск. ун-та. 1989. 146 с.
5. Злобин Ю. А. Популяционная экология растений: современное состояние, точки роста. Суми: Університетська книга, 2009. 263 с.
6. Злобин Ю. А., Скляр В. Г., Клименко А. О. Популяции редких видов растений: теоретические основы и методика изучения. Суми: Університетська книга, 2013. 439 с.
7. Ишмуратова М. М., Ишибирдин А. Р. Об онтогенетических тактиках *Rhodiola iremelica* // Фундаментальные и прикладные проблемы популяционной биологии. Нижний Тагил, 2002. С. 79–81.
8. Ишмуратова М. М., Суюндуков И. В., Ишибирдин А. Р., Журнова Т. В. Состояние ценопопуляций некоторых видов семейства *Orchidaceae* на Южном Урале. Сообщение 1.

- Виды со стеблекорневыми тубероидами // Растит. ресурсы. 2003. Т. 39. № 2. С. 1–17.
9. Карманова И. В. Математические методы изучения роста и продуктивности растений. М.: Наука, 1976. 222 с.
 10. Кричфалуший В. В., Мезев-Кричфалуший Г. М. Популяційна біологія рослин. Ужгород, 1994. 80 с.
 11. Пушкарева О. В. Стратегия жизни *Epipactis helleborine* (L.) Crantz. // Изв. Самарск. науч. центра РАН. 2011. Т. 13. № 5 (2). С. 103–105.
 12. Ростова Н. С. Корреляции: структура и изменчивость. СПб.: Изд-во СПб ун-та, 2002. 308 с.
 13. Синская Е. Н. Об уровнях группового приспособления в растительных популяциях // Проблема популяций у высших растений. Л.: ВИР, 1961. С. 54–69.
 14. Тихонова И. В., Шемберг М. А. Сопряженная изменчивость морфологических признаков сосны обыкновенной на юге Средней Сибири // Лесоведение. 2004. № 1. С. 48–55.
 15. Hunt R. Plant growth analysis. London: Arnold, 1978. 67 p.
 16. Skliar V., Sherstuk M., Skliar Iu. Algorithm of comprehensive assessment of individual's morphological integration of plants contrast biomorfs // QUAERE 2016 (vol. VI.), Interdisciplinary Scientific Conference for PhD students and assistance (May 23, 2016 – May 27, 2016). Praha, 2016. P. 393–403.

Стаття: надійшла до редакції 13.02.17

доопрацьована 28.07.17

прийнята до друку 11.09.17

MORPHOLOGICAL INTEGRATIONS OF ECOREPRESENTATIVE AUTOCHTHONOUS RARE HAMEPHITS OF UKRAINIAN POLISSYA

M. Sherstiuk

*Getmanski National Natural Park
6, Miru St., Trostyanets 42600, Ukraine
e-mail: maryna_skliar@ukr.net*

For the three representative species of autochthonous rare hamephits of Ukrainian Polissya (*Ledum palustre* L., *Chimaphila umbellata* (L.) W. Barton and *Oxycoccus palustris* Pers) assessed morphological integrity of the plant. It was based on a comprehensive analysis of correlations between morphoparameters. There are four indicators in the paper, by which had been done comparative analysis of correlation dendrites and pleiades, formed by this morphoparameters, for the different species. The results of the analysis based on these indicators showed that *Ledum palustre* concedes to *Chimaphila umbellata* and *Oxycoccus palustris* by the level of morphological integration. Evaluation of plants' morphological integrity had supplemented by definition and comparing values of two indices: the index of morphological integration and its modified version. Found that the studied species significance of these indices are within 60,95–78,7 % and 0,84–1,09, respectively. Eventually, the results of the correlation analysis and the values of these indices shown that the degree of plants' morphological integrity of studied species, grows in the following sequence: *Ledum palustre* → *Chimaphila umbellata* → *Oxycoccus palustris*.

Keywords: morphostructure integrity, morphometric analysis, correlation analysis, *Ledum palustre* L., *Chimaphila umbellata* (L.) W. Barton, *Oxycoccus palustris* Pers

ЖИТТЄВІСТЬ ДЕРЕВНИХ РОСЛИН (ВИЗНАЧЕННЯ, КРИТЕРІЇ ТА ОЦІНКА)

О. М. Горелов, О. О. Горелов

*Національний ботанічний сад імені М.М. Гришка НАН України
вул. Тімірязєвська, 1, Київ 01014, Україна
e-mail: alexgorelov@rambler.ru*

Аналіз літературних джерел свідчить про відсутність єдиного тлумачення визначення життєвого стану рослин. Зазвичай для цього використовують терміни „життєвість” і „життєздатність”, які не є тотожними. Для визначення поточного стану рослини доцільно користуватися термінами „життєвість” або „віталітет”, а для прогностичної оцінки потенційного життєвого стану – „життєздатність”. Пропонується система визначення життєвості деревних рослин, яка ґрунтується на комплексі морфометричних (поточний приріст пагонів, ступінь облистяності, стан фундаментального та конструктивного модуля), репродуктивних (рясність плодоношення та/або цвітіння) та фенологічних (повнота, послідовність і тривалість фенофаз) ознак. Загалом рівень життєвості визначається за трьома категоріями: високий, середній і низький. Для деталізованої кількісної оцінки віталітету рослини запропоновано 6-бальну шкалу. За відсутності однозначного визначення за кожним комплексом ознак життєвість можна оцінювати проміжним балом. Ця шкала дає змогу отримати інтегральну оцінку віталітету рослини за ознаками, які легко визначити візуально в польових умовах і які не потребують лабораторних досліджень.

Ключові слова: життєвість, життєздатність, деревні рослини, інтегральна оцінка

Серед численних дисциплін фітології важко виокремити як теоретичні, так і практичні напрями, які б не стосувалися тих чи інших аспектів визначення життєвості рослин. Розвиток уявлень про складність процесів, які відбуваються у рослинному організмі, вдосконалення методів вивчення та розробка методологічних засад досліджень на рівні як окремих особин, так і популяцій потребує поглиблення та конкретизації таких понять як життєвість, життєздатність, життєвий стан, віталітет тощо.

Незважаючи на досить значну кількість наукових публікацій, де розглядаються ці поняття, багато в чому дана проблема залишається не вирішеною навіть на рівні тлумачення термінів [5, 8] і розуміння їхнього біолого-екологічного змісту [6]. Теоретичні засади та методичні підходи щодо визначення життєвості як окремих рослин, так і ценопопуляцій найґрунтовніше були опрацьовані у 70–80-ті роки Л.А. Жуковою, Л.Б. Заугольною, В.Н. Єгоровою, Л.І. Воронцовою, Л.Є. Гатцук, І.М. Єрмаковою і О.В. Смирною [15] та набули подальшого розвитку в низці пізніших досліджень. У роботах цих дослідників було узагальнено поняття життєвості як показника стану особини та популяції, котрий характеризується якісними параметрами розвитку й кількісними параметрами росту [1, 11, 16]. Для особин такими показниками зазвичай є морфометричні ознаки вегетативної та репродуктивної сфери (висота, діаметр, лінійні розміри рослини, пагона, листка, плоду, насіння), фітомаса рослин або окремих їхніх частин, ступінь облистяності, насінна продуктивність тощо, які обліковуються і порівнюються для індивідуумів одного вікового стану, – переважно у середньовікових генеративних особин [11, 21]. Кількість таких тільки морфометричних параметрів в окремих дослідженнях могла становити кілька десятків [18],

що значно утруднює як проведення самих спостережень, так і інтерпретацію та порівняння результатів. Також слід констатувати невизначеність і використання як синонімів термінів *життєвість* і *життєздатність* [16], котрі, на нашу думку, мають різні значення.

Г.Г. Жиляев під *життєвістю* рослин (рос. *жизненностью*) розуміє «дискретний і необратимий інтегральний признак, характеризующий потенциал особи к развитию, а *жизненное состояние* – как континуум частично обратимой изменчивости их индивидуальных габитуальных и ритмологических признаков, рассматриваемых в конкретных условиях» [7, с. 886].

Ю.А. Злобин дає досить широке трактування *життєздатності* (рос. *жизнеспособности*) рослини, включаючи в це поняття «и уровень продукционного процесса, и темпы роста, и активность ферментативных систем, и соотношение фотосинтеза с дыхательным процессом, и способность к размножению, и многое-многое другое» [8, с. 127], а під *віталітетом* рослин слід розуміти «их жизненное состояние, оцениваемое на основании учета особенностей формы и роста особей растений. В этом смысле виталитет является морфоструктурным выражением жизненного состояния растений» [8 с. 128].

В.Г. Кияк, визначаючи ці поняття для популяцій рослин, вважає, що під *життєвістю* (*віталітетом*) слід розуміти інтегральну характеристику, яка відображає поточний стан популяції на основі індивідуальних і групових параметрів структури, росту, розвитку та репродукції. Якщо життєвість є динамічною ознакою, то *життєздатність*, навпаки, є порівняно стабільною, статичною ознакою [11].

Навіть цей короткий огляд досить наочно свідчить про відсутність єдиного тлумачення зазначених термінів. Виходячи з поширених у англійській літературі термінів, «*vitability*», на нашу думку, найточніше відповідає термінові «*життєвість*», а «*vitability*», відповідно, – термінові «*життєздатність*». Отже, термін «*життєвість*», або «*віталітет*» доцільно використовувати для оцінки поточного життєвого стану рослини, тоді як «*життєздатність*» слід застосовувати більше для характеристики потенційної здатності рослини за порівняно тривалий проміжок часу. Таке тлумачення даних термінів узгоджується з їхнім розумінням В.Г. Кияком [11]. Враховуючи те, що термін „*віталітет*” уже набув досить широкого застосування у біологічній літературі [1, 8, 9, 11, 16 та ін.], ми вважаємо правомірним його використання як синоніма *життєвості*.

Також слід наголосити на відмінності у використанні цих термінів для окремих особин чи груп рослин і для популяцій як якісно різних рівнів організації живої матерії. Із цих позицій окрема рослина розглядається як елементарна структурна одиниця рослинного покриву, життєвість якої оцінюється певними морфометричними, репродуктивними й іншими ознаками. На цих характеристиках ґрунтується оцінка життєвості якісно іншого рівня організації рослинного покриву – популяційного, що потребує залучення таких показників як щільність популяції, віковий і онтогенетичний спектри тощо. Стосовно окремих груп рослин (наприклад, вуличні насадження, плодові та лісові культури тощо), до яких неможливо повною мірою застосувати термін „*популяція*”, використання окремих характеристик популяційного рівня (щільність, віталітетна і стативна структура та ін.) є цілком можливим. Обстеження вуличних насаджень м. Києва, проведені у 2016 р., показали доцільність такого підходу в дослідженнях урбоекосистем [3].

Оскільки визначення показників життєвості для популяцій або певних груп рослин базується на характеристиках окремих рослин, у даній роботі мова йтиме про оцінку життєвого стану саме особин, тобто на рівні рослинного організму. Важливим методичним питанням залишається вибір параметрів, які б найточніше характеризували життєвість рослини. Ці показники мають достатньо повно відображати особливості росту

й розвитку, репродуктивну здатність і адаптаційний потенціал, враховувати специфіку онтогенетичного та сезонного розвитку, екологічні (зокрема, погодно-кліматичні) умови, реакцію рослин на вплив інших чинників. Певну відмінність також мають дослідження одно-, дво- та багаторічних рослин і рослин різних життєвих форм.

Цінність тих чи інших критеріїв оцінки життєвості значною мірою зумовлюється спрямованістю досліджень. Так, для характеристики популяцій великого значення набувають співвідношення рослин різного віталітету й онтогенетичного стану, у лісівництві важливими показниками є приріст дерев і темпи накопичення запасу деревини, у плодовництві – врожайність, в озелененні – можливість зберігати декоративність і стійкість до умов антропогенно трансформованого середовища, у фітомеліорації – здатність ефективно і достатньо довго виконувати захисні функції тощо.

Оскільки життєвість рослини значною мірою зумовлюється впливом оточуючого середовища, то певну специфіку вносить прояв реакції рослини на той чи інший екологічний чинник (морозо-, зимо-, посухо- та солестійкість, стійкість до техногенного забруднення, шкідників і хвороб тощо). На цьому ґрунтуються, наприклад, апробовані методики оцінки зимостійкості С.Я. Соколова [19] та М.К. Вехова [2], посухостійкості С.С. П'ятницького [17], газостійкості В.П. Тарабріна, Є.Н. Кондратюка, В.Г. Башкатова [20] та ін. Дані шкали передбачають бальну оцінку життєвого стану рослини за візуальними пошкодженнями внаслідок дії якогось негативного чинника. Власне, ці шкали можна вважати системами оцінки життєвості як такої досить умовно, оскільки вони фіксують лише наслідок дії певного патогенного фактора, опосередковано пов'язуючи його з поточним життєвим станом рослини. Для оцінки життєвості й життєздатності у популяційних та інтродукційних дослідженнях поширення набули шкали Браун-Бланке [16], рівня адаптації видів О.А. Калініченка [10], оцінки інтродукції деревних рослин П.І. Лапіна та Л.В. Сідневої [13], ступенів успішності інтродукції М.А. Кохна та О.М. Курдюка [12] тощо. Ці системи оцінки є комплексними та відображають життєвість рослин, ґрунтуючись на їхніх морфологічних, репродуктивних і екологічних характеристиках.

Оскільки в польових умовах багато критеріїв життєвості рослин визначаються візуально, важливо мати такий набір показників, які б можна було легко діагностувати окомірною (або, принаймні, які б не потребували кропітких лабораторних досліджень) і які були б найбільш інформативними. Стан і параметри надземної частини, мабуть, найчастіше використовуються для оцінки віталітету й життєздатності деревних рослин. До таких показників найчастіше належать морфологічні та репродуктивні характеристики.

Вочевидь, на різних рівнях структурної організації окремої рослини такі візуальні оцінки як життєвості, так і життєздатності мають неоднакову вагу. Для деревних рослин більш суттєвими, на нашу думку, є морфоструктурні характеристики цілісної рослини (габітус, ступінь розвитку пагонової системи, облістяність, стан скелетних гілок і стовбура як каркасної основи рослини). Такі параметри дають змогу оцінити життєздатність рослин за порівняно тривалий проміжок часу та мають більшу прогностичну цінність. Також формування просторової структури на рівні цілісного рослинного організму дають змогу оцінити життєздатність залежно від онтогенетичного стану. Так, для прегенеративних етапів і початкової генеративної фази характерними є інтенсивний ріст і розвиток просторової структури. Зрілі генеративні рослини уповільнюють приріст, формування морфоструктури стабілізується. У субсинільних та особливо у синільних деревних рослин спостерігається деградація просторової структури, що проявляється у відмиранні окремих скелетних гілок або цілих частин крони. Відхилення у тривалості періодів онтогенезу або ступені прояву цих ознак є також одним із основних критеріїв життєздатності рослини.

Згідно із запропонованою М.Т. Мазуренко та А.П. Хохряковим [14] модульною організацією деревних рослин, у надземній частині виділяються модулі фундаментальний (пагони поточного приросту й тонкі облиствені гілки) та конструктивний (стовбур і скелетні гілки, які формують просторову каркасну основу рослини). Фундаментальний модуль виконує асиміляційну й репродуктивну функції, забезпечуючи енергетичний, речовинний та інформаційний обмін між рослиною і зовнішнім середовищем. Конструктивний модуль в основному слугує для підтримки та розгортання у просторі фундаментального модуля, формуючи довготермінову структуру рослини. Цей модуль також забезпечує речовинний обмін між надземною та підземною частинами рослини, збереження латентних відновлюювальних елементів у вигляді сплячих бруньок. Аналіз показників елементарних складових пагонової та листкової систем, тобто фундаментального модуля (поточний приріст пагона, його метамерна структура, морфологічні й анатомічні характеристики листків тощо) точніше відображає поточний життєвий стан на конкретний момент або за короткий проміжок часу (один або, в кращому випадку, кілька вегетативних сезонів). Характеристики конструктивного модуля більш стабільні у часі. Отже, показники фундаментального модуля характеризують поточний віталітет (життєвість), а параметри конструктивного модуля відображають життєздатність рослин.

Важливим показником життєвості рослин є їхня репродуктивна здатність. Так, за прийнятим у геоботаніці визначенням життєвості рослини залежно від репродуктивної здатності [6] класифікують за п'ятьма категоріями від 3а (рослини проходять повний цикл розвитку, нормально плодоносять і висівають насіння) до 1 (рослини генеративних органів не утворюють). Відповідні шкали з бальною оцінкою репродуктивної здатності застосовують і при визначенні успішності інтродукції рослин [9]. Досить зручною є шкала В.Г. Каппера в модифікації О.А. Калініченка [10], яка ґрунтується на візуальному визначенні рясності плодоношення. Такі підходи у визначенні життєвості мають враховувати певні особливості біології рослин. Так, дводомна рослина, маючи навіть високі значення морфометричних показників, може не утворювати насіння за відсутності генеративних особин протилежної статі або коли розмноження відбувається тільки вегетативно, як, наприклад, у *Populus bolleana* Lauche. Низька репродуктивна здатність також може спостерігатися за невеликої кількості особин різних статей при перехресному запиленні у розріджених популяціях або коли запилення є недостатнім з інших причин (відсутність комах-запилювачів через ентомофілію, несприятливі погодні умови в період запилення або локальний вплив інших факторів, які негативно впливають на нормальний розвиток генеративних структур рослин тощо). Для окремих видів деревних рослин характерна певна ритміка цвітіння, що також слід враховувати під час оцінки життєвості на момент спостережень. Зрозуміло, що критерій репродуктивної здатності беруть до уваги тільки для рослин генеративного стану за нормальної можливості утворювати насіння. Очевидно, що для прегенеративних рослин або рослин, які розмножуються лише вегетативно, життєвість визначається лише за морфологічними та фенологічними ознаками.

Важливу інформацію про життєвий стан рослини дають спостереження за її сезонним розвитком. Рослини високого рівня віталітету протягом вегетаційного періоду зазвичай проходять усі фази згідно з віковим станом. Певні відхилення, спричинені погодними особливостями того чи іншого сезону, в цілому не відіграють вирішальної ролі у життєдіяльності деревних рослин із високим адаптаційним потенціалом. У рослин зі зниженим віталітетом спостерігаються відхилення у термінах і тривалості як окремих фаз, так і всього вегетаційного періоду. За низького рівня життєвості можна спостерігати суттєві, що не відповідають погодним коливанням, відхилення у сезонному розвитку, несвоєчасність настання окремих (наприклад, повторне цвітіння) або пропущення окремих фаз, скорочення тривалості вегетаційного періоду. Це свідчить про значні збої генетично закріпленої ритміки життєдіяльності рослини.

Загальний стан життєвості рослини загалом досить легко візуально оцінити за трьома ступенями – високим, середнім і низьким. Але таке визначення не дає змоги отримати деталізовану кількісну оцінку, не враховує комплексність прояву деяких важливих діагностичних ознак, що істотно знижує її прогнозне значення й утруднює статистичний аналіз. З цієї метою доцільно розділити кожен ступінь життєвості на дві градації за визначенням класифікаційних ознак і числовою оцінкою їхніх проявів. Виходячи з цього, ми пропонуємо шкалу інтегральної оцінки життєвості деревних рослин за морфологічними, репродуктивними та фенологічними ознаками:

6 балів – відхилення у розвитку і стані фундаментального та конструктивного модуля не виявлено; рослина повністю і своєчасно проходить річний цикл розвитку, зберігаючи нормальний приріст пагонів та розвиток листової системи, високу репродуктивну здатність (рясність цвітіння та/або утворення насіння до 100 %);

5 балів – суттєвих відхилення у розвитку і стані фундаментального та конструктивного модуля не виявлено; рослина повністю і своєчасно проходить річний цикл розвитку, річний приріст окремих пагонів, облистяність крони та рясність цвітіння та/або утворення насіння знижується несуттєво (до чверті);

4 бали – рослина своєчасно проходить річний цикл розвитку; річний приріст пагонів, облистяність крони, рясність цвітіння та/або утворення насіння знижується на третину;

3 бали – рослина проходить річний цикл розвитку, але настання і тривалість окремих фенофаз має відхилення від норми; облистяність крони, річний приріст пагонів, рясність цвітіння та/або утворення насіння знижується наполовину; спостерігається всихання окремих пагонів і поодиноких скелетних гілок;

2 бали – рослина не повністю проходить річний цикл розвитку зі суттєвим відхиленням від норми настання і тривалості окремих фенофаз; приріст пагонів і облистяність скорочуються більш ніж наполовину, спостерігаються всихання до половини скелетних гілок і окремі пошкодження стовбура; цвітіння та/або утворення насіння слабке або лише поодинокі;

1 бал – рослина не повністю проходить річний цикл розвитку зі суттєвим відхиленням від норми настання і тривалості окремих фенофаз; життєздатними залишаються тільки окремі пагони, більше половини скелетних гілок всихає, мають місце значні пошкодження стовбура; цвітіння та плодоношення немає.

Під час аналізу життєвості популяції або групи особин інколи важливо фіксувати відмерлі деревні рослини, які можуть зберігатися кілька років. У цьому разі їх можна враховувати, оцінюючи життєвість у 0 балів.

В окремих випадках, коли поєднання ознак не дає змоги чітко діагностувати той чи інший бал, життєвість може визначатися проміжними значеннями. Наприклад, приріст пагонів скорочується на третину (що відповідає 4 балам), а облистяність крони або рясність цвітіння лише на чверть (5 балів). Тоді життєвість більш точно буде охарактеризовано середнім значенням 4,5 бала.

Отже, рослини високого рівня життєвості (5–6 балів) характеризуються нормальним станом органів фундаментального та конструктивного модулів, високою інтенсивністю ростових процесів, що трапляється найчастіше у віргінільних і генеративних рослин. У рослин середнього віталітету (3–4 бали) спостерігаються уповільнення приросту пагонів і окремі прояви деструкції фундаментального модуля, зниження репродуктивної здатності, відхилення у сезонній ритміці життєдіяльності. Це свідчить про зниження інтенсивності життєвих процесів, характерне для особин старшої фази генеративного етапу та рідше субсінільних рослин. Рослини низької життєвості (1–2 бали) мають значні та дуже значні відхилення у розвитку органів як фундаментального, так і конструктивного модулів, поступове згасання репродуктивної функції та суттєві збої сезонної ритміки, що в цілому

характеризують відмираючі особини. Ураження хворобами, пошкодження шкідниками та дія інших несприятливих факторів впливають на життєвість рослин будь-якого онтогенетичного стану, і залежно від ступеня прояву такої дії життєвість навіть молодих рослин може оцінюватися низьким балом.

Наведена шкала оцінки життєвості деревних рослин ґрунтується на візуальних ознаках, що іноді не завжди повністю відображає їхній життєвий стан і тенденції його зміни. Використання інших методів може дати додаткову інформацію про рівень життєвості рослини. До таких методів можна віднести фізіологічні (наприклад, визначення ефективності фотосинтезу або інтенсивності транспірації, величини електричного потенціалу листків тощо), дистанційного зондування на основі аналізу оптичних властивостей рослин. Рівень життєвості також корелює з напруженістю й окремими іншими параметрами фітогенного поля [4, 5].

Отже, огляд визначень термінів, які характеризують життєвий стан рослин, показує відсутність єдиного чіткого їхнього тлумачення. Для оцінки поточного життєвого стану особини ми вважаємо доцільним використовувати терміни «життєвість» або «віталітет» («*vitality*»), а для визначення потенційної здатності рослини до росту та розвитку більше підходить термін «життєздатність» («*vitality*»). Загалом рівень життєвості рослини візуально легко визначити за трьома категоріями – високий, середній і низький, розподіл кожної з яких на два класи дає змогу отримати більш деталізовану оцінку. За основу такої оцінки життєвості деревних рослин нами прийнято морфологічні характеристики, рясність плодоношення та/або цвітіння, тривалість і повноту перебігу фаз сезонного розвитку. Запропонована шкала дає змогу отримати інтегральну оцінку поточного життєвого стану рослин, яка базується на ознаках, що легко діагностуються візуально.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Быструшкин А. Г. К вопросу об оценке жизнестойкости популяций: сравнение методов на примере *Rubus idaeus* L. // Вестн. Челябинск. гос. ун-та. 2007. № 6. С. 108–116.
2. Вехов Н. К. Методы интродукции и акклиматизации древесных растений // Интродукция растений и зеленое строительство / Тр. Ботан. ин-та АН СССР. 1957. Сер. 6. Вып. 5. С. 93–105.
3. Горелов А. М., Горелов А. А. Критерии и оценка жизнестойкости древесных растений // Матеріали 6-ї Міжнар. наук.-практ. конф. (м. Дніпро, 1–2 березня 2017 р.). Дніпро, 2017. С. 41–43.
4. Горелов А. М. Биолокация и ее использование в изучении растений. К.: Фитосоциоцентр, 2007. 112 с.
5. Горелов О. М. Методичні аспекти вивчення фітогенних полів // Наук. вісн. Чернів. ун-ту. Біологія. 2004. Вип. 223. С. 237–242.
6. Григора І. М., Соломаха В. А. Основи фітоценології. К.: Фітосоціоцентр, 2000. 240 с.
7. Жилев Г. Г. Виталитетный состав и его роль в субпопуляционных локусах *Soldanella hungarica* Simonk. (Primulaceae) в Карпатах // Сибир. эколог. журнал. 2011. № 6. С. 885–893.
8. Злобин Ю. А. Популяционная экология растений; современное состояние, точки роста: монография. Сумы: Университетская книга, 2009. 263 с.
9. Ишбирдин А. Р., Ишмуратова М. М. К оценке виталитета ценопопуляций *Rhodiola immelica* Boriss. по размерному спектру // Ученые записки НТГСПА. Нижний Тагил, 2004. С. 80–85.
10. Калиниченко А. А. Оценка адаптации и целесообразности интродукции древесных растений // Бюл. Главн. ботан. сада АН СССР. 1979. № 108. С. 3–8.
11. Кияк В. Г. Життєвість (віталітет) як інтегральний показник стану популяцій рослин // Біологічні студії. 2014. Т. 8. № 3–4. С. 273–284.

12. Кохно Н. А., Курдюк А. М. Теоретические основы и опыт интродукции древесных растений на Украине. К.: Наук. думка, 1994. 186 с.
13. Лапин П. И., Сиднева С. В. Оценка перспективности интродукции древесных растений по визуальным признакам // Опыт интродукции древесных растений. М.: Изд-во Главн. ботан. сада АН СССР, 1973. С. 7–67.
14. Мазуренко М. Т., Хохряков А. П. Модульная организация дерева // Конструкционные единицы в морфологии растений: Материалы X школы по теоретической морфологии растений (Киров, 2–8 мая 2004 г.). Киров, 2004. С. 62–72.
15. Меженський Б. М. Уніфікування шкал оцінок, що застосовуються при інтродукції деревних рослин // Інтродукція рослин. 2007. № 4. С. 26–37.
16. Миркин Б. М., Наумова Л. Г. Краткий энциклопедический словарь науки о растительности. Уфа: Гилем, 2014. 288 с.
17. Пятницкий С. С. Практикум по лесной селекции. М.: Сельхозиздат, 1961. 271 с.
18. Скляр В. Г. Некоторые теоретические и методические аспекты прогнозирования состояний лесных фитоценозов // Scientific Journal "ScienceRise". 2015. № 10/6 (15). С. 12–27.
19. Соколов С. Я. Современное состояние теории акклиматизации и интродукции растений // Интродукция растений и зеленое строительство / Тр. Ботан. ин-та АН СССР. 1957. Сер. 6. Вып. 5. С. 9–2.
20. Тарабрин В. П., Кондратюк Е. Н., Башкатов В. Г. и др. Фитотоксичность органических и неорганических загрязнителей. К.: Наук. думка, 1986. 216 с.
21. Фардеева М. Б., Лукоянова С. В. Виталитетная структура и различные подходы к ее изучению на примере *Cyripedium calceolus* L. // Вестн. ТГГПУ. 2011. № 2(24). С. 83–88.

Стаття: надійшла до редакції 30.01.17

доопрацьована 08.06.17

прийнята до друку 30.08.17

VITALITY OF WOODY PLANTS (DETERMINATION, CRITERIA AND ESTIMATION)

A. M. Gorelov, A. A. Gorelov

*M. M. Gryshko National Botanic Garden, NAS of Ukraine
1, Timiryazevska St., Kyiv 01014, Ukraine
e-mail: alexgorelov@rambler.ru*

The analysis of the literature shows the lack of uniform interpretation of the plants vitality definition. Typically, the terms «vitality» and «sustainability» are used but they are not identical. To determine the current status of the plants it is advisable to use the term «vitality» and prognostic evaluation of potential life state is «sustainability». The proposed system for determining the vitality of woody plants, based on a set of morphometric (current shoots growth, foliation extent, the condition of fundamental and structural module), reproductive (fruiting abundance and / or flowering) and phenological (phenophase completeness, consistency and duration) signs. In general, the level of vitality is defined in three categories: high, medium and low. For detailed plants vitality quantitative assessment 6-point scale is proposed. In the absence of a clear definition for each set of signs vitality can be measured by intermediate point. This scale allows to get the integrated plants vitality assessment on the grounds that are easily determined in the field and do not require laboratory testing.

Keywords: vitality, sustainability, woody plants, sustainability, integral estimation

**ВІТАЛІТЕТНА СТРУКТУРА ЦЕНОПОПУЛЯЦІЙ *POTENTILLA ERECTA* (L.)
RAEUSCH. НА ЗАПЛАВНИХ ЛУКАХ КРОЛЕВЕЦЬКО-ГЛУХІВСЬКОГО
ГЕОБОТАНІЧНОГО РАЙОНУ**

І. Зубцова

*Сумський національний аграрний університет
вул. Герасима Кондратьєва, 160, Суми 40021, Україна
e-mail: innazybtsova@mail.ru*

Оцінено віталітетну структуру чотирьох популяцій *Potentilla erecta* (L.) Rausch. на заплавних луках Кролевецько-Глухівського геоботанічного району. Виходячи з результатів кореляційного та факторного аналізів, як ключові морфопараметри, які детермінують віталітет у особин *Potentilla erecta*, обрано фітомасу рослин, площу листової поверхні та фітомасу генеративних органів. Ці показники входять до складу різних кореляційних плеяд і проявляють високі факторні навантаження. Встановлено, що в умовах заплавних лук у районі дослідження наявні популяції *Potentilla erecta* двох якісних типів: депресивні та врівноважені. З'ясовано, що спільною ознакою віталітетної структури досліджуваних ценопопуляцій *Potentilla erecta* є досить низька (до 25 %) частка особин проміжного класу («b») віталітету. Популяції, у яких би найбільшу представленість мали рослини найвищого віталітету (класу «a»), не виявлено. Врівноваженими є ценопопуляції із угруповань *Typhetum (latifoliae) comarosum (palustre)* та *Typhetum (latifoliae) bidensum (tripartiti)*, а депресивними – із *Elytrigietum (repentis) trifoliosum (pratensis)* та *Elytrigietum (repentis) hypericosum (perforati)*.

Ключові слова: Potentilla erecta (L.) Rausch., ценопопуляція, віталітетна структура, морфометричний аналіз, Кролевецько-Глухівський геоботанічний район

Оцінка сучасного стану популяцій на основі популяційного підходу має важливе значення у вирішенні завдань щодо їхнього раціонального використання, збереження та відновлення. Вивчення структури популяцій рослин забезпечує великим обсягом матеріалу, який дає змогу дослідити адаптивні властивості видів, отримати найбільш повне уявлення про механізми реалізації життєвих стратегій рослин різних еколого-ценотичних груп [4, 9].

У широкому спектрі методів популяційних досліджень значну роль відіграє вивчення віталітетної структури ценопопуляцій рослин. Концепція віталітету, розроблена Ю.А. Злобіним [21], заснована на тому, що у зв'язку з просторовою неоднорідністю популяційних полів, а також під впливом стресових факторів, особини мають різні темпи росту й розвитку, а отже, і різну життєвість. Особливість віталітетного аналізу полягає у тому, що він спирається на морфометричні параметри, які безпосередньо відображають розмір і продуктивність рослин. Цей підхід дає змогу на основі визначення у складі ценопопуляції частки рослин різного віталітету охарактеризувати її загальний стан і, як результат, дати оцінку стійкості популяції та скласти прогноз щодо її подальшого існування [12].

Останніми десятиріччями віталітетний аналіз дедалі ширше застосовують у популяційних дослідженнях. При цьому особливої уваги та детального вивчення потребують рослини, популяції яких зазнають суттєвого антропогенного впливу. До таких видів належить *Potentilla erecta* (L.) Rausch. Це багаторічна трав'яниста рослина з коротким, нерівномірно потовщеним, дерев'янистим кореневищем, з численними додатковими коренями. Кореневище масивне, завдовжки 6–7,5 см, завтовшки 1–2 см, червоно-бурого кольору зовні та

жовтувато-білого – на розрізі. Стебел зазвичай декілька, вони прямостоячі або висхідні, заввишки 20–40 (до 50) см, тонкі, розгалужені у верхній частині. Прикореневі листки трійчастоскладні, з довгими черешками. Квітки дрібні, поодинокі з довгими квітконіжками. Оцвітина подвійна, 4 чашолистки і 4 пелюстки. Віночок діаметром близько 1 см, з жовтими пелюстками. Тичинки і маточки численні. Плід – багатогорішок [14].

P. erecta належить до числа рослин із лікарськими властивостями. Її цілющі якості визначаються в основному наявністю в кореневищах великої кількості дубильних речовин (до 35 %), флавоноїдів, органічних кислот, камеді, ефірної олії, смол, фарбувальних речовин. Рослинна сировина цього виду проявляє в'язучу та кровоспинну дію [15].

На теперішній час є значна кількість праць про біологічні й екологічні властивості *P. erecta*. До їхнього числа, зокрема, належать роботи, авторами яких є І.Л. Крилов [10, 11], В.Ю. Мандрик, О.А. Ментковська [17], Т.Л. Андрієнко [1], Г.Ф. Бачуріна [2], Т.П. Сорокина [23], Н.Я. Костеша, Л.А. Лицкевич, А.Ю. Матвеев [13], Й.В. Царик [26], А.Б. Безделев, Т.А. Безделева [3], С. Geiger, E. Scholz, H. Rimpler [27], A. Geszprych, W. Roslon, Z. Weglarz [28], J. Grujic-Vasic, S. Ramic, T. Bosnic, Z. Rimpapa [29, 30], К.Р. Latte [31]. Ресурсний потенціал цього виду вивчав Г.А. Лисак [16], а придатність для культивування, онтогенез, динаміку чисельності й продуктивності – К.А. Малиновський, Й.В. Царик [18], С.М. Стойко, Л.І. Мілкіна, П.Т. Яценко, О.О. Кагало [24]. Детально різними авторами описано лікарські властивості *P. erecta* [19, 25].

Однак ознаки та властивості ценопопуляцій цього виду, в тому числі й віталітетні, вивчено недостатньо. До числа регіонів України, на теренах якого *P. erecta* донині не був охоплений популяційними дослідженнями, належить Кролевецько-Глухівський геоботанічний район. Ця територія загалом і її заплавні луки, зокрема, є важливими осередками низки лікарських рослин. Однак природні угруповання тут часто зазнають значного антропогенного впливу, наслідком чого є деградація та погіршення стану ценопопуляцій багатьох рослин. У зв'язку з цим проведення у межах Кролевецько-Глухівського геоботанічного району досліджень, спрямованих на з'ясування особливостей і закономірностей існування ценопопуляцій видів природної флори, серед них і *P. erecta*, є актуальною науковою проблемою.

Метою представленої роботи є встановити провідні ознаки віталітетної структури ценопопуляцій *P. erecta* в різних фітоценозах заплавних лук Кролевецько-Глухівського геоботанічного району.

Матеріали та методи

Дослідження проводили протягом 2014–2016 рр. Було обстежено чотири ценопопуляції *P. erecta*. Перша ценопопуляція (ЦП 1) сформувалася в умовах угруповання *Turphetum (latifoliae) somarosum (palustre)*. Вона розташована біля с. Білокопитове Глухівського р-ну Сумської обл. Друга ценопопуляція (ЦП2) існує в угрупованні *Turphetum (latifoliae) bidenosum (tripartiti)* (поблизу с. Соснівка Глухівського р-ну). Третя ценопопуляція (ЦП3) відповідає фітоценозу *Elytrigietum (repentis) trifolium (pratensis)* (розташована біля м. Путивль Сумської обл.). Четверта ценопопуляція (ЦП4) сформувалася в угрупованні *Elytrigietum (repentis) hypericosum (perforati)* (неподалік м. Глухів Сумської обл.). У кожному із цих фітоценозів із дотриманням загальноприйнятих вимог і підходів було виконано геоботанічні описи [22].

Віталітетну структуру ценопопуляцій вивчали за методикою Ю.А. Злобіна [6, 7]. Для вимірювання морфометричних параметрів випадковим чином відбирали 25–30 неушкоджених рослин генеративного онтогенетичного стану. Морфометричний аналіз цих рослин супроводжувався оцінкою 25 морфопараметрів. Із числа статичних метричних показни-

ків, зокрема, визначали загальну фітомасу рослини (W), висоту рослини, фітомасу листків (W_L), кількість квіток, кількість плодів, загальну фітомасу генеративних органів (W_G), площу одного листка, загальну площу листової поверхні рослини (A). Із статичних аллометричних морфопараметрів оцінювали: співвідношення між площею листової поверхні та масою рослин ($LAR=A/W$), площу листків на одиницю фітомаси листків ($SLA=A/W_L$), фотосинтетичне зусилля ($LWR=W_L/W$), репродуктивне зусилля ($RE I=(W_G/W) \times 100 \%$), $RE II=(W_G/A) \times 100 \%$).

Із числа морфометричних ознак вибирали ті показники, які є об'єктивним кількісним відображенням рівня віталітету рослин. Відповідно до вимог класичного віталітетного аналізу, цей вибір супроводжувався виконанням такого алгоритму дій: 1. Вибір із числа морфопараметрів тих, що мають найвищий рівень варіювання; 2. Застосування до цих показників факторного аналізу; 3. Оцінка рівня кореляційних взаємозв'язків між усіма розмірними показниками та виокремлення кореляційних плеяд; 4. Порівняння результатів факторного та кореляційного рішень; 5. Інтерпретація отриманих даних з урахуванням біологічних та екологічних правил і закономірностей.

З опорою на виявлені ключові морфопараметри, у кожній ценопопуляції визначали частку рослин різного рівня віталітету: найвищого (класу «а»), проміжного (класу «б») та найнижчого (класу «с»). Інтегральною оцінкою якості популяцій виступав індекс якості Q . Його розраховували за формулою:

$$Q = 0,5 (a + b),$$

де a – частка особин найвищого класу віталітету в популяції; b – частка особин проміжного класу віталітету.

На основі віталітетного аналізу виділяли якісні категорії ценопопуляцій:

- а) депресивні ($Q < 0,16667$),
- б) врівноважені (Q від $0,16667$ до $0,33333$),
- с) процвітаючі ($Q > 0,33333$) [20].

Для визначення віталітетних спектрів і якісних типів ценопопуляцій *P. erecta* використано некомерційну програму VITAL, розроблену Ю.А. Злобіним [8].

Результати і їхнє обговорення

Результати морфометричних досліджень засвідчили, що рослини *P. erecta* із різних ценопопуляцій статистично достовірно ($p < 0,05$) відрізняються між собою за величинами абсолютної більшості морфопараметрів (табл. 1). Зазначена особливість вказує на те, що ці чотири популяції можуть мати суттєві відмінності й у віталітетних ознаках та, відповідно, засвідчує доцільність застосування до них віталітетного аналізу.

Таблиця 1

Величини провідних морфопараметрів рослин
Potentilla erecta із різних ценопопуляцій

Морфопараметр і його одиниці виміру	Середні значення ($\bar{X} \pm S_x$) морфопараметрів у різних ценопопуляціях				Довірчий рівень, p
	ЦП 1	ЦП 2	ЦП 3	ЦП 4	
Загальна фітомаса рослини, г	62,5±10,41	128,7±24,32	51,1±10,25	128,6±27,31	0,000
Висота рослини, см	32,3±5,42	24,6±4,7	25,4±5,4	19,9±0,83	0,000
Загальна фітомаса листків, г	9,3±2,12	6,8±3,15	4,7±1,67	5,3±1,71	0,016
Загальна фітомаса генеративних органів, г	6,4±2,09	7,6±1,09	8,2±2,62	5,7±1,16	0,009
Фітомаса квіток, г	4,2±1,42	5,5±2,08	3,2±1,42	4,3±2,17	0,007
Фотосинтетичне зусилля, г/г	12,7±5,08	16,2±4,12	10,6±3,34	9,8±5,61	0,007

За результатами кореляційного аналізу встановлено, що при статистичній достовірності 0,85 і вище досліджувані морфопараметри *P. erecta* об'єднуються у п'ять кореляційних плеяд. До складу плеяди № 1 увійшли показники загальної площі листків і площі одного листка, до плеяди № 2 – величини співвідношення між площею листової поверхні та масою рослин (LAR), і площі листків на одиницю фітомаси листків (SLA), до плеяди № 3 – загальна фітомаса рослин і фітомаса листків, до плеяди № 4 – загальна маса генеративних органів і маса квіток, до плеяди № 5 – маса та кількість плодів.

Серед досліджених морфопараметрів найвищий рівень мінливості виявили п'ять: загальна фітомаса рослин, фітомаса листків, фітомаса репродуктивних органів, площа листової поверхні та площа окремого листка. Саме для цих морфопараметрів і було проведено факторний аналіз.

Результати факторного аналізу свідчать, що найбільший внесок у перший фактор роблять три показники: загальна фітомаса рослини, фітомаса генеративних органів і площа листової поверхні рослини. За другим фактором найбільше навантаження мають показники репродуктивного зусилля: RE I та RE II (табл. 2).

Таблиця 2

Результати факторного аналізу морфопараметрів
рослин *Potentilla erecta* (L.) Raeusch.

Морфопараметри	Факторні навантаження ¹	
	фактор 1	фактор 2
Загальна фітомаса рослини	0,812613*	0,331082
Фітомаса листків	0,799852	0,326119
Загальна фітомаса генеративних органів	0,835169*	0,365603
Площа одного листка	-0,757842	-0,478427
Площа листової поверхні рослини	0,803915*	0,498723
Репродуктивне зусилля RE I	-0,347612	0,873789*
Репродуктивне зусилля RE II	-0,134278	0,796579*

Примітка: зірочкою * відзначені морфопараметри, які мають найбільші факторні навантаження

Виходячи з результатів кореляційного та факторного аналізів як ключових морфопараметрів, що детермінують віталітет у особин *P. erecta*, вибрано загальну фітомасу рослин і фітомасу репродуктивних органів, а також площу листової поверхні. Ці показники входять до складу різних кореляційних плеяд і проявляють високі факторні навантаження. З опорою на встановлені ключові морфопараметри було визначено віталітетні спектри та якісні типи ценопопуляцій *P. erecta* на заплавах луках Кролевецько-Глухівського геоботанічного району (рис. 1, 2).

Ценопопуляції *P. erecta* в умовах досліджуваної території характеризуються незначним різноманіттям віталітетної структури. На теренах Кролевецько-Глухівського геоботанічного району нами було зареєстровано ценопопуляції лише двох якісних типів: урівноважені та депресивні. Урівноваженими є ценопопуляції із угруповань *Typhetum (latifoliae) comarosum (palustre)* та *Typhetum (latifoliae) bidenosum (tripartiti)*, а депресивними – із *Elytrigietum (repentis) trifolium (pratensis)* та *Elytrigietum (repentis) hypericosum (perforati)*.

Спільною ознакою віталітетної структури досліджених ценопопуляцій *P. erecta* є досить низька частка особин проміжного («b») класу віталітету (у межах 25 %). В усіх чотирьох ценопопуляціях переважають рослини найнижчого (класу «с») віталітету. Однак у ценопопуляціях із угруповань *Typhetum (latifoliae) comarosum (palustre)* та *Typhetum (latifoliae) bidenosum (tripartiti)* (ЦП 1 та ЦП 2) їхня частка становить 41–49 %, тоді як в угрупованнях *Elytrigietum (repentis) trifolium (pratensis)* та *Elytrigietum (repentis) hyperico-*

sum (perforati) (ЦП 3 та ЦП 4) вона сягає 84–89 %. Ценопопуляцій, у яких найбільшу представленість мали б рослини найвищого (класу «а») віталітету, не виявлено.

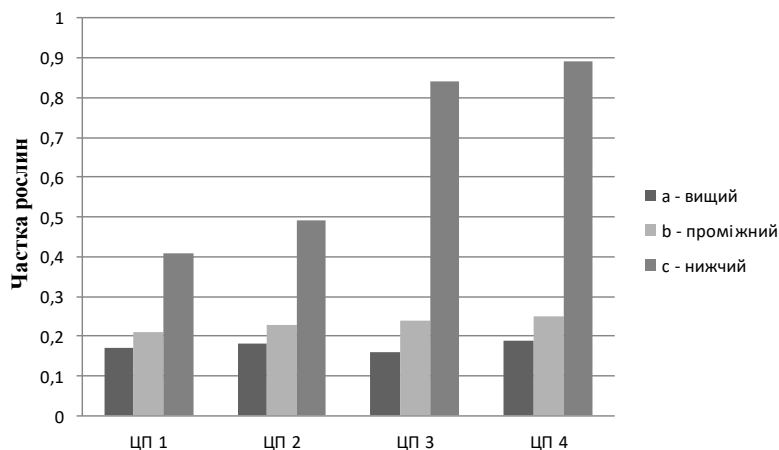


Рис. 1. Віталітетна структура ценопопуляцій *Potentilla erecta* на заплавах Крелевецько-Глухівського геоботанічного району (нумерація ценопопуляцій відповідає наведеній у тексті)

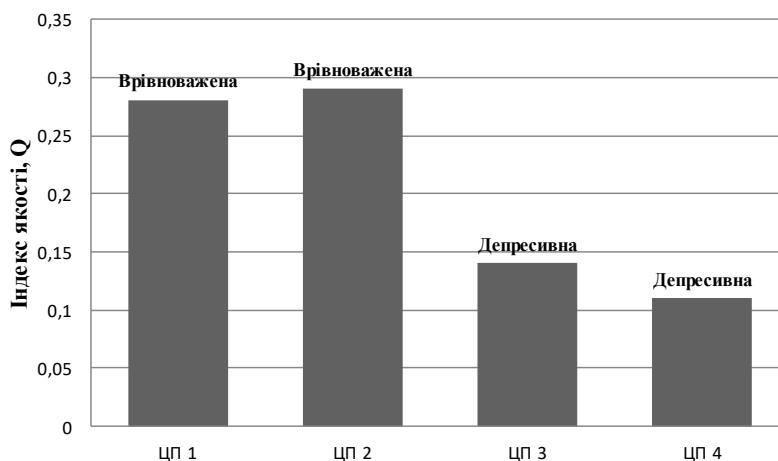


Рис. 2. Індекс якості й віталітетні типи ценопопуляцій *Potentilla erecta* на заплавах Крелевецько-Глухівського геоботанічного району (нумерація ценопопуляцій відповідає наведеній у тексті)

Отже, за результатами проведених досліджень нами було виявлено, що до числа показників, які об'єктивно свідчать про рівень життєвості (віталітету) особин у *P. erecta*, належать фітомаса рослин, площа листової поверхні та фітомаса репродуктивних органів. Досліджувані ценопопуляції за віталітетною структурою репрезентують два якісних типи: депресивні ($Q=0,11-0,14$) та врівноважені ($Q=0,28-0,29$). Врівноважені ценопопуляції представлені у вологіших місцевиростаннях (угруповання *Tuypnetum (latifoliae) somarosum (palustre)* та *Tuypnetum (latifoliae) bidenosum (tripartiti)*), а депресивні – у сухіших (угруповання *Elytrigietum (repentis) trifolisum (pratensis)* та *Elytrigietum (repentis) hypericosum (perforati)*). Загалом досить низькі значення індексу якості досліджених ценопопуляцій і переважання у їхньому складі рослин найнижчого рівня віталітету об'єктивно вказують

на те, що усі вони існують в умовах еколого-ценотичного стресу. Формування таких умов є результатом дії як природних чинників (наприклад, зміни рівня зволоження), так і антропогенних, зокрема, нерегульованої заготівлі лікарської сировини цього виду. Інтенсивного впливу зазначеного виду антропопресії зазнають саме ценопопуляції із угруповань *Turphetum (latifoliae) comarosum (palustre)* та *Turphetum (latifoliae) bidenosum (tripartiti)*. Виявлені особливості віталітетної структури ценопопуляцій *P. erecta* у Крелевецько-Глухівському геоботанічному районі засвідчують актуальність проведення в регіоні подальших популяційних досліджень цього виду на засадах комплексного популяційного аналізу та вказують на доцільність розробки для регіону ефективних заходів зі збереження ценопопуляцій цієї цінної лікарської рослини.

Автор висловлює глибоку вдячність своєму науковому керівникові доктору біологічних наук, професору В.Г. Скляр за слушні поради та постійну увагу до роботи.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Андрієнко Т. Л. Рослинність заказника «Городницький» (Житомирське Полісся) // Укр. ботан. журнал. 1983. № 2. С. 107–111.
2. Бачуріна Г. Ф. Торфові болота Українського Полісся: Загальний характер, рослинність, стратиграфія, шляхи розвитку та народногосподарське значення. К.: Наукова думка, 1964. 208 с.
3. Безделев А. Б., Безделева Т. А. Жизненные формы семенных растений российского Дальнего Востока. Владивосток: Дальнаука, 2006. 296 с.
4. Жиляев Р. Р. Концепція життєздатності популяцій. Життєздатність популяцій рослин високогір'я Українських Карпат. Львів: Меркатор, 2009. 206 с.
5. Злобін Ю. А. Принципы и методы изучения ценологических популяций растений. Казань: Изд-во Казан. ун-та, 1989. 146 с.
6. Злобін Ю. А. Теория и практика оценки виталитетного состава ценопопуляций растений // Ботан. журнал. 1998. № 74(6). С. 769–784.
7. Злобін Ю. А. Популяционная экология растений: современное состояние, точки роста. Сумы: Университет. книга, 2009. 263 с.
8. Злобін Ю. А. Компьютерные программы для анализа популяций растений // Вісн. Сумського нац. аграр. ун-ту. Сер. агрономія і біологія. 2012. Вип. 2 (23). С. 3–6.
9. Ишбирдин А. Р., Ишмуратова М. М. Адаптивный морфогенез и эколого-ценологические стратегии выживания травянистых растений // Методы популяционной биологии. Сыктывкар, 2004. Ч. II. С. 113–120.
10. Крылова И. Л., Евсеенко Н. П. К ресурсной характеристике лапчатки прямостоячей в средней полосе Европейской части СССР // Растительные ресурсы. 1976. Т. 12. Вып. 3. С. 360–366.
11. Крылова И. Л., Капорова В. И. Составление расчетных таблиц для оценки урожайности лекарственных растений по проективному покрытию // Растительные ресурсы. 1992. Т. 28. Вып. 3. С. 141–156.
12. Коваленко І. М. Структура популяцій домінантів трав'яно-чагарничкового ярусу в лісових фітоценозах Деснянсько-Старогутського національного природного парку. Віталітетна структура // Укр. ботан. журнал. 2006. Т. 63. № 3. С. 376–386.
13. Костеша Н. Я., Лицкевич Л. А., Матвеев А. Ю. Радиопротекторные свойства сухого экстракта лапчатки кустарниковой // Здоровье человека в Сибири. 1990. С. 83.
14. Лисак Г. А., Філіпенко А. Б. Перстачі. Львів, 1998. 54 с.

15. Лисак Г. А. Екологічні особливості ценопопуляцій перстачів (*Potentilla* L.) Волині // Укр. фітоценот. зб. К., 2000. № 1(15). С. 66–90.
16. Лисак Г. А. Перстач прямостоячий (*Potentilla erecta* (L.) Raeusch.) на Волині: еколого-ценотичні особливості, запаси сировини та способи культивування: автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.05. К., 2000. 24 с.
17. Мандрюк В. Ю., Ментковська О. А. Цитоэмбриологическое исследование некоторых популяций *Potentilla erecta* (L.) Hampe (Rosaceae) в Украинских Карпатах: микроспорогенез, дифференциация семязпочки и женского гаметофита // Ботан. журнал. 1977. 62, № 7. С. 1062–1073.
18. Малиновський К. А., Царик Й. В. Проблема вивчення й охорони популяцій рідкісних видів флори Українських Карпат // Укр. ботан. журнал. 1990. 48(3). С. 13–21.
19. Машиковский М. Д. Лекарственные средства. М: ООО «Изд-во Новая волна», 2001. 540 с.
20. Скляр В. Г. Віталітетна структура підросту провідних лісоутворюючих видів Новгород-Сіверського Полісся // Уч. зап. Таврич. нац. ун-та ім. В.И. Вернадского. 2013. Т. 26. № 1. С. 206–217.
21. Скляр Ю. Л. Популяційна структура *Nymphaea candida* басейну Десни в межах Північного Сходу України // Укр. ботан. журнал. 2006. Т. 63. № 4. С. 495–501.
22. Современные подходы к описанию структуры растения / под ред. Н.П. Савиных, Ю.А. Боброва [и др.]. Киров, 2008. 355 с.
23. Сорокина Т. П. Морфологическое и цитологическое изучение потомства F1 от скрещивания между различными видами *Potentilla* // Апомиктическое размножение и гетерозис. Новосибирск, 1974. С. 155-161.
24. Стойко С. М., Мілкіна Л. І. Яценко П. Т. та ін. Раритетні фітоценози західних регіонів України (Регіональна Зелена книга). Львів, 1997. 190 с.
25. Чукурида С. С. Практическая ценность интродуцентов семейства Rosaceae // Научный электронный журнал КубГАУ. 2004. № 2(4). С. 1–19.
26. Царик Й. В. Ценопопуляционная структура высокогорных сообществ Карпат: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Днепропетровск, 1991. 43 с.
27. Geiger C, Scholz E, Rimpler H. Ellagitannins from *Alchemilla xanthochlora* and *Potentilla erecta* // Planta Med. 1994. N 60. P. 384–385.
28. Geszprych A, Roslon W, Weglarz Z. Phenolic acids in rhizomes and herb of tormentil (*Potentilla erecta* L.) // Herba Pol. 2003. N 49. P. 315–316.
29. Grujic-Vasic J., Ramic S., Bosnic T., Rimpapa Z. Phytochemical investigation of the Tormentil – *Potentilla tormentilla* // Folia Med. Fac. Univ. Saraeviensis. 1982. N 17. P. 89–98.
30. Grujic-Vasic J., Pilipovic S., Bosnic T., Redzic. Antimicrobial acitivity of rhizome and root of *Potentilla erecta* (L.) Raeusch. and *Potentilla alba* L. // Florenz. 2005. N 192. P. 164.
31. Latte K. P. *Potentilla erecta*. Das Aufrechte Fingerkraut // Z. Phytother. 2006. N 27. P. 198–206.

Стаття: надійшла до редакції 02.03.17

доопрацьована 17.07.17

прийнята до друку 21.07.17

**VITALITY STRUCTURE
OF *POTENTILLA ERECTA* (L.) RAEUSCH. CENOPOPULATIONS'
IN KROLEVETS-HLUKHIV GEOBOTANICAL REGION**

I. Zubtsova

*Sumy National Agrarian University
160, G. Kondratiev St., Sumy 40021, Ukraine
e-mail: innazybtsova@mail.ru*

On the basis of comprehensive monitoring vitality structure of four *Potentilla erecta* (L.) Raeusch. populations on bottomland meadows of Krolevets-Hlukhiv geobotanical region was evaluated. Based on the results of correlation and factor analysis, as key morpho-parametres that determine vitality of *Potentilla erecta* individuals, there were selected indicators of phytomass of aboveground parts, leaf surface area and phytomass of generative organs. These figures are part of different correlation pleiades and show a high factor loads. It was established that in bottomland meadows of the studied geobotanical district the *Potentilla erecta* populations of two quality types: depressed and balanced. Occur there was disclosed that a common feature of vitality structure of *Potentilla erecta* studied cenopopulations is a quite low (25 %) proportion of individuals of average ("b") class. Populations, which would have the greatest representation of the highest vitality plants (class "a") were not found. Morphometric parameters were designated, based on which vitality spectrum and quality types of cenopopulations of *Potentilla erecta* were determined. Balanced are cenopopulations of the groups Typhetum (latifoliae) comarosum (palustre) and Typhetum (latifoliae) bidenosum (tripartiti), and depressive – Elytrigietum (repentis) trifolisum (pratensis) and Elytrigietum (repentis) hypericosum (perforati).

Keywords: *Potentilla erecta* (L.) Raeusch., cenopopulation, vitality structure, morphometric analysis, Krolevets-Hlukhiv geobotanical region

ЕКОЛОГІЧНІ НАСЛІДКИ ДОВГОТРИВАЛОГО НАФТОВИДОБУТКУ НА СТАРОСАМБІРСЬКОМУ РОДОВИЩІ ЛЬВІВСЬКОЇ ОБЛАСТІ

Н. Джура, І. Подан

*Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: Gjurana@ukr.net*

Вивчено вплив тривалого нафтовидобутку на ґрунт і рослинний покрив Старосамбірського нафтового родовища (СНР). Об'єктом досліджень були ділянки нафтових свердловин №№ 60, 65, 76 Старосамбірського родовища. Контролем вважали умовно чистий ґрунт без нафти. Проаналізовано температурний режим, кислотність і фітотоксичність цих ґрунтів. Встановлено видовий склад рослин досліджуваної території з подальшою перспективою відбору стійких видів для використання у фіторе mediaційних технологіях. Підтверджено, що нафтозабруднені ґрунти мали вищу температуру, порівняно із контролем. Рослинний покрив запобігав перегріванню ґрунтів – температура на ділянках за участю рослин була нижчою в середньому на 3–5 °С. Встановлено ступінь забруднення у досліджуваних пробах ґрунту СНР: *Свердловина № 60* – максимальний рівень токсичності, дуже сильне забруднення; *Свердловина № 65* – високий рівень токсичності, сильне забруднення; *Свердловина № 76* – рівень токсичності вище середнього, середнє забруднення. Проведені дослідження дають змогу зробити висновок, що ґрунти в регіоні потребують детального дослідження і впровадження заходів, які забезпечили би поліпшення їхнього якісного стану, зокрема, визначення оптимальних умов для проведення фіторе mediaції.

Ключові слова: Старосамбірське нафтове родовище, забруднення, нафта, ґрунт, фітотоксичність

Нафтовидобувна і нафтопереробна галузі промисловості за наслідками впливу на природне середовище займають одне з найвагоміших місць. При цьому негативна дія названих галузей проявляється на всіх етапах видобувних робіт: від геолого-пошукової розробки до завершення експлуатації свердловин [20, 22, 23, 27].

В Україні наявна щільна мережа об'єктів нафтопродуктозабезпечення. Практично вся територія країни перебуває під потенційною загрозою нафтового забруднення. Старосамбірське нафтове родовище розташоване у Старосамбірському р-ні Львівської обл. Видобуток нафти на території родовища було розпочато у грудні 1969 р. [19]. Внаслідок інтенсивного довготривалого нафтовидобутку та різних видів будівництва природний рельєф родовища зазнав сильної антропогенної трансформації, виникли екологічні проблеми в екосистемах, зокрема, в їхніх найважливіших компонентах – ґрунтах і рослинному покриві [18].

Нафта і нафтопродукти – це рідкі забруднювачі, які активно мігрують у будь-яких ґрунтах. Висока рухливість поллютантів визначає не тільки небезпеку їхнього поширення на значних площах за виникнення аварійних ситуацій, але й потрапляння у ґрунтово-підземні й поверхневі води. Забруднення ґрунтів нафтою зумовлює зміни їхніх фізико-хімічних властивостей. На забруднених територіях формується специфічний мікроклімат, обумовлений мікрорельєфом, складом субстрату, порушеним водним і зміненим

температурним режимами, з'являється специфічний запах. Шкідливий вплив смолянисто-альфальтенових компонентів на ґрунтові екосистеми полягає не в хімічній токсичності, а у значній зміні водно-фізичних властивостей ґрунтів. Якщо нафта просочується згори, її смолянисто-асфальтенові компоненти сорбуються, в основному, у верхньому гумусовому горизонті, міцно цементуючи його. При цьому зменшується поровий простір ґрунтів. Чорне забарвлення нафтозабруднених ґрунтів призводить до надмірного поглинання сонячної радіації [7, 17, 20, 22–24, 29].

Упродовж жовтня 2013 р. – травня 2017 р. ми вивчали ґрунтовий і рослинний покрив ділянок нафтових свердловин №№ 60, 65, 76 Старосамбірського родовища. У ґрунтах визначали температурний режим, кислотність і фітотоксичність. Встановили видовий склад рослин цих ділянок із подальшою перспективою відбору стійких видів для використання у фіторе mediaційних технологіях.

Матеріали та методи

Об'єктом досліджень були ділянки нафтових свердловин №№ 60, 65, 76 Старосамбірського родовища (рис. 1).

Для досліджень відбирали проби ґрунту безпосередньо зі свердловин, а також на відстані 10 і 20 м від свердловин за загальноприйнятою методикою [5, 13, 15]. Контролем вважали ґрунт без нафти, відібраний з умовно чистої території Старого Самбора. Токсичність ґрунтів визначали за допомогою ростового тесту з використанням *Linum usitatissimum* L. Наважку ґрунту 20 г поміщали у ступку, зволожували водою до 75 %, добре розтирали. Суспензію переносили в чашки Петрі, накривали фільтрувальним папером і викладали насіння *L. usitatissimum*. Закриті чашки ставили в термостат для проростання насіння при температурі +24 °С [2, 8, 21]. Через три доби визначали кількість пророслих насінин, а через шість діб – вимірювали довжину коренів і висоту пагонів фітотесту. Отримані показники у дослідних варіантах виражали у відсотках щодо контролю. Достовірність різниці між контрольним і дослідними варіантами оцінювали за критерієм Стьюдента, вірогідними вважали різниці, де рівень значущості $p < 0,05$ [1, 12].

Актуальну (активну) кислотність досліджуваних проб ґрунту вимірювали після приготування водної витяжки за допомогою рН-метра [13–15].

Температуру ґрунту на родовищі вимірювали у теплий і холодний періоди року (літо й осінь 2016 р., весна – 2017 р.) на глибині 5 см за допомогою термометра ТВТ-10Н [14].

Видову належність рослин СНР визначали з використанням визначника рослин [16].

Результати і їхнє обговорення

Основним техногенним геокомплексом Старосамбірського нафтового родовища (СНР) є ділянки нафтових свердловин зі зруйнованим біогеоценотичним покривом. На місці природних біогеоценозів утворюються нові, переважно нестабільні та прості за структурою техногенні геокомплекси різного типу [18, 19]. Унаслідок розробки нафтового родовища рослинність цього регіону зазнала значних антропогенних змін.

Вплив нафтового забруднення на рослини відбувається двома шляхами: безпосередньо (унаслідок проникнення компонентів нафти через кореневу систему або продихи листків і включення їх у метаболізм) і опосередковано (через зміни фізико-хімічного складу ґрунту та порушення його біологічних властивостей) [7, 9, 10, 22, 23].

На основі візуальних спостережень виявлено, що на території Старосамбірського нафтового родовища сформувалося флористично бідне рудеральне угруповання з домінуванням довгокореневищних трав-багаторічників: площинно домінують злаки, серед яких: *Poa annua* L., *Elytrigia repens* (L.) Nevski, *Calamagrostis arundinacea* (L.) Roth,



Рис. 1. Старосамбірське нафтове родовище

Setaria viridis (L.) Beauv.; наявні представники родини Сурегасеае, зокрема, *Carex hirta* L. Толерантні до нафтового забруднення види рослин можуть бути рекомендовані для фіторе mediaційних технологій деградованих ґрунтів цього регіону.

Тривалість вегетаційного періоду рослин, їхній видовий склад, продуктивність рослинного покриву залежать від температурного режиму ґрунту. Збільшення температури ґрунту може негативно впливати на здатність кореневої системи засвоювати поживні речовини, на інтенсивність фотосинтезу, дихання, транспірацію та інші фізіологічні процеси у рослинах [17, 20, 28, 29]. Температура ґрунту залежить від температури повітря та від характеру самого ґрунту. Головним джерелом тепла є сонячна енергія. Незначна кількість тепла надходить до ґрунту із глибинних шарів Землі, а також утворюється внаслідок розкладу органічних речовин (перегною, рослинних решток, побутових міських відходів). Теплопоглинальна здатність ґрунту характеризує його можливості поглинати і відбивати сонячну енергію. Цей показник називають *альbedo* (кількість короткохвильової сонячної радіації, відбитої поверхнею ґрунту, що виражається у відсотках загальної сонячної радіації, яка досягає поверхні Землі). Чим вище альbedo, тим більше ґрунт віддзеркалює енергії та менше нагрівається. Ця величина найістотніше залежить від забарвлення ґрунту [15].

Отримані результати підтверджують те, що нафта, змінюючи забарвлення ґрунту на чорне, впливає на альbedo (зменшує його). Нафтозабруднені ґрунти СНР мали вищу температуру, порівняно з контролем, і нижчу – порівняно з тими, на яких росли рослини (табл. 1). Рослинний покрив запобігає перегріванню деградованих нафтозабруднених ґрунтів. За участю рослин у всіх досліджуваних точках температура ґрунту була нижчою в середньому на 3–5 °С.

Тепловий режим ґрунту разом із водним режимом визначають динаміку ґрунтотвірних процесів. Відомо, що вода має більшу теплоємність, ніж компоненти ґрунту, тож для підвищення температури вологого ґрунту потрібно більше сонячної енергії, ніж для сухого. Тому сухі піщані та супіщані ґрунти швидше нагріваються і швидше охолоджуються [14, 15]. Ґрунти Старосамбірського родовища переважно глинисті, відрізняються більшою теплоємністю, у вологому стані навесні повільніше нагріваються, а восени довше тримають тепло.

Таблиця 1

Температура нафтозабруднених ґрунтів Старосамбірського родовища ($\pm 1,1$ °C)

Досліджувані точки	Червень, 2016 р. t°пов. 24,8 °C		Вересень, 2016 р. t°пов. 20,3 °C		Березень, 2017 р. t°пов. 5,3 °C	
	без рослин	з рослинами	без рослин	з рослинами	без рослин	з рослинами
Свердловина № 60	0	22,2	20,7	20,0	19,5	3,2
	1	26,2	22,1	24,2	20,0	6,6
	2	25,9	21,9	24,0	19,9	7,1
	3	26,8	22,5	23,9	20,0	7,4
Свердловина № 65	0	22,2	20,7	20,0	19,5	3,2
	1	28,1	23,0	25,2	21,1	7,1
	2	27,5	22,9	24,7	20,7	6,9
	3	27,8	23,4	24,8	20,5	7,1
Свердловина № 76	0	22,2	20,7	20,0	19,5	3,2
	1	27,3	24,1	24,6	21,2	6,0
	2	27,6	22,8	24,4	21,0	6,9
	3	25,3	21,9	24,5	22,1	6,8

Примітки: 0 – контроль (ґрунт без нафти); 1 – ґрунт біля свердловини; 2 – ґрунт 10 м від свердловини; 3 – ґрунт 20 м від свердловини

Реакція ґрунтового розчину визначає умови життєдіяльності рослин і мікроорганізмів, які проживають у ґрунті, має значний вплив на біотичні та хімічні процеси, визначає характер надходження поживних речовин до рослин, впливає на закріплення гумусу, рухливість колоїдних фракцій, мінеральних елементів. Крім того, величина рН є фактором, який характеризує силу миттєвої дії кислот або лугів на ґрунт і рослини. Від значення рН залежить надходження мінеральних речовин у рослини [11, 14, 15]. Ми досліджували реакцію ґрунтового розчину нафтозабруднених ґрунтів СНР (табл. 2).

З отриманих результатів видно, що нафта трохи підлужнює рН ґрунту, порівняно з контролем (рН=6,4). Можливо, це відбувається внаслідок мікробіологічного розкладення бітумінозних речовин нафти і за рахунок розкладення органічних залишків. У літературі є дані про те, що нафтозабруднені ґрунти містять високі концентрації солей натрію. Натрій, включаючись у ґрунтовий поглинальний комплекс, витісняє катіони, які визначають ґрунтову кислотність, викликаючи тим самим підлужнення ґрунтів (значення рН водної витяжки ґрунту може збільшуватися від 5,0 до 8,3) [14, 25, 26].

Оперативну інформацію про фітотоксичність забрудненого ґрунту можна отримати, використовуючи насіння та проростки рослин як тест-об'єкти. Тест-функції, що використовують у біотестуванні, досить різноманітні: динаміка проростання насіння, відсоток схожості, довжина головного і бічних коренів, висота пагона тощо. На їхній основі визначають *фітотоксичний ефект* ґрунту [2, 6, 8, 28].

Визначаючи фітотоксичність відібраних проб ґрунту СНР, ми аналізували відносну схожість насіння (ВСН), відносну довжину кореня (ВДК) і відносну висоту пагона (ВВП) фітотесту *Linum usitatissimum* L. Встановлено залежності між початковими ростовими параметрами тест-культури *L. usitatissimum* і токсичністю нафтозабруднених ґрунтів СНР (рис. 2). З отриманих результатів видно, що найтоксичнішими були проби ґрунту, відібрані

на відстані 10 і 20 м від свердловин (варіанти 2 і 3): ВСН і ВВП становили менше ніж 20 % (свердловини №№ 60 і 65). Пагін *L. usitatissimum* проявив більш виражену реакцію на токсичність нафтозабруднених ґрунтів СНР, тоді як корінь – високу чутливість і в більшості варіантів не виростав. Зі зростанням токсичності нафтозабруднених ґрунтів (на відстані 10 і 20 м від свердловин) ріст пагона поступово пригнічувався. Дана залежність має лінійний характер. Такий високий фітотоксичний ефект вказує на максимальний рівень токсичності досліджуваних проб ґрунту, що може бути обумовлено додатковим навантаженням. Оскільки транспортування нафти зі СНР проводиться автотранспортом, там постійно відбуваються розливи нафти при наповнюванні автоцистерн і витоптування ґрунту, як наслідок – ґрунти ущільнюються, змінюється їхній гідрологічний режим, деградує рослинний покрив.

Таблиця 2

Актуальна кислотність (pH_{H_2O}) нафтозабруднених ґрунтів
(без рослинного покриву) Старосамбірського нафтового родовища

Варіанти	Червень, 2016 р.	Вересень, 2016 р.	Березень, 2017 р.
Свердловина №76			
1	7,2*	7,3	7,9
2	6,4	6,8	8,2
3	7,1	7,5	8,1
Свердловина №60			
1	7,7	7,7	7,8
2	7,3	7,8	8,0
3	7,6	7,8	8,1
Свердловина №65			
1	6,3	6,8	7,9
2	7,2	7,5	8,1
3	6,8	7,6	8,1

Примітки: 1 – ґрунт біля свердловини; 2 – ґрунт 10 м від свердловини; 3 – ґрунт 20 м від свердловини;
* pH контрольного варіанта – 6,4

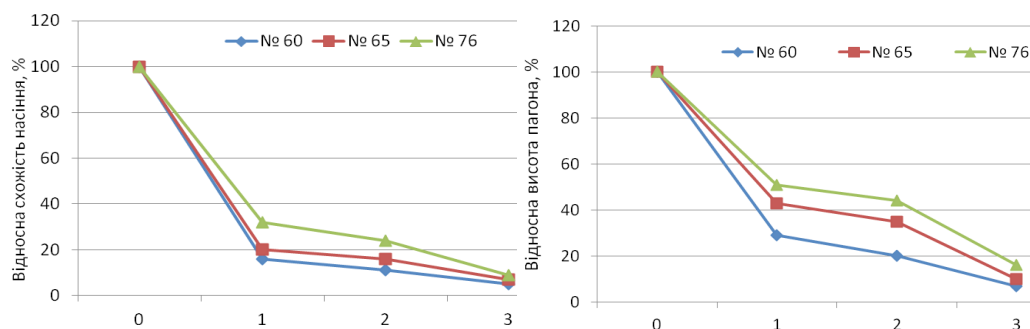


Рис. 2. Фітотоксичність нафтозабруднених ґрунтів Старосамбірського родовища свердловин №№ 60, 65, 76, виражена тест-показниками *L. usitatissimum* (різниця між відповідними показниками достовірна при $p < 0,05$): 0 – контроль (ґрунт без нафти); 1 – ґрунт біля свердловини; 2 – ґрунт 10 м від свердловини; 3 – ґрунт 20 м від свердловини

Для порівняння токсичності за ростовим фітотестом пропонують шкалу рівнів токсичності ґрунтів (табл. 3) [2].

На основі отриманих результатів (рис. 2), виведеної калібрувальної кривої (рис. 3) [4] і шкали рівнів токсичності ґрунтів (табл. 3) встановлено ступінь забруднення і приблизну концентрацію нафти у досліджуваних пробах ґрунту Старосамбірського нафтового родовища:

- *Свердловина № 60* – максимальний рівень токсичності, дуже сильне забруднення (понад 10 % нафти). Ця свердловина в експлуатації найдовше (із 1971 р.), розташована біля дороги, отримує ще додатковий вплив від автотранспорту, тому фітотоксичність ґрунтів – максимальна.
- *Свердловина № 65* – високий рівень токсичності, сильне забруднення (8–10 % нафти).
- *Свердловина № 76* – рівень токсичності вище середнього, середнє забруднення (6–8 % нафти).

Таблиця 3

Шкала рівнів токсичності ґрунтів [2]

Рівні пригнічення ростових процесів (фітотоксичний ефект), %	Рівень токсичності
0–20	Відсутність або слабкий рівень токсичності
20,1–40	Середній рівень
40,1–60	Вище середнього рівня
60,1–80	Високий рівень
80,1–100	Максимальний рівень

У попередніх дослідженнях було виявлено універсальність і чутливість фітотестів *Linum usitatissimum* L. та *Helianthus annuus* L. для оцінки токсичності нафтозабруднених ґрунтів (рис. 3) [4]. Практичне використання розробленого експрес-методу передбачало доцільність його застосування для фітооцінки токсичності нафтозабруднених ґрунтів, у даному випадку – Старосамбірського нафтового родовища.

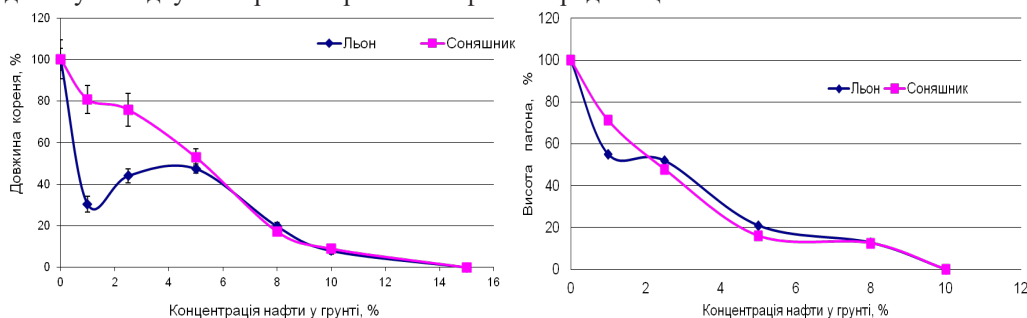


Рис. 3. Залежність довжини коренів і висоти пагонів *Linum usitatissimum* L. та *Helianthus annuus* L. від концентрації нафти у ґрунті [4]

Для достовірної кореляції між показниками фітотоксичності й кількісними характеристиками забруднювачів необхідно визначити вміст нафтопродуктів у ґрунтах Старосамбірського родовища фізико-хімічними методами. Проведені дослідження дають змогу зробити висновок, що ґрунти в регіоні потребують детального дослідження і впровадження заходів, які забезпечили би поліпшення їхнього якісного стану, зокрема, визначення оптимальних умов для проведення фіторе mediaції.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Атраментова Л. О., Утевська О. М. Біометрія. Х.: Ранок, 2007. 176 с.
2. Горова А., Куліна С. Оцінка токсичності ґрунтів Червоноградського гірничопромислового району за допомогою ростового тесту // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2008. Вип. 48. С. 189–194.

3. *Горова А. І., Павличенко А. В., Борисовська О. О.* Методика визначення токсичності ґрунтів за допомогою ростового тесту. Дніпропетровськ: НГУ, 2004. 26 с.
4. *Горон М. З., Джура Н. М., Романюк О. І.* та ін. Фітотестування як експрес-метод оцінки токсичності нафтозабруднених ґрунтів // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2012. Вип. 58. С. 185–192.
5. ГОСТ 17.4.3.04-85 Охрана природы. Почвы. Общие требования к контролю и охране от загрязнения.
6. *Губачов О. І.* Особливості використання рослин для біотестування ґрунтів з метою визначення рівня екологічної безпеки промислових територій // Наук. вісн. КУЕІТУ. Нові технології. 2010. № 3 (29). С. 164–171.
7. *Джура Н. М.* Можливості використання рослинних тест-систем для біомоніторингу нафтозабруднених ґрунтів // Біологічні Студії / *Studia Biologica*. 2011. Т. 5/№3. С. 183–196.
8. Застосування рослинних тест-систем для оцінки комбінованої дії факторів різної природи / Д.М. Гродзинський, Ю.В Шиліна, Н.К. Куцоконь [та ін.]. К.: Фітосоціоцентр, 2006. 60 с.
9. *Киреева Н. А., Мифтахова А. М., Кузяхметов Г. Г.* Рост и развитие сорных растений в условиях техногенного загрязнения почвы // Вестн. Башкир. ун-та. 2001. № 1. С. 32–34.
10. *Клімова Н.* Деякі питання методики оцінки стану забруднення ґрунтів унаслідок нафтогазовидобутку // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. геогр. 2006. Вип. 33. С. 144–151.
11. Концепція екологічного нормування допустимого антропогенного навантаження на ґрунтовий покрив / за ред. д.с-г.н., проф. С.А. Балюка, д.т.н., проф. М.І. Ромашенка. К.: Аграрна наука, 2004. 34 с.
12. *Кучеренко М. С., Бабенюк Ю. Д., Войціцький В. М.* Сучасні методи біохімічних досліджень. К.: Укрсоціоцентр, 2001. 424 с.
13. Методи біологічних та агрохімічних досліджень рослин і ґрунтів / З.М. Грицаєнко, А.О. Грицаєнко, В.П. Карпенко. К.: ЗАТ Нічлава, 2003. 320 с.
14. *Назаренко І. І., Польшина С. М., Нікорич В. А.* Ґрунтознавство. Чернівці: Книга – XXI, 2004. 400 с.
15. *Назимко В. В., Костенко В. К., Назимко О. І.* та ін. Ґрунтознавство: навч. посіб. для студ. еколог. спеціальностей. Донецьк, 2008. 198 с.
16. Определитель высших растений Украины / под ред. Д.Н. Доброчаева, М.И. Котова [и др.]. К.: Наук. думка, 1987. 548 с.
17. *Пиковский Ю. И., Геннадиев А. Н., Чернянский С. С.* и др. Проблема диагностики и нормирования загрязнения почв нефтью и нефтепродуктами // Почвоведение. 2003. № 9. С. 1132–1140.
18. *Подан І., Джура Н., Реслер І.* Вивчення рослинного покриву Старосамбірського нафтового родовища // Молодь і поступ біології: Х Міжнар. наук. конф. студентів та аспірантів: зб. тез. 8–11 квітня 2014 р. Львів: СПОЛОМ, 2014. С. 120–121.
19. Програма розвитку видобутку нафти і газу підприємствами ВАТ “Укрнафта” до 2010 р.: Звіт ЦНДЛ ВАТ “Укрнафта”; Купер І.М. Івано-Франківськ, 2000. дог. 00/02.
20. *Процько Я. І.* Вплив нафти та нафтопродуктів на ґрунтовий покрив // Вісн. Полтав. держ. аграр. академії. 2010. № 2. С. 189–191.
21. *Руденко С. С., Костишин С. С., Морозова Т. В.* Загальна екологія: практ. курс: навч. посіб. Ч. 1, 2. Чернівці: Рута, 2003. 320 с.
22. *Цайтлер М. Й.* Відновлення рослинного покриву і зміни структури ценопопуляцій трав’яних рослин на нафтозабруднених територіях Бориславського нафтового родовища: автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.16. Дніпропетровськ, 2001. 16 с.

23. Цайтлер М. Й. Екологічні наслідки довготривалого нафтовидобутку на Бориславському нафтовому родовищі // Праці НТШ. (Екологічні проблеми Львівщини). Львів, 2000. № 7. С. 84–90.
24. Шевчик Л. З. Екологічна оцінка та фіторе mediaція нафтозабруднених ґрунтів: автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.16. Дніпро, 2017. 23 с.
25. Pavlychenko A., Kovalenko A. The investigation of rock dumps influence to the levels of heavy metals contamination of soil // Mining of Mineral Deposits. Leiden, The Netherlands: CRC Press / Balkema, 2013. P. 237–238.
26. Gorova A., Pavlychenko A., Kulyna S. Ecological problems of post-industrial mining areas // Geomechanical processes during underground mining. Leiden, The Netherlands: CRC Press / Balkema: 2012. P. 35–40.
27. Banks M., Schultz K. Comparison of plants for germination toxicity tests in petroleum contaminated soil // Water Air Soil Pollut. 2005. Vol. 167. P. 211–219.
28. Grant W. Higher plant assays for the detection of the chromosomal aberration and gene mutation – a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals // Mutat. Res. 1999. N 426. P. 107–112.
29. Ziolkowska A., Wyszowski M. Toxicity of petroleum substances to microorganisms and plants // Ecol. Chem. Eng. 2010. Vol. 17. N 1. P. 73–82.

Стаття: надійшла до редакції 14.06.17

доопрацьована 28.09.17

прийнята до друку 04.10.17

ECOLOGICAL CONSEQUENCES OF EXTENDED OIL PRODUCTION AT STARYI SAMBIR PETROLEUM DEPOSIT

N. Dzhura, I. Podan

*Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskyyi St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: Gjurana@ukr.net*

The impact of extended oil production on soil and vegetation cover of Staryi Sambir petroleum deposit was studied. As objects of study, we used the oil wells № 60, 65, 76 the deposit. The oil-free soil was considered to be a standard. Temperature, acidity, and phytotoxicity of the oil-polluted soil near the deposits were analyzed. Vegetation type, as well as species affiliation of the deposit, were defined, so as to use them for the future selection of resistant species for phytoremediation technology usage. It was verified, that oil-polluted soil had a higher temperature in comparison with the standard. Vegetative cover prevented the soil from overheating – the temperature on the areas with plants was 3–5 °C lower. The pollution degree of the analyzed samples of soil was defined: *The oil well № 60* – maximum level of toxicity, very strong pollution. *The oil well № 65* – high level of toxicity, strong pollution. *The oil well № 76* – above-average level of toxicity, average pollution. On the basis of the results of our research, the conclusion was made – the soil of Staryi Sambir region needs to be thoroughly examined, and the measures need to be taken in order to improve its state and to provide proper conditions for future phytoremediation.

Keywords: Staryi Sambir petroleum deposit, pollution, oil, soil, *phytotoxicity*

РОСТОВІ ПАРАМЕТРИ ДЕЯКИХ ВИДІВ ГАЗОННИХ ТРАВ ЗА УМОВ КОМПЛЕКСНОГО ФЛУОРИДНО-СУЛЬФІТНОГО ЗАБРУДНЕННЯ ҐРУНТУ

Ю. Приседський

Донецький національний університет імені Василя Стуса
вул. 600-річчя, 2, Вінниця 21021, Україна
e-mail: yu.prysedskiy@donnu.edu.ua

Забруднення навколишнього середовища викидами промислових підприємств призводить до суттєвого погіршення його стану, наслідком якого є зміна функціонування фітоценозів. Важливим компонентом екосистем, у тому числі і штучних, є трав'янисті рослини, які виконують важливі функції в антропогенно трансформованих екосистемах. Однак відомостей про дію комплексного флуоридно-сульфітного забруднення ґрунту на трав'янисті рослини практично немає. У зв'язку з цим ми вивчали вплив забруднення ґрунту сульфатами і флуоридами на ростові процеси деяких видів газонних трав. Як об'єкти досліджень використані ковила українська (*Stipa ucrainica* L.), костриця червона (*Festuca rubra* L.), мітлиця повзуча (*Agrostis stolonifera* L.), мітлиця тонка (*Agrostis capillaris* L.), райграс пасовищний (пажитниця багаторічна, *Lolium perenne* L.), стоколос польовий (*Bromus arvensis* L.), тонконіг лучний (*Poa pratensis* L.). Насіння вирощували на ґрунті, до якого вносили забруднювачі (сульфіт натрію і флуорид натрію) згідно зі схемою повного двофакторного експерименту з трьома рівнями факторів. Аналіз реакції рослин на флуоридно-сульфітне забруднення ґрунту свідчить, що досліджені види різняться за характеристиками росту й накопичення біомаси. Так, у стійких костриці червоної, мітлиці повзучої та райграсу пасовищного не відбувається вірогідних змін ростових показників. У малостійких ковили української, мітлиці тонкої, стоколосу польового і тонконогу лугового спостерігали пригнічення ростових параметрів залежно від їхньої стійкості, складу та концентрацій забруднення. Розраховані рівняння залежності індексу пригнічення ростових процесів від складу та концентрацій поллютантів дають змогу прогнозувати ріст рослин на забруднених територіях і ефективніше підбирати видовий склад рослин для озеленення.

Ключові слова: тонконогові рослини, забруднення ґрунту, ростові параметри, індекс пригнічення

Забруднення довкілля, яке спричинюється виробничою діяльністю людини, набуло останнім часом значення стресового екологічного фактора, що порушує функціонування природних і штучних екосистем [4, 7, 8, 10, 19, 20, 22, 26, 27]. Кінцевим накопичувачем забруднювачів, що потрапляють у навколишнє середовище, є ґрунт, на який осаджуються газоподібні забруднювачі й аерозолі з атмосфери, потрапляють тверді відходи промисловості. Забруднення ґрунту чинить значний негативний вплив на фізіолого-біохімічні процеси [11, 15, 17, 18, 22–25, 28], ростові параметри [3, 12, 19] та продуктивність [21] рослин. Разом з тим, рослини відіграють важливу роль в оптимізації навколишнього середовища, будучи природним фільтром.

Важливим компонентом екосистем, у тому числі і штучних, є трав'янисті рослини. Газони виконують дуже важливі санітарно-гігієнічні, очисні та декоративні функції в антропогенно трансформованих екосистемах [1, 2, 5, 6, 9]. Однак відомостей про дію на трав'янисті рослини флуоридно-сульфітного забруднення ґрунту, яке є основним типом

забруднення на підприємствах із виробництва фосфорної кислоти і фосфатів, практично немає [12, 16]. У зв'язку з цим ми вивчали вплив забруднення ґрунту сульфітами і флуоридами на ростові процеси деяких видів газонних трав.

Матеріали та методи

Як об'єкти досліджень використано рослини 7 видів родини Тонконогові: ковила українська (*Stipa ucrainica* L.), костриця червона (*Festuca rubra* L.), мітлиця повзуча (*Agrostis stolonifera* L.), мітлиця тонка (*Agrostis capillaris* L.), райграс пасовищний (пажитниця багаторічна, *Lolium perenne* L.), стоколос польовий (*Bromus arvensis* L.), тонконіг лучний (*Poa pratensis* L.).

Насіння висаджували у посудини з ґрунтом (чорнозем із вмістом гумусу 3,5 %), до якого вносили забруднювачі (сульфіт натрію і флуорид натрію) згідно із планом повного двофакторного експерименту з трьома рівнями факторів (табл. 1). У контрольні посудини (варіант 1, табл. 1) забруднювачі не вносили. Вирощування тривало протягом 30 днів за освітленості 12 000 люкс, тривалості світлового дня 14 год, температурі 20–22 °С і вологості ґрунту 70 % загальної вологості.

У рослин вимірювали довжину надземної частини і коренів та суху й сиру масу. За отриманими даними ростових параметрів розраховували індекс пригнічення росту за формулою:

$$I = \frac{I_{\text{досл}}}{I_{\text{контр}}}, \quad [1]$$

де: I – індекс пригнічення росту; $I_{\text{досл}}$ – довжина органа рослини у дослідних варіантах, см; $I_{\text{контр}}$ – довжина органа рослини у контрольному варіанті, см.

Згідно з формулою, показники індексу пригнічення, менші за 1, відповідають пригніченню, а більші за 1 – стимулюванню росту.

Таблиця 1

Концентрації забруднювачів у ґрунті згідно із планом експерименту
(концентрації подані у перерахунку на флуор і сульфур іони)

№ варіанта	Концентрація забруднювача		№ варіанта	Концентрація забруднювача		№ варіанта	Концентрація забруднювача	
	F ⁻ (мг/кг)	S ⁺⁴ (г/кг)		F ⁻ (мг/кг)	S ⁺⁴ (г/кг)		F ⁻ (мг/кг)	S ⁺⁴ (г/кг)
1	0	0	4	0	1	7	0	2
2	100	0	5	100	1	8	100	2
3	200	0	6	200	1	9	200	2

Усі вимірювання проводили в 10-кратній повторності. Отримані результати піддавали статистичній обробці за методами дисперсійного та багатofакторного регресійного аналізу. Порівняння середовищ проводили за методом Даннета [13, 14]. Отримані висновки вважалися вірогідними за умови перевищення обчисленими значеннями стандартних для $\alpha=0,05$.

Результати і їхнє обговорення

Аналіз реакції рослин на комплексне флуоридно-сульфітне забруднення ґрунту свідчить, що досліджені види різняться за своєю стійкістю. Так, у *F. rubra*, *A. stolonifera* та *L. perenne* (табл. 2) жоден із варіантів забруднення не викликав вірогідних змін росту надземних частин.

Однак ріст кореневих систем у *F. rubra* та *A. stolonifera* за комплексної дії флуоридів і сульфідів вірогідно пригнічується на 22,8–35,0 % порівняно з рослинами, що ростуть

на незабрудненому ґрунті. У *L. perenne* спостерігали вірогідне збільшення ростових параметрів корневих систем на 18,0–34,0 % порівняно з контрольними рослинами.

Розрахована залежність між ступенем забруднення ґрунту та індексом пригнічення показує, що у костриці безостої, мітлиці повзучої та райграсу пасовищного ці рівняння мають вигляд прямої лінії, паралельної до осі абсцис (для надземної частини) або повільно змінюваної кривої з малими коефіцієнтами пропорційності.

Інші досліджувані види рослин у відповідь на дію забруднення ґрунту значно зменшували свої ростові показники. Причому ріст надземних частин *S. ucrainica*, *A. capillaris*, *B. arvensis* вірогідно пригнічувався лише за комплексної дії забруднювачів. У *P. pratensis* ріст надземних частин зазнав суттєвого зниження (на 10,1–44,5 %) за всіх варіантів забруднення. Ріст корневих систем у цих видів рослин пригнічується на 15,9–97,0 % порівняно з рослинами, вирощуваними без внесення забруднювачів.

Таблиця 2

Вплив забруднення ґрунту сполуками флуору та сульфору на ріст газонних трав

№ варіанта	Висота надземної частини, см		Індекс пригнічення		Довжина коренів, см		Індекс пригнічення	
	M±m	% до контролю	Значення	Рівняння	M±m	% до контролю	Значення	Рівняння
1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Stipa ucrainica</i> L.								
1	4,80±0,15	100,0	1,00		1,83±0,06	100,0	1,00	
2	5,34±0,16	111,3	1,24		1,54±0,05	84,2	0,85	
3	4,47±0,14	93,1	1,12		1,63±0,09	89,1	0,88	
4	5,85±0,17**	121,9	1,11		1,61±0,07	87,9	0,91	
5	5,15±0,18	107,3	1,06		1,59±0,12	86,9	0,88	
6	5,35±0,12	111,5	1,11		0,79±0,02**	43,2	0,35	
7	5,39±0,15**	112,3	0,94		2,51±0,16**	137,2	1,40	
8	5,32±0,27	110,8	1,12		0,97±0,03**	53,0	0,54	
9	0,53±0,02**	11,0	0,11		0,33±0,02**	18,0	0,17	
<i>Festuca rubra</i> L.								
1	4,50±0,33	100,0	1,00		1,86±0,08	100,0	1,00	
2	4,64±0,18	103,1	1,09		1,72±0,09	92,5	0,94	
3	4,95±0,18	110,0	1,18		2,23±0,07	119,9	1,22	
4	5,07±0,12	112,7	1,18		1,79±0,14	96,2	0,98	
5	4,57±0,14	101,6	1,11		1,65±0,05	88,7	0,89	
6	4,57±0,14	101,6	1,06		1,45±0,07**	77,9	0,79	
7	4,73±0,15	105,1	1,10		1,21±0,0**6	65,1	0,66	
8	4,36±0,16	96,9	1,01		1,24±0,07**	66,7	0,67	
9	4,76±0,22	105,8	1,12		1,35±0,03**	72,6	0,74	
<i>Agrostis stolonifera</i> L.								
1	3,58±0,11	100,0	1,00		1,07±0,03	100,0	1,00	
2	3,51±0,07	98,0	0,99		0,79±0,03**	73,8	0,75	
3	4,40±0,12	122,9	1,21		1,76±0,06**	164,5	1,64	
4	4,62±0,13**	129,0	1,29		0,72±0,03**	67,3	0,67	
5	4,39±0,11**	122,6	1,23		0,94±0,03**	87,9	0,89	
6	4,39±0,15**	122,6	1,23		0,73±0,03**	68,2	0,68	
7	4,73±0,17**	132,1	1,33		0,84±0,02**	78,5	0,79	
8	4,11±0,16**	114,8	1,15		0,70±0,02**	65,4	0,68	
9	4,20±0,12**	117,3	1,18		0,63±0,03**	58,9	0,59	

$$Y = 1,0000 + 0,0042 \times X_1 + 0,2560 \times X_2 - 0,0122 \times X_1 \times X_2 + 0,0001 \times X_1^2 \times X_2 - 0,1430 \times X_2^2 + 0,0070 \times X_1 \times X_2^2$$

$$Y = 1,0926$$

$$Y = 1,0000 - 0,0083 \times X_1 + 0,0001 \times X_1^2 - 0,5590 \times X_2 + 0,0219 \times X_1 \times X_2 - 0,0001 \times X_1^2 \times X_2 + 0,2260 \times X_2^2 - 0,0092 \times X_1 \times X_2^2 + 0,0001 \times X_1^2 \times X_2^2$$

$$Y = 0,9977 - 0,0032 \times X_1 - 0,3012 \times X_2 + 0,0142 \times X_1 \times X_2 + 0,2382 \times X_2^2 - 0,0085 \times X_1 \times X_2^2$$

$$Y = 1,0020 + 0,0006 \times X_1 + 0,1627 \times X_2 - 0,0034 \times X_1 \times X_2 - 0,1720 \times X_2^2 + 0,0017 \times X_1 \times X_2^2$$

1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Agrostis capillaris</i> L.								
1	7,88±0,22	100,0	1,00	$Y = 1,0119 + 0,0007 \times X_1 + 0,1831 \times X_2 + 0,0124 \times X_1 \times X_2 - 0,0710 \times X_1^2 - 0,0068 \times X_1 \times X_2^2$	1,36±0,05	100,0	1,00	$Y = 1,0540 - 0,0038 \times X_1 + 0,0525 \times X_2 + 0,0045 \times X_1 \times X_2 - 0,0975 \times X_2^2 - 0,0023 \times X_1 \times X_2^2$
2	8,39±0,45	106,5	1,08		1,07±0,05**	78,7	0,79	
3	7,98±0,29	101,3	1,02		0,90±0,03**	66,2	0,68	
4	8,70±0,34	110,4	1,12		1,35±0,05	99,3	1,04	
5	11,22±0,51**	142,4	1,45		1,26±0,04	92,7	0,95	
6	8,94±0,25	113,4	1,15		1,43±0,05	105,1	1,07	
7	8,57±0,26	108,8	1,11		1,09±0,04**	80,1	0,82	
8	6,90±0,22	87,6	0,89		0,60±0,03**	44,1	0,45	
9	5,28±0,17**	67,0	0,68		0,48±0,03**	35,3	0,36	
<i>Lolium perenne</i> L.								
1	17,17±0,77	100,0	1,00	$Y = 1,0937$	2,85±0,17	100,0	1,00	$Y = 1,0243 - 0,0015 \times X_1 + 0,4514 \times X_2 - 0,0015 \times X_1 \times X_2 - 0,1518 \times X_2^2$
2	18,98±0,67	110,5	1,12		2,91±0,14	102,1	1,06	
3	17,38±0,71	101,2	1,03		3,38±0,18**	118,6	1,23	
4	18,68±0,51	108,8	1,11		3,70±0,17**	129,8	1,33	
5	19,15±0,81	111,5	1,12		3,03±0,18	106,3	1,11	
6	20,01±0,79**	116,5	1,19		3,80±0,14**	133,3	1,38	
7	19,02±0,53	110,8	1,13		3,82±0,24**	134,0	1,38	
8	17,90±0,80	104,2	1,06		2,85±0,11	100,0	1,04	
9	18,47±0,73	107,6	1,09		2,79±0,20	97,9	1,02	
<i>Bromus arvensis</i> L.								
1	16,52±0,92	100,0	1,00	$Y = 1,0551 + 0,0001 \times X_1 - 0,1765 \times X_2 - 0,0050 \times X_1 \times X_2 - 0,1492 \times X_2^2 + 0,0025 \times X_1 \times X_2^2$	9,57±0,25	100,0	1,00	$Y = 1,0073 + 0,0017 \times X_1 - 0,8665 \times X_2 - 0,0104 \times X_1 \times X_2 + 0,1955 \times X_2^2 + 0,0047 \times X_1 \times X_2^2$
2	17,92±0,80	108,5	1,11		9,96±0,37	104,1	1,05	
3	17,12±1,09	103,6	1,08		7,23±0,21**	75,5	0,76	
4	12,22±0,57**	73,9	0,77		3,12±0,14**	32,6	0,33	
5	6,60±0,25**	39,9	0,42		0,83±0,03**	8,7	0,09	
6	4,41±0,37**	26,7	0,28		0,78±0,03**	8,2	0,06	
7	2,21±0,11**	13,4	0,14		0,50±0,02**	5,2	0,06	
8	1,72±0,10**	10,4	0,11		0,48±0,02**	5,0	0,05	
9	1,52±0,12**	9,2	0,09		0,29±0,02**	3,0	0,03	
<i>Poa pratensis</i> L.								
1	9,55±0,26	100,0	1,00	$Y = 0,9950 - 0,0009 \times X_1 - 0,2937 \times X_2 + 0,0106 \times X_1 \times X_2 - 0,0001 \times X_1^2 \times X_2 + 0,0880 \times X_2^2 - 0,0053 \times X_1 \times X_2^2$	1,90±0,12	100,0	1,00	$Y = 1,0408 - 0,2248 \times X_2$
2	8,59±0,53	89,9	0,90		2,08±0,19	109,5	1,09	
3	8,78±0,39	91,9	0,92		1,69±0,076	96,3	0,93	
4	7,55±0,54**	79,1	0,79		1,83±0,11	91,1	1,01	
5	5,30±0,48**	55,5	0,93		1,73±0,11	91,1	0,94	
6	5,30±0,48**	55,5	0,56		1,33±0,04**	70,0	0,71	
7	7,21±0,47**	75,5	0,75		0,99±0,07**	52,1	0,54	
8	6,53±0,38**	68,4	0,73		1,03±0,06**	54,2	0,56	
9	6,01±0,45**	62,9	0,64		1,03±0,07**	54,2	0,56	

Рівняння регресії свідчать про значну залежність індексу пригнічення від складу та концентрацій забруднювачів. Значення коефіцієнтів пропорційності для досліджуваних рослин у цих рівняннях значно більша, ніж для стійких видів.

Результати проведених нами досліджень дають підстави зробити висновки про значний вплив забруднення ґрунту флуоридами та сульфїтами на накопичення біомаси у досліджуваних рослин. Так, у *F. rubra* (рис. 1) у варіантах із низькими рівнями забруднювачів та індивідуальної дії флуоридів і сульфїтів (вар. 2–7) не спостерігали вірогідних змін у накопиченні сирї та сухої маси рослин. Варіанти 8 і 9 з комплексною дією поліутантів

спричиняли вірогідне зниження біомаси цієї рослини на 33,9–90,9 % порівняно з контрольними рослинами залежно від концентрації забруднювачів.

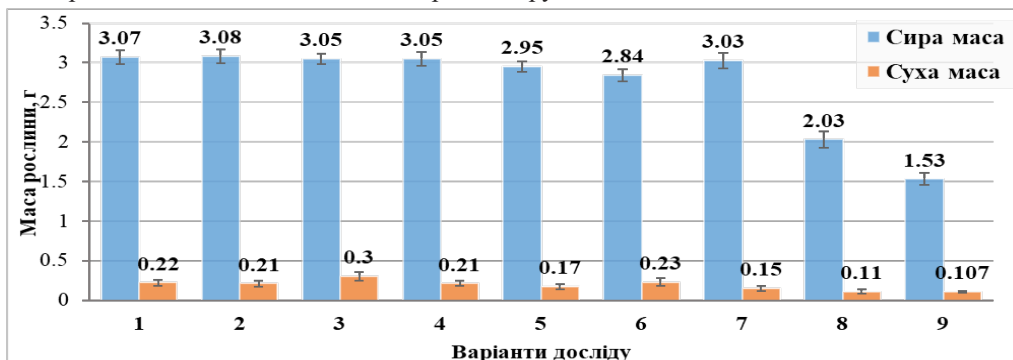


Рис. 1. Накопичення біомаси рослинами *F. rubra* за умов фторидного та сульфїтного забруднення ґрунту. 30-та доба росту. Варіанти дослідів згідно з табл. 1

У *L. perenne* (рис. 2) флуоридне забруднення чинить певний негативний вплив на накопичення сирової маси рослинами. Цей показник у варіантах 2 і 3 знижується на 18,5–25,0 % порівняно з контролем, в інших варіантах сира маса не змінюється або збільшується на 15,5–22,3 % порівняно з рослинами, вирощуваними на незабрудненому ґрунті (варіант 1). Суха маса практично не зазнає вірогідних змін у всіх варіантах дослідів.

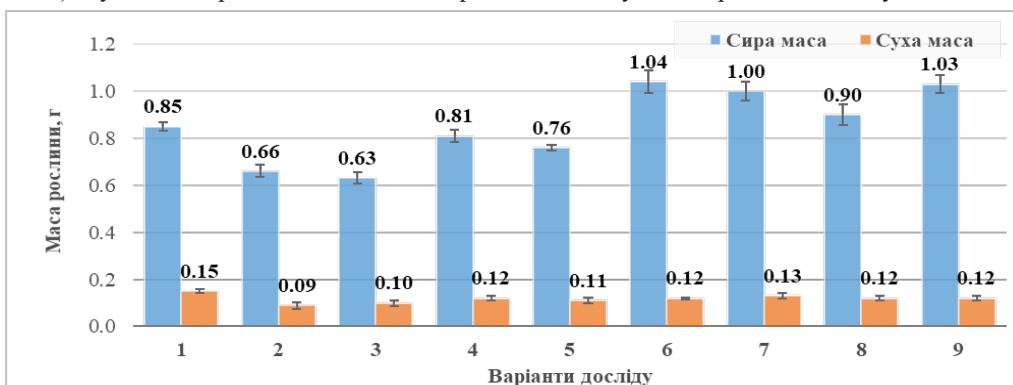


Рис. 2. Накопичення біомаси рослинами *L. perenne* за умов фторидного та сульфїтного забруднення ґрунту. 30-та доба росту. Варіанти дослідів згідно з табл. 1

У *S. ucrainica* практично всі варіанти забруднення не спричиняють вірогідних змін накопичення сирової та сухої маси (рис. 3). Поряд із тим, за комплексного забруднення ґрунту флуоридом і сульфїтом натрію у високих концентраціях (200 мг/кг і 2 г/кг ґрунту відповідно, вар. 9) відбувається загибель усіх рослин.

У *A. stolonifera* забруднення ґрунту спричинює зниження біомаси рослин на 19,1–25,3 % порівняно з рослинами, які вирощуються на незабрудненому ґрунті. Найбільш небезпечним для *A. stolonifera* виявилось сульфїтне забруднення ґрунту у високій концентрації (2 г/кг) та комплексне забруднення (вар. 8 та 9). За цих умов сира маса дослідних рослин становить 72,5–18,5 % від рівня контрольних рослин, а суха – 60,0–25,0 % від контролю (рис. 4).

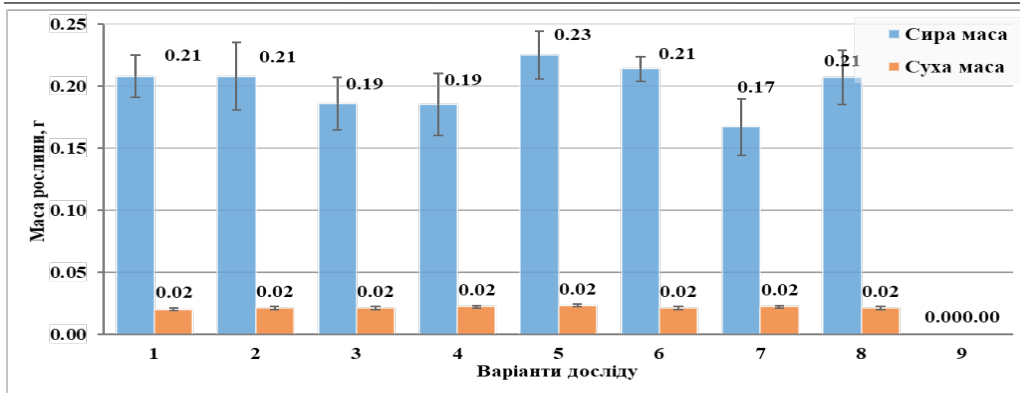


Рис. 3. Накопичення біомаси рослинами *S. ucrainica* за умов фторидного та сульфїтного забруднення ґрунту. 30-та доба росту. Варіанти дослідів згідно з табл. 1

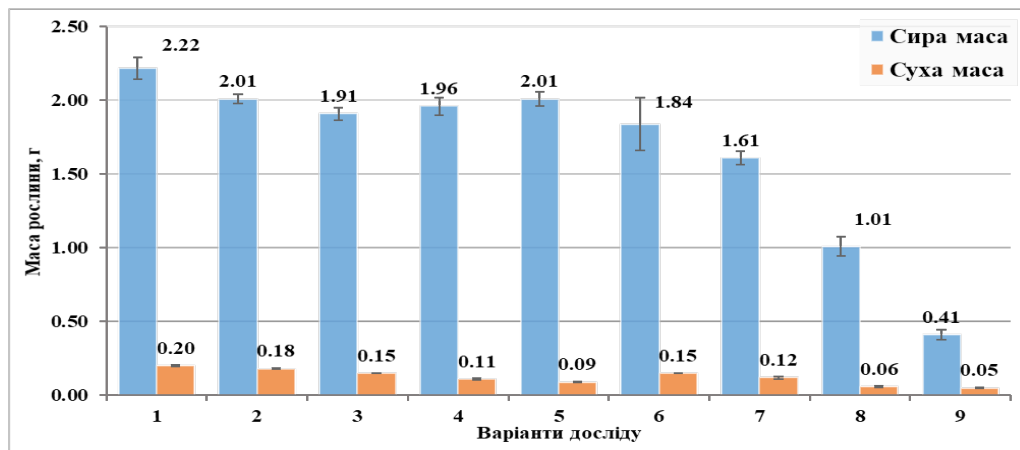


Рис. 4. Накопичення біомаси рослинами *A. stolonifera* за умов фторидного та сульфїтного забруднення ґрунту. 30-та доба росту. Варіанти дослідів згідно з табл. 1

A. capillaris (рис. 5) характеризується відсутністю вірогідної реакції на забруднення ґрунту незалежно від складу та кількості забруднювачів.

У *B. arvensis* (рис. 6) накопичення біомаси гальмується на 8,8–96,5 % за всіх варіантів. Лише у варіанті 2 відбувається незначне збільшення сирової маси (на 10,5 % порівняно з контролем). Найбільш токсичною виявилась висока концентрація сульфїту натрію (вар. 7), за якої всі рослини загинули. Флуоридне забруднення виявилось менш токсичним. Зміни сухої маси рослин у цього виду відбуваються аналогічно змінам сирової маси.

Аналіз отриманих даних дає підстави зробити висновок про значну токсичність сульфїтного забруднення ґрунту для *P. pratensis* (рис. 7). У варіантах із внесенням 1 г/кг (вар. 4) та 2 г/кг (вар. 7) сульфору у ґрунт пригнічення накопичення сирової маси становить 33,7–60,0 %. У варіантах із низькою концентрацією флуору та високим вмістом сульфору цей показник зменшується в 1,3–1,5 рази порівняно з рослинами, вирощуваними без внесення забруднювачів. Комплексне забруднення високими концентраціями забруднювачів (вар. 8 і 9) призводить до зменшення сирової маси рослин у 1,5–2,1 рази. За аналогічною закономірністю змінюється і суха маса рослин цього виду.

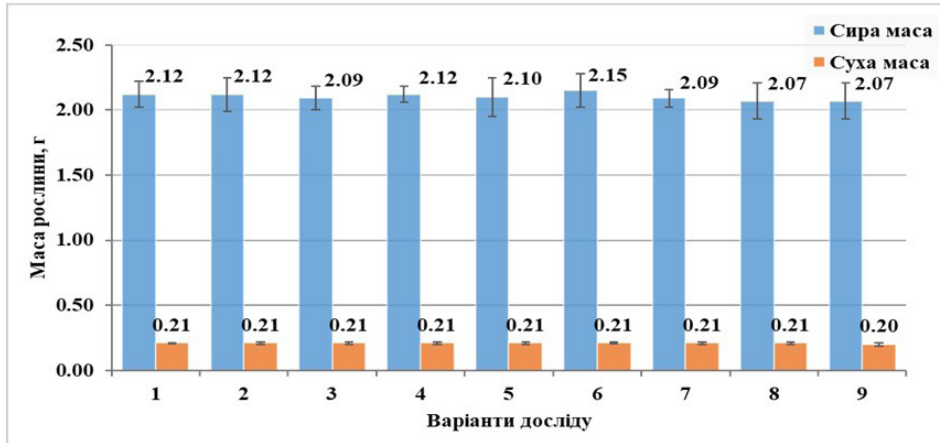


Рис. 5. Накопичення біомаси рослинами *A. capillaris* за умов фторидного та сульфїтного забруднення ґрунту. 30-та доба росту. Варіанти дослідів згідно з табл. 1

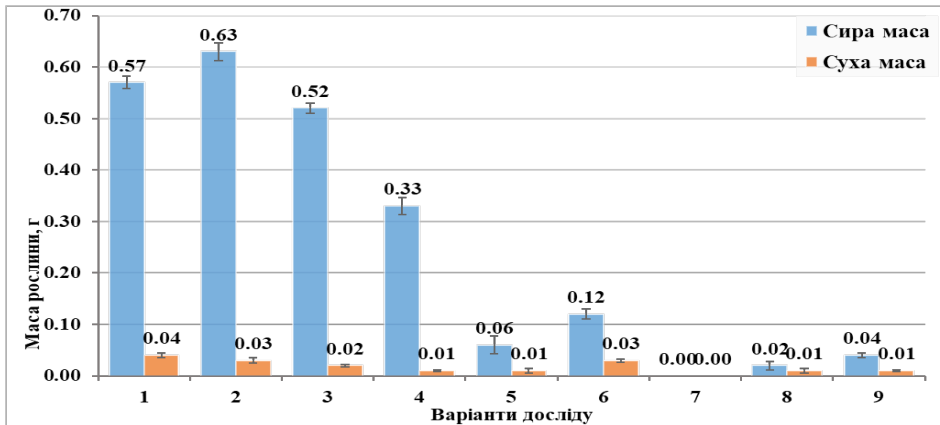


Рис. 6. Накопичення біомаси рослинами *B. arvensis* за умов фторидного та сульфїтного забруднення ґрунту. 30-та доба росту. Варіанти дослідів згідно з табл. 1

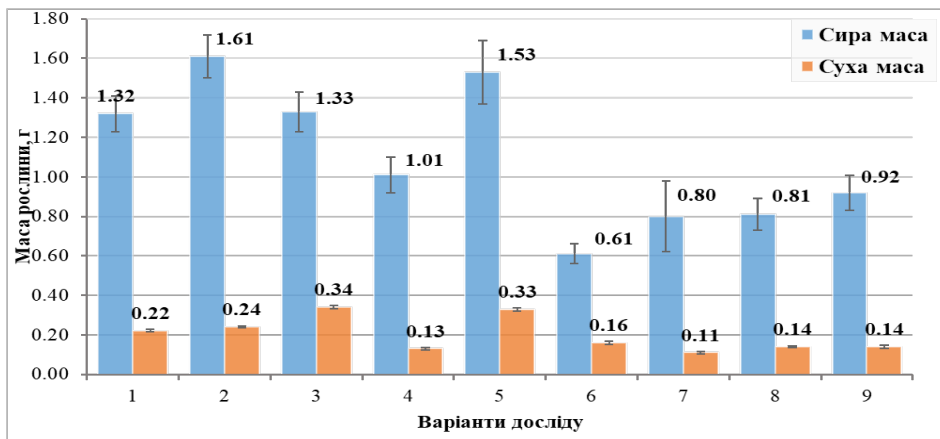


Рис. 7. Накопичення біомаси рослинами *P. pratensis* за умов фторидного та сульфїтного забруднення ґрунту. 30-та доба росту. Варіанти дослідів згідно з табл. 1

Таким чином, флуоридно-сульфітне забруднення ґрунту значно впливає на ріст і накопичення сирової та сухої маси у вивчених видів рослин родини Тонконогові, яке залежить від видової специфіки рослин, складу та концентрації забруднювачів. Встановлено, що кореневі системи досліджених рослин більш чутливі до забруднення, ніж їхня надземна частина.

За результатами проведених нами досліджень можна зробити висновок про високу стійкість до флуоридно-сульфітного забруднення ґрунту *F. rubra* та *L. Perenne*. Інші вивчені види в більшості варіантів виявили досить високу стійкість до низьких концентрацій, але сильно пошкоджувалися за комплексної дії високих концентрацій забруднювачів. Отримані рівняння змін індексу пригнічення росту дають змогу використовувати їх для прогнозування стійкості рослин вивчених нами видів під час проведення озеленувальних робіт у зоні забруднення.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Григорюк І. П., Лихолат Ю. В. Створення та догляд за газонами: метод. рекомендації. К.: НУБіП, 2014. 64 с.
2. Григорюк І. П., Яворовський П. П., Лихолат Ю. В. Технології вирощування і біорегуляція стійкості газонних рослин у міському урбанізованому середовищі: монографія. К.: НУБіП України, 2014. 223 с.
3. Денчиля-Сакаль Г. М., Ніколайчук В. І., Колесник А. В., Вакерич М. М. Реакції рослин конюшини на забруднення ґрунту солями цинку // Вісн. Дніпропетр. ун-ту. Біологія. Екологія. 2012. Вип. 20. Т. 2. С. 18–24.
4. Льюн Г. М. Загрязнители атмосферы и растения. К.: Наук. думка, 1978. 247 с.
5. Лихолат Ю. В. Еколого-фізіологічні особливості багаторічних дерноутворюючих злаків техногенних територій: монографія. Дніпропетровськ: Вид-во Дніпропетр. ун-ту, 1999. 210 с.
6. Лихолат Ю. В., Григорюк І. П. Використання дерноутворюючих трав для діагностики рівня забруднення навколишнього середовища важкими металами // Доп. НАН України. 2005. № 8. С. 196–200.
7. Лобачевська О., Маєвська С. Вплив селену і важких металів на ріст і розвиток моху *Furaria hygrometrica* HEDW // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2000. Вип. 25. С. 116–122.
8. Мельник Т. І. Вплив урбанізації на стан популяцій модельних видів рудеральних рослин (м. Суми) // Укр. ботан. журнал. 2005. Т. 62. № 3. С. 349–359.
9. Мицик Л. П., Лихолат Ю. В. Дерновий покрив техногенних територій: монографія. Дніпропетровськ: ДДУ, 1997. 92 с.
10. Николаевский В. С. Биологические основы газоустойчивости растений. Новосибирск: Наука, 1979. 80 с.
11. Приймак О. П. Фітотоксичний вплив SO_2 , NO_2 та іонів свинцю на вегетативні органи декоративних рослин // Вісн. Дніпропетр. ун-ту. Біологія. Екологія. 2012. Вип. 20. Т. 1. С. 78–83.
12. Приседський Ю. Г. Вплив забруднення ґрунту фторидами та сульфітами на ростові показники деяких видів квітково-декоративних рослин // Вісн. Дніпропетр. держ. аграрно-економ. ун-ту. 2014. № 1 (33). С. 115–119.
13. Приседський Ю. Г. Статистична обробка результатів біологічних експериментів. Донецьк: Кассіопея, 1999. 210 с.
14. Приседський Ю. Г. Пакет програм для проведення статистичної обробки результатів біологічних експериментів. Донецьк: ДонНУ, 2005. 75 с.

15. Aboal J. R., Fernández J. A., Carballeir A. Oak leaves and pine needles as biomonitors of airborne trace elements pollution // *Environ. Exp. Bot.* 2004. Vol. 51. P. 215–225.
16. Arnesen A. K. M. Availability of fluoride to plants grown in contaminated soils // *Plant and Soil.* 1997. Vol. 197 (1). P. 13–25.
17. Baunthiyal M., Sharma V. Response of fluoride stress on plasma membrane H⁺-ATPase and vacuolar H⁺-ATPase activity in semi-arid plants // *Ind. J. Plant Physiol.* 2012. Vol. 19. N 3. P. 10–214.
18. Boukhris A., Laffont-Schwob I., Rabier J. et al. Changes in mesophyll element distribution and phytometabolite contents involved in fluoride tolerance of the arid gypsum-tolerant plant species *Atractylis serratuloides* Sieber ex Cass. (Asteraceae) // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2015. Vol. 22. Issue 10. P. 7918–7929.
19. Das P., Samantaray S., Rout G. R. Studies on cadmium toxicity in plants: a review // *Environ. Pollution.* 1997. Vol. 98. N 1. P. 29–36.
20. Guimarães E. T., Domingos M., Alves E. S. et al. Detection of the genotoxicity of air pollutants in and around the city of São Paulo (Brazil) with the *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) assay // *Environ. Exp. Bot.* 2000. Vol. 44. Issue 1. P. 1–8.
21. Kisku G. C., Baqrmann S. C., Bhargava S. K. Contamination of soil and plants with potentially toxic elements irrigated with mixed industrial effluent and its impact on the environment // *Water Air Soil Pollut.* 2000. Vol. 120 (1). P. 121–137.
22. Kostyshina S. S., Perepelitsab O. O., Smetanyukb O. I. Peculiarities of fluoride accumulation in the plants of meadow biotopes of Northern Bukovyna // *Contemp. Probl. Ecol.* 2011. Vol. 4. N 6. P. 621–625.
23. Kozyrenko M. M., Artyukova E. V., Shmakov V. N., Konstantinov Yu. M. Effect of fluoride pollution on genetic variability of *Larix gmelinii* (Pinaceae) in East Siberia // *J. For. Res.* 2007. Vol. 12. P. 388–392.
24. Lorenc-Plucihaska G., Szadel A., Plucihski A., a Matysia R. The effect of sulphite on chlorophyll fluorescence and sucrose metabolism in poplar leaves // *Acta Physiol. Plantarum.* 2002. Vol. 24. N 2. P. 123–129.
25. Reddy M. P., Kaur M. Sodium fluoride induced growth and metabolic changes in *Salicornia brachiata* Roxb // *Water Air Soil Pollut.* 2008. Vol. 188. P. 171–179.
26. Stuiver C. E. E., De Kok Luit J. Atmospheric H₂S as sulfur source for *Brassica oleracea*: kinetics of H₂S uptake and activity of O-acetylserine (thiol) lyase as affected by sulfur nutrition // *Environ. Exp. Bot.* 2001. Vol. 46. Issue 1. P. 29–36.
27. Szostek R., Ciećko Z. Effect of soil contamination with fluorine on the yield and content of nitrogen forms in the biomass of crops // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2017. Vol. 24. P. 8588–8601.
28. Zouaria M., Elloumia N., Bellassouedd K. et al. Enzymatic antioxidant responses and mineral status in roots and leaves of olive plants subjected to fluoride stress // *S. Afr. J. Bot.* 2017. Vol. 111. P. 44–49.

Стаття: надійшла до редакції 30.01.17

доопрацьована 13.06.17

прийнята до друку 22.09.17

**THE GROWTH PARAMETERS OF SOME SPECIES
OF LAWN GRASSES UNDER CONDITIONS OF COMPLEX FLUORIDE
AND SULFITE SOIL POLLUTION**

Yu. Prysedskyj

*Vasyl Stus Donetsk National University
21, 600th Anniversary St., Vinnitsa 21021, Ukraine
e-mail: yu.prysedskyi@donnu.edu.ua*

Environmental pollution, which is caused by the industrial activity acquired in recent times the significance of a stressful environmental factor that disrupts the functioning of natural and artificial ecosystems. An important component of ecosystems, including artificial, there are herbaceous plants that perform important functions in anthropogenically transformed ecosystems. However, information about the action fluoride and sulphite contamination of soil on herbaceous plants, almost none. In this regard, we studied the effect of soil contamination by sulfites and fluoride on the growth processes of certain types of lawn grasses. As objects of investigation were used the *Stipa ucrainica* L., *Festuca rubra* L., *Agrostis stolonifera* L., *Agrostis capillaris* L., *Lolium perenne* L., *Bromus arvensis* L., *Poa pratensis* L. Plants were grown in soil with pollutants (sodium sulfite and sodium fluoride) according to the scheme of the complete two-factor experiment with three levels of factors. The analysis of plant responses to complex soil contamination by fluoride and sulfite indicates that the studied species vary by growth characteristics and biomass accumulation. The *Festuca rubra*, *Agrostis stolonifera* and *Agrostis capillaris*, *Lolium perenne* does not occur significant changes of studied parameters. For the *Stipa ucrainica*, *Agrostis capillaris*, *Bromus arvensis* and *Poa pratensis* growth inhibition depending on stability, composition and concentrations of pollutants were observed. The calculated equation based on the index of growth inhibition composition and concentrations of pollutants allow us to predict the growth of plants in contaminated areas and more effectively choose the composition of plants species for landscaping.

Keywords: Poaceae plants, soil pollution, growth parameters, the index of inhibition

МОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ СЕЛЕЗІНКИ ПОЙКІЛОТЕРМНИХ ТВАРИН

О. Дунаєвська

*Житомирський національний агроекологічний університет
Старий бульвар, 7, Житомир 10008, Україна
e-mail: Oksana_Fd@ukr.net*

Для інтегральної оцінки екологічного стану довкілля успішно використовується метод біоіндикації. Біоіндикаторами слугують представники різних класів пойкилотермних амніотів. Імунна система цих тварин лабільна. Селезінка, що належить до органів кровотворення та імунного захисту, чутлива до дії різноманітних чинників. Як біомаркери виступають морфологічні показники, зокрема, відносна маса селезінки та морфометричні дані основних структурних одиниць. Вивчали макро- й мікроскопічні особливості паренхіми, опорно-скоротливого апарату, лімфоїдних вузликів селезінки статевозрілих пойкилотермних хребетних тварин сома звичайного, жаби озерної, ящірки зеленої умовно чистої від антропогенного забруднення зони Житомирського району. Обчислювали відносну масу селезінки, відносні площі її складових і співвідношення між ними. Встановлено, що відносна маса селезінки становила $0,086 \pm 0,0006$ % у риби, $0,1170 \pm 0,0215$ % у жаби та $0,099 \pm 0,021$ % у ящірки. Мікроскопічна будова селезінки характеризується чітко сформованою червоною, білою пульпами й опорно-скоротливим апаратом. Опорно-скоротливий апарат формують капсула і трабекули. Відносна площа його становила $7,04 \pm 0,65$ % у риби, $5,39 \pm 0,07$ % у жаби та $5,21 \pm 1,47$ % у ящірки. У риби більшого розвитку набуває трабекулярний апарат, відносна частка якого становила 53,78 %. У жаби та ящірки, навпаки, відносна частка капсули була більша і дорівнювала 68,83 % та 85,61 % відповідно. У риби відмічали поодинокі капсулярні трабекули, у жаби і ящірки їх немає. У всіх досліджуваних тварин найкраще були розвинені судинні трабекули. У складі білої пульпи виділяють лімфоїдні вузлики і періартеріальні лімфоїдні півхи. У вузликах світлого центру немає, виокремлюється періартеріальна зона. Відносна площа білої пульпи становила $22,14 \pm 6,61$ % у риби, $15,36 \pm 5,71$ % у жаби, $13,36 \pm 1,80$ % у ящірки. Значну площу селезінки займає червона пульпа: $70,82 \pm 10,76$ % у риби, $80,67 \pm 6,53$ % у жаби, $81,43 \pm 7,05$ % у ящірки. Співвідношення білої пульпи до червоної становило 1:3,2 (риба), 1:5,25 (жаба), 1:5,99 (ящірка), співвідношення стромы до пульпи – 1:13,2; 1:24,19; 1:18,19 відповідно. Для даних тварин характерна наявність пігментних клітин, які у пульпі селезінки риби утворюють меланомакрофагальні центри, у жаби – меланомакрофагальні скупчення. На території з антропогенним навантаженням зазнають змін основні морфометричні показники селезінки: відносна маса, відносні площі білої, червоної пульпи, опорно-скоротливого апарату. Встановлені морфологічні особливості селезінки є основними тест-критеріями органа в нормі, зміни яких будуть маркерами впливу чинників різного генезу. Визначені параметри доцільно також враховувати для оцінки фізіологічного стану риби і створення оптимальних умов для гідробіонтів у період їх формування.

Ключові слова: селезінка, морфологія, біомаркер, пойкилотермні тварини

Селезінка пойкилотермних тварин належить до периферичних органів імуногенезу та кровотворення [4, 5, 9, 14]. З функціонально-морфологічними особливостями селезінки пов'язано різноманіття її структурних змін під впливом біотичних і абіотичних чинників природного середовища [6].

Важливими є дослідження впливу середовища [16], екологічної оцінки якості довкілля, що одночасно дають змогу виявити ступінь та інтенсивність впливу забруднювачів, простежити динаміку деградації екосистем у часі та просторі, створити загальну теорію функціонування екологічних систем, приймати практичні рішення з охорони і раціонального використання [14]. Для такої інтегральної оцінки успішно використовується метод біоіндикації. Як біоіндикатори використовують жабу озерну (*Rana ridibunda* P.) та ящірку зелену (*Lacerta viridis* L.) [8, 9, 11, 12]. Біомаркерами виступають морфологічні показники, зокрема, відносна маса (ВМ) селезінки. Результати наукових досліджень свідчать про достовірне зниження ВМ селезінки статевозрілих особин *R. ridibunda* P., які мешкають у водотоках, забруднених важкими металами [14]. При дії чинників газопереробного виробництва, навпаки, ВМ селезінки збільшується [2]. Зміни розмірів селезінки необхідно враховувати для оцінки фізіологічного стану та створення оптимальних умов для гідробіонтів у період їх формування [13]. Загалом, біологічний моніторинг – основний напрям контролю водного середовища і отримання об’єктивних даних, який не втратить своєї актуальності у найближчі сто років [7].

Беручи до уваги діагностичні можливості морфологічних методів, **метою дослідження** було провести гістоморфометричну оцінку селезінки представників пойкилотермних тварин Житомирської обл., які будуть використовуватись у біомоніторингу як тест-критерій змін у екосистемі.

Матеріали та методи

Об’єктом дослідження була селезінка статевозрілих пойкилотермних хребетних тварин обох статей у співвідношенні 1:1 у фазі морфофункціональної зрілості органа: сомів європейських звичайних (*Siluris glanis* L.) (вік 2 роки), жаб озерних (вік 23–26 місяців), ящірок зелених (вік 23–25 місяців). Кількість відібраних зразків селезінки одного виду становила 24–32. Тварини були вилучені з природного середовища Житомирського р-ну Житомирської обл. без антропогенного навантаження. Додатково було відібрано селезінку сома зі ставу Коростенького р-ну, територія якого належить до зони радіоактивного забруднення зі щільністю забруднення ґрунтів 5–15 Кі/км² за ¹³⁷Cs. Селезінку жаби озерної досліджувалась зі ставу Ружинського р-ну, що постійно зазнає забруднення побутовими стічними водами і відходами. Ящірок відбирали з промислової зони м. Житомира. Дослідження проводили впродовж 2015–2017 років.

Виконана робота є частиною наукової тематики кафедри анатомії і гістології Житомирського національного агроєкологічного університету «Розвиток, морфологія та гістохімія органів тварин у нормі та при патології», державний реєстраційний № 0113V000900.

Для гістологічного дослідження шматочки матеріалу фіксували у 10–12 %-ному водному розчині нейтрального формаліну і рідині Карнуа. Парафінові зрізи фарбували гематоксиліном та еозином і за методом Ван-Гізона [3]. Морфометричні дослідження й обробку цифрових даних здійснювали варіаційно-статистичними методами на персональному комп’ютері з використанням програми “Microsoft Excel” згідно з рекомендаціями [3]. Обчислювали відносну масу селезінки, яка дорівнює відношенню маси селезінки (г) до маси тварини (г), виражену у відсотках.

Вся експериментальна частина дослідження була проведена згідно з вимогами міжнародних принципів «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються в експерименті та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986) та відповідного Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3446-IV від 21.02.2006, Київ).

Результати і їхнє обговорення

Селезінка тварин містилась у черевній порожнині, була темно-червоного кольору. Відношення ширини до довжини у сома становило 0,77, тому форму визначали як овально-видовжену. У жаби співвідношення ширини до довжини становило 1:0,63, тому форму визначали як округлу. У ящірки форму визначали як видовжену, оскільки співвідношення ширини до довжини дорівнювало 1:2,7. Анатомічні й топографічні особливості селезінки сома звичайного, жаби озерної та ящірки зеленої збігаються з дослідженнями інших авторів [4, 5].

Згідно з проведеними дослідженнями, відносна маса селезінки найменша у риб і найбільша у жаб (табл. 1). Отримані дані не суперечать результатам досліджень Г.И. Прониной (2002) [10].

Селезінка дослідних тварин сформована строюю та паренхімою. Строма утворена капсулою і трабекулами, які разом формують опорно-скоротливий апарат (ОСА) селезінки. Найбільшого розвитку він отримав у риб (див. таблицю та рис. 1). Частка капсули у риб становила 46,22 %, у жаб 68,83 % та у ящірки 85,61 %. Середнє значення товщини капсули селезінки становить $21,85 \pm 7,44$ мкм у риби, $19,37 \pm 4,45$ мкм у жаби, $11,04 \pm 3,30$ мкм у ящірки. Чітко сформована капсула трабекул не утворювала. Лише у сома траплялися поодинокі капсулярні трабекули. Чітко виявлялися тільки пульпарні трабекули, які були представлені судинними і сполучними видами. Судинні трабекули виявлено переважно в пульпі та в ділянці воріт і менше – в підкапсулярній зоні. Капсула і трабекули були утворені щільною сполучною та гладкою м'язовою тканиною. У сполучній тканині ОСА переважну частину становили еластичні волокна. У всіх трабекулах, окрім сполучної тканини, виявляли слабо розвинені пучки міоцитів. Про відсутність капсулярних трабекул у жаб зазначала Е.Н. Горышина (1985) [4].

Основою пульпи селезінки є ретикулярна строма, яка складається з фіброblastів, макрофагів, колагенових і еластичних волокон. Колагенові волокна розташовуються навколо судин і майже відсутні в пульпі, еластичні трапляються переважно в капсулі та стінках великих судин. Пульпа поділяється на червону (ЧП) і білу (БП). Проте чіткої межі між ними немає.

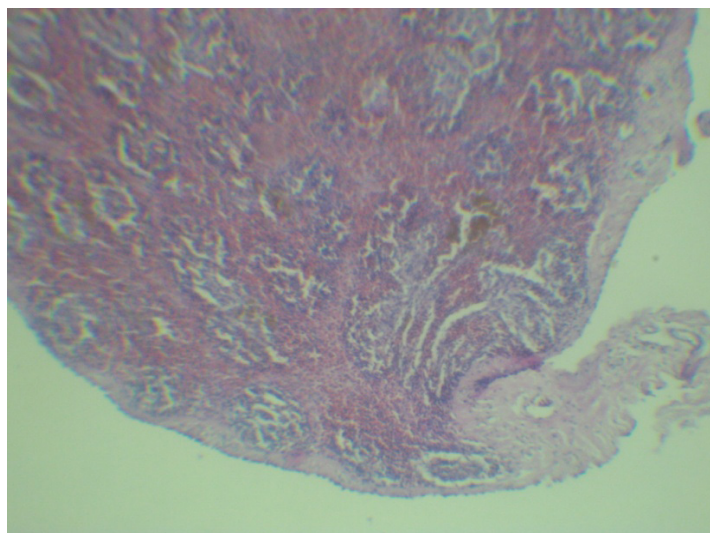


Рис. 1 . Фрагмент мікроскопічної будови селезінки сома звичайного. Гематоксилін та еозин. $\times 56$

Таблиця

Вид тварини	Відносна маса	Відносна площа		
		опорно-скоротливого апарату	білої пульпи	червоної пульпи
Риба	0,086±0,0006	7,04±0,65	22,14±6,61	70,82±10,76
Жаба	0,1170±0,0215	5,39±0,07	15,36±5,71	80,67±6,53
Ящірка	0,099±0,021	5,21±1,47	13,36±1,80	81,43±7,05

ЧП – це міжтрабекулярна та міжвузликівка тканина, заповнена еритроцитами. Еритроцити на різних етапах розвитку (дозріваючі, зрілі, зруйновані) зумовлювали її червоне забарвлення. У ретикулярній тканині містилися вільні клітинні елементи: клітини крові, плазматичні клітини, макрофаги. Клітини в ЧП розташовувалися дифузно і пухкіше, ніж у БП. У ЧП, крім клітинних елементів, розміщувалися численні артеріоли, капіляри, своєрідні венозні синуси, в порожнинах яких депонувалися клітинні елементи (рис. 2). Відносна площа ЧП найбільша у ящірки та найменша у риб (див. таблицю). Ділянки БП відрізнялися щільнішим розташуванням клітин, які концентрувались навколо артеріол і утворювали періартеріальні лімфоїдні піхви (ПАЛП) у вигляді тяжів навколо судин. Лімфоїдні вузлики (ЛВ) виділялись у вигляді скупчення клітин округлої форми, світлого центру не було. Диференціювалася періартеріальна зона ЛВ. Кожен ЛВ складався з комплексу клітин лімфоїдної тканини: лімфоцити (малі, середні, великі), лімфобласти, макрофаги, дендритні клітини, плазматичні клітини. Траплялися лейкоцити, переважно еозинофільні. Основними формуючими клітинами селезінки ящірки були клітини агранулоцитопоетичного ряду. Лімфоцити становили близько 70 % формуючих клітин білої пульпи і майже 10 % із них – плазматичні клітини. Основні клітини розташовувались хаотично. Серед лімфоцитів диференціювались лімфобласти, пролімфоцити і зрілі лімфоцити до 50 % поля зору. Лімфобласти розташовувались невеликими групами по 3–6 клітин, найвищу концентрацію їх відмічали в перехідній зоні між БП і ЧП. Відсутність у структурі ЛВ селезінки жаби озерної світлих центрів збігається з дослідженнями М. П. Грушко (2010) [5]. Згідно з нашими морфометричними дослідженнями, БП займала від 13,36±1,80 % у ящірки до 22,14±6,61 % у риб відносно площі селезінки (див. таблицю). Проте згідно з даними Е. Н. Горышин (1985), відносна площа БП жаби селезінки зазначається як 22 % [4], за нашими даними – 15,36 %, що пов'язано з породними і віковими відмінностями тварин; у працях М. П. Грушко (2010) частка БП становить 18 %, що можна пояснити різними умовами середовища онтогенезу. Встановлений нами клітинний склад паренхіми селезінки збігається з результатами досліджень Н.М. Акуленко (1998) та М.П. Грушко (2010) [1, 5], хоча є невеликі розбіжності у кількісних показниках, що пояснюється сезонними коливаннями та регіональними особливостями. Співвідношення БП:ЧП становило 1:3,2 (риба), 1:5,25 (жаба), 1:5,99 (ящірка), співвідношення ОСА до пульпи – 1:13,2; 1:24,19; 1:18,19 відповідно. Для пульпи селезінки пойкилотермних тварин характерною ознакою є наявність пігментних клітин. Вони у пульпі селезінки риб утворювали меланомacroфагальні центри, у жаб – меланомacroфагальні скупчення (рис. 3), у ящірки розташовувалися поодинокі. Їхня кількість збільшувалася в літній період, і тоді вони утворювали групи з 2–5 клітин. Визначені відмінності в отриманих нами показниках і літературних джерелах спонукали до аналогічних досліджень на територіях із різним антропогенним навантаженням. У сома під впливом радіонуклідів встановлено зменшення абсолютної маси селезінки на 6,5 %, відносної маси на 0,006 %, відносної площі білої пульпи на 4,11 % та збільшення відносної

площі опорно-скоротливого апарату на 1,39 %, відповідно відносна площа червоної пульпи збільшилась на 2,71 %; співвідношення білої пульпи до червоної становило 1:4,1, опорно-скоротливого апарату до паренхіми – 1:10,9. Під впливом побутових забруднювачів абсолютна маса селезінки жаби збільшується на 3,7 %, відносна – на 0,0024 %, відносна площа білої пульпи – на 6,39 %, відносна площа ОСА практично не зазнала змін, відповідно, відносна площа червоної пульпи зменшилась на 5,93 %. Найбільш виражені зміни зафіксовано у збільшенні відносної площі білої пульпи у ящірки зеленої (під впливом викидів в атмосферне повітря стаціонарними та пересувними джерелами; скидами стічних і зворотних вод; забруднення земельних ділянок відходами) на 14,7 %.

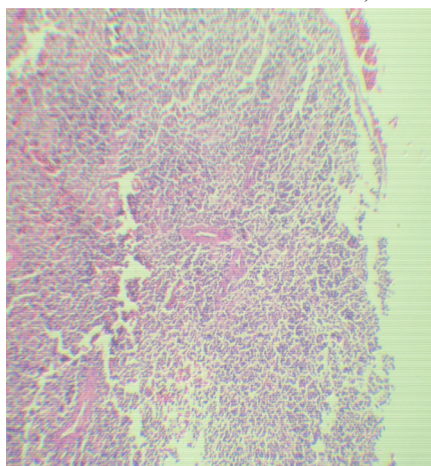


Рис. 2. Судини селезінки ящірки зеленої. Гематоксилін та еозин. $\times 56$

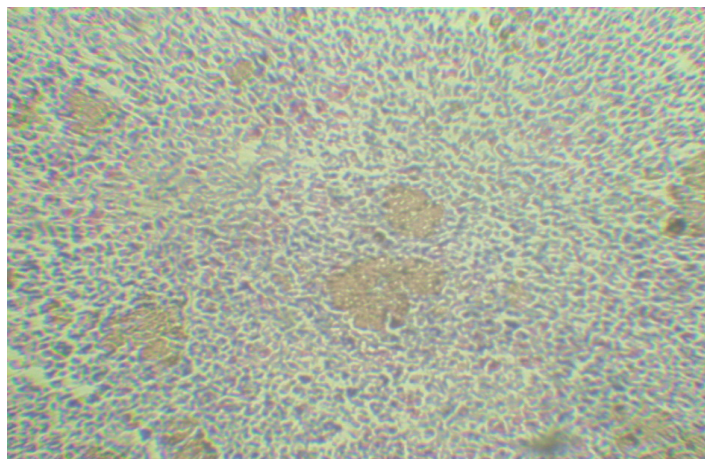


Рис. 3. Меланомакрофагальні скупчення в пульпі селезінки жаби озерної. Гематоксилін та еозин. $\times 80$

Таким чином, розглянуто особливість морфологічної будови селезінки пойкилотермних тварин (сом звичайний, жаба озерна, ящірка зелена). Встановлено, що відносна маса селезінки дорівнювала $0,086 \pm 0,0006$ % у сома, $0,1170 \pm 0,0215$ % у жаби та $0,099 \pm 0,021$ % у ящірки. Відносна площа опорно-скоротливого апарату становила $7,04 \pm 0,65$ %, $5,39 \pm 0,07$ %, $5,21 \pm 1,47$ % відповідно. Біла пульпа займала від $13,36 \pm 1,80$ % у ящірки до $22,14 \pm 6,61$ % у риб відносної площі селезінки. Співвідношення білої пульпи до червоної становило 1:3,2

(риба), 1:5,25 (жаба), 1:5,99 (ящірка). Дані значення доцільно використовувати як біомаркери у системі біомоніторингу довкілля та створенні оптимальних умов для гідробіонтів, оскільки під впливом антропогенного навантаження вони зазнають змін.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Акуленко Н. М.* Пігментні клітини як характерний елемент гемопоетичної системи наземних пойкилотермних хребетних: автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.08. К., 1998. 25 с.
2. *Боков Д. А.* Параметры функциональной морфологии селезёнки мелких млекопитающих и оценка условий перестройки системы крови и иммунитета при действии факторов газоперерабатывающего производства // Изв. Самар. науч. центра РАН. 2015. Т. 17. № 5(2). С. 327–332.
3. *Горальський Л. П., Хомич В. Т., Кононський О. І.* Основи гістологічної техніки і морфофункціональні методи досліджень у нормі та при патології: навч. посіб. Житомир: Полісся, 2005. 288 с.
4. *Горьшина Е. Н.* Кинетика обновления клеток крови и её сезонные изменения у травяной лягушки: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.11. Л., 1985. 27 с.
5. *Грушко М. П.* Клеточный состав кроветворных органов половозрелых самок представителей класса рыб, земноводных и пресмыкающихся: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.03.04. Астрахань, 2010. 44 с.
6. *Дунаєвська О. Ф.* Морфологічні зміни селезінки під впливом різноманітних чинників // Вісн. Харків. ун-ту. Сер. біол. 2016. Вип. 27. С. 106–124.
7. *Катаев С. В.* Мониторинг бентоса предгорной зоны реки Терек в условиях антропогенного воздействия: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.14. Владикавказ, 2013. 22 с.
8. *Мананникова М. Н.* Морфофункциональная характеристика прыткой ящерицы (*Lacerta agilis* L., 1758) южного Приуралья (Оренбургская область) // Уч. зап. Казан. ун-та. Естеств. науки. 2015. Т. 157. Кн. 1. С. 103–113.
9. *Николаев В. Ю.* Иммуногематологические характеристики амфибий и рептилий верхнего и среднего Поволжья в аутэкологическом аспекте: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.08. Нижний Новгород, 2016. 18 с.
10. *Пронина Г. И.* Физиолого-иммунологическая оценка культивируемых гидробионтов: карпа, сома обыкновенного, речных раков: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.03.01. М., 2002. 39 с.
11. *Романова Е. Б., Николаев В. Ю.* Иммунофизиологические характеристики популяций зелёных лягушек урбанизированной территории // Изв. Самар. науч. центра РАН. 2014. Т. 16. № 5(1). С. 616–622.
12. *Стирина Е. В.* Амфибии как биоиндикационная тест-система для экологической оценки водной среды обитания: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.16. Ульяновск, 2007. 28 с.
13. *Фунг Н. Д., Распопов В. М., Сергеева Ю. В.* Морфобиологическая характеристика заводской молоди осетра для формирования запасов // Вестн. АГТУ. Сер. Рыб. хоз-во. 2013. № 2. С. 191–196.
14. *Шейна Т. А.* Состав крови и содержание тяжёлых металлов в органах и тканях у трёх видов рыб в бассейне реки Кама : автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.08. Пермь, 2014. 20 с.
15. *Цепелева М. Л.* Сообщества донных беспозвоночных малых рек Вятка в условиях хозяйственной деятельности: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.08. Сыктывкар, 2013. 19 с.

16. Huang Y., Chain F. J. J., Panchal M. et al. Transcriptome profiling of immune tissues reveals habitat-specific gene expression between lake and river sticklebacks // *Mol. Ecol.* 2016. Vol. 25. P. 943–958. doi: 10.1111/mec.13520.

Стаття: надійшла до редакції 01.11.16

доопрацьована 29.05.17

прийнята до друку 20.09.17

THE MORPHOLOGICAL FEATURES OF THE SPLEEN IN POIKILOTERMIC ANIMALS

O. Dunaievskaya

*Zhytomyr National Agroecological University
7, Old Boulevard, Zhytomyr 10008, Ukraine
e-mail: Oksana_Fd@ukr.net*

The bioindication method successfully used for integrated assessment of the ecological state of the environmental. Bioindicators are representatives of different classes of poikilothermic amniotes. The immune system of these animals is labile. The spleen which belongs the sanguification and the formation of the immune system is sensitive to various factors. The biomarkers are the morphological parameters, including the relative weight of the spleen and morphometric data the basic structural units. The macro- and microscopic features of the parenchyma, support-contractile apparatus, and lymphoid nodules are characterized in mature spleen poikilothermic vertebrates: wels catfish, marsh frog, green lizards of relatively clean from human contamination zone of Zhytomyr region. The relative weight of the spleen, the relative area of its components and the ratio between them are estimated. Relative spleen weight was $0,086 \pm 0,0006$ % in fish, $0,1170 \pm 0,0215$ % in frogs and $0,099 \pm 0,021$ % in lizards. Microscopic structure of the spleen characterized by clearly formed the red, white pulp and support-contractile apparatus. The support-contractile apparatus form the capsule and trabeculae. It is relative area was $7,04 \pm 0,65$ % of the fish, $5,39 \pm 0,07$ % in frogs and $5,21 \pm 1,47$ % in lizards. The trabecular apparatus is more development in fish, the relative proportion of which was 53,78 %. In frogs and lizards, by contrast, the relative proportion of the capsule was larger and amounted to 68,83 % and 85,61 % respectively. The fish have noted few capsular trabeculae; they are absent in frogs and lizards. The vascular trabeculae were best developed in all studied animals. In the white pulp allocate the lymphoid nodules and lymphoid sheath near the vessels. In nodules the light center is absent and singled out the zone near the vessels. The relative area of the white pulp was $22,14 \pm 6,61$ % in fish, $15,36 \pm 5,71$ % in frogs, $13,36 \pm 1,80$ % in lizards. The red pulp takes large areas of spleen: $70,82 \pm 10,76$ % in fish, $80,67 \pm 6,53$ % in frogs, $81,43 \pm 7,05$ % in lizards. The ratio of the white pulp to red was 1:3,2 (fish), 1:5,25 (frog), 1:5,99 (lizard); the ratio of the stroma to pulp – 1:13,2; 1:24,19; 1:18,19 respectively. The splenic pigment cells have formed the clusters in frogs and constituted centers in fish. The basic morphometric parameters of the spleen: relative weight, the relative area of white and red pulps, the contractile apparatus are change in areas with anthropogenic pressures. The morphological characteristics of the spleen are established as the main test criteria of the organ in normal; their changes will reflect the impact of the factors of different genesis. The parameters should consider for assessing the physiological state of fish and creating optimal conditions for the aquatic during their formation.

Keywords: spleen, morphology, biomarker, poikilothermic animals

УДК 574.583:59(285.33:477.81)

**ZOOPLANKTON OF WATERS OBJECTS WITHIN THE WETLAND
OF RIVNENSKYI NATURE RESERVE**

K. Nazaruk¹, R. Zhuravchak²

¹*Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: katja.nazaruk@gmail.com*

²*Rivnenskyi Nature Reserve
Chudel village, Sarny district, Rivne region 34542, Ukraine
e-mail: rpz-10@ukr.net*

We examined features of zooplankton within wetlands of Rivnenskyi Nature Reserve. Totally we found 50 species of zooplankton. Among them the most dominated were cladocera – 23 species (46 %), 9 species of copepods (18 %) and 8 species of rotifers (16 %). Most frequently occurred *Chydorus latus* Sars 1862 (frequency of occurrence of 80 %) and *Chydorus sphaericus* (O.F. Müller, 1785) (67 %), also *Pleuroxus trigonellus* (O.F. Müller, 1776), *Polyphemus pediculus* (Linnaeus, 1761) *Scapholeberis mucronata* (O.F. Müller, 1776) (total 47 %). Two species *Chydorus ovalis* Kurz, 1874 and *Daphnia longispina* (O. F. Mueller, 1785) dominated in number. The average value of Shannon index is $2,3 \pm 0,2$. We also presented ecological characteristics of these species. We didn't found the classic ratio between ecological forms of zooplankton, when phytoplankton forms predominate over others, because of different types of researched waters. We determined that every researched water ecosystem has specific species composition of zooplankton.

Keywords: zooplankton, wetlands, marsh, Rivnenskyi Nature Reserve

Wetlands are one of the most vulnerable ecosystems on the Earth. There are some wetlands which need special efforts to preserve the natural regime of their functioning, and among them are marshes. ecosystems on the territory of Ukraine are very valuable from both nature protection and an environmental points of view. Most of them have been reclaimed primarily in Soviet times. An important function of as a contact link between small and large circulation of substances, is their gas-regulating function, which exceeds the similar function of forest ecosystems in the 7–15 times.

It should be noted that are a refugia for the survival of not only many rare and endangered species of organisms, but also of whole groups and natural systems [12].

Rivnenskyi Nature Reserve is the largest nature reserve in Ukraine (total area is 47,046.8 ha). The territory of the reserve belongs to Volyn, or Western, Polissia. It reveals the main features of the landscape, which characterizes this part of Ukraine – the plainness of relief, the prevalence of sand, a positive balance of moisture, high level of forest cover and waterlogging [13].

Materials and methods

According to the physiographic and geobotanical zoning the territory of nature reserve belongs to the Volyn Polissia – a zone of mixed forests. It consists of four separated sections – Biloozerske, Somyne, Syra Pohonya and Perebrody departments, which situated in different districts of Rivne region – Volodymyrets, Sarny, Rokytno and Dubrovytsia districts accordingly.

The territory of nature reserve has a high level of waterlogging (48 %), because it includes the largest peatlands of Ukraine and is represented by marshes of in Ukrainian Polissia all types. All departments of Rivnenskyi nature Reserve are included in the List of Wetlands of International Importance according to Ramsar Convention.

“Perebrody Peatlands” is one of the most preserved peatlands in the Ukrainian Polissia Region. It is a typical boreal wetland with different vegetation cover, including the largest non drained mire in Ukraine. In the northern part of the Site, an open-water eutrophic and meso-eutrophic peatland is situated with sedge-reed communities. Mesotrophic communities with sedge-peat moss predomine on the periphery of the site. “Perebrody Peatlands” is a unique type of wetlands in Ukraine and in Europe in general – with adjacent “Olmany Mires” on Belarus territory they form the biggest mire in Europe [9, 14].

The main territory of the “Somyne” site is a large sedge-sphagnum swamp area mostly with mixed type of nutrition (transitive), which has the sparse growth of trees and forest. There is also a lake with a small number of eutrophic swamps, swamp of alder forests and pine forests are located. A large area of the transitional wetlands is preserved in its natural state. Here transitional marsh is interrupted zones of land and adjacent forest wetlands [10].

“Syra Pohonia Bog” is the only one marsh array in Ukraine with hilly morass natural system, which is typical for northern wetlands. The hills are covered mostly by oligotrophic pine-cottongrass-sphagnum vegetation communities (with *Eriophorum vaginatum*, *Sphagnum fuscum*, *Sph. magellanicum*), while in watered depressions of treeless places occur sedge-sphagnum *Cariceto (rostratae et limosae)*-*Sphagneta (cuspidati)* and pod-grass-sphagnum (*Scheuchzerieto (palustris)*)-*Sphagneta* groupings dominate. The site includes a large and well protected marsh, which is mainly fed by rain and snow [11].

“Byle Lake and Koza-Berezyna Mire” includes a deep oligotrophic karst lake the Byle Lake and mire Koza Berezyna, the swamped forests and not swamped pine-woods between them. This bog was formed in a glacial valley with length of 17 km and width of 3 km, where the glacial waters flow down. The mire is in good state, almost not damaged by land-reclamation. Here are represented all dominant vegetation communities of Polissian mire area [8].

Zooplankton samples for our research were taken in late May 2012 [5], in July and November 2013, in March and September 2014 [6] and in September and November 2015. Sampling and processing of materials we made according to the general methods [4]. We selected 15 localities for the research. They include the open waters of the marshes, small lentic roadside ditches and forest wetlands with stagnant weak stream water.

Results and discussion

We found 50 species of zooplankton in the studied of waters objects within the wetlands. Among them the most dominated were cladocera – 23 species (46 %), 9 species of copepods (18 %) and 8 species of rotifers (16 %). Most frequently occurred *Chydorus latus* Sars 1862 (frequency of occurrence of 80 %) and *Chydorus sphaericus* (O.F. Müller, 1785) (67 %), and also *Pleuroxus trigonellus* (O.F. Müller, 1776), *Polyphemus pediculus* (Linnaeus, 1761) *Scapholeberis mucronata* (O.F. Müller, 1776) (total 47 %). Frequency of occurrence of the other species was much lower. The percentage of species that occurred only in one of the localities is 50 %. This indicates that each of marsh localities is unique.

Characteristics of species that occurred frequently: *Ch. latus* is a habitant of overgrown ponds, lakes and rivers. It can be founded in the slightly brackish waters with a pH of 4,5–7,5. Oligosaprobic species. *Ch. sphaericus* – everytopic species, which can live in the bush and in the pelagic zone, if there are algae. This species is extremely tolerant to water reaction. β -o – me-

sosaprob. *Pl. trigonellus* is a habitant of puddles, marshes, ponds, lakes coasts and reservoirs it, is not found in acidic waters. It inhabits dense thickets of vegetation as good as the rocky bottom. β – mesosaprob. *S. mucronata* can be founded on the coasts of lakes, reservoirs and ditches. It is a habitant of hyponeuston. Everyionic. β – mesosaprob [3, 7].

However, these individuals of listed species are not numerous. The proportion of the total was less than 5 %.

The greatest number of zooplankton species (15) occurred in the water with light stream in the “Perebrody Peatlans”, which is located among the marsh.

The number of zooplankton changed depending on the season during the year. Traditionally, the highest number of zooplankton was in the summer (9100 ind./ m³) (Fig. 1).

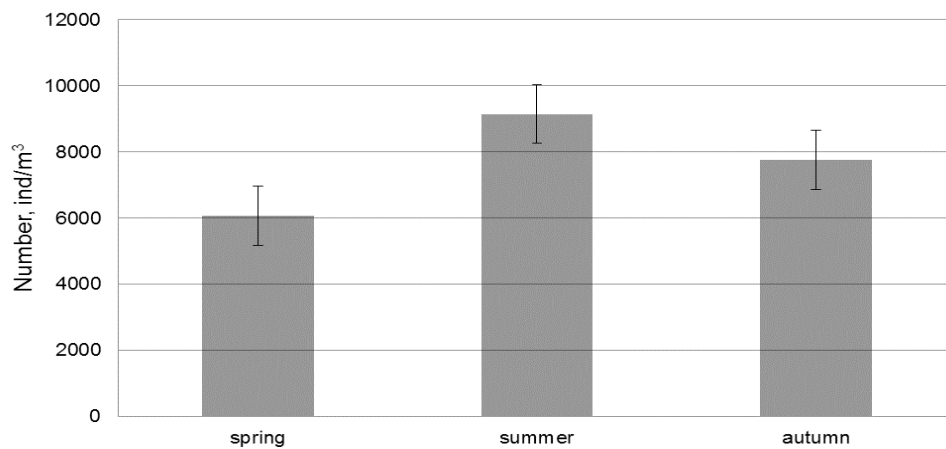


Fig. 1. Variable number of zooplankton during the year

Two species *Chydorus ovalis* Kurz, 1874 and *Daphnia longispina* (O. F. Mueller, 1785) dominated in number during the year. Their ratio was 13 % of the total zooplankton. *Ch. ovalis* is the habitant of small water objects, or less peat waters. It prefers acidic waters. Oligosaprob. However, it should be noted that this species occurred in only one locality (in Biloozerske department, in small forest pond near the road), so it can characterize only this one locality.

D. longispina lives in different waters, but prefers acidic and slightly alkaline environments. It is a common zooplankton component of some brackish lakes, mass component of ponds and reservoirs. It can be used as an indicator of non acid conditions, but it can occur in acidic water with high content of humus. β – mesosaprob [3, 7].

An average value of Shannon index is $2,3 \pm 0,2$. The index is high, because the number of species that occurred in the localities was small and their distribution in the water was more or less similar.

Thicket and phytophilous forms (50 %) dominant in the waters, but also a high ratio of planktonic forms registered (Fig. 2). It is specific because these waters don't have large open stretches.

Primary and secondary filter-feeders dominate in the trophic structure of the zooplankton groups, but there are detritivore also.

Reservoirs were different, so classical interrelation, where phytophyl organisms should prevail in the swamps is not observed [1]. Also it concerns the food chains, because marsh waters are characterized by detrytic food chains [2].

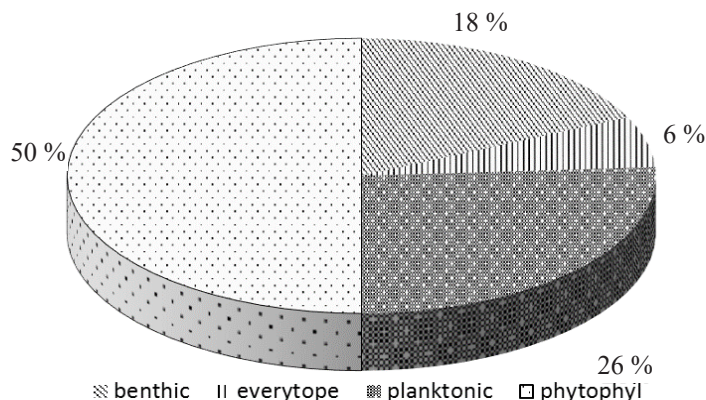


Fig. 2. Biotope classification of zooplankton in the marches

Marsh ecosystems, as a habitat, are characterized by specific factors according to which species composition of zooplankton distributes. Every researched water ecosystem has specific species composition of zooplankton, which is inherent only to it.

REFERENCES

1. *Andronykova I. N.* Main Results of the study cladocera humified reservoirs // Modern problems of studying Cladocera. SPb.: Gidrometeoizdat, 1992. P. 81–99. (In Russian).
2. *Cherevichko A. V.* Zooplankton formation regularities in upper-bog reservoirs (with the Polistovo-Lovatskaya upper-bog system as an example) // *Povolzhskiy Journal of Ecology*. 2011. N 4. P. 542–548. (In Russian).
3. *Manuilova E. F.* Cladocera fauna of the USSR. M.: Nauka, 1964. 235 p. (In Russian).
4. Methodical recommendations for the selection, processing and evaluation of hydrobiological samples to determine the quality of the water: for students of 3–5 courses of the Faculty of Biology. Lvov: LGU, 1990. 59 p. (In Russian).
5. *Nazaruk K. M., Zhuravchak R. O., Khamar I. S.* Concerning zooplankton water bodies Rivne Nature Reserve // State and biodiversity ecosystems Shatsk National Park (Shatsk, 2012). Lviv, 2012. P. 51–52. (In Ukrainian).
6. *Nazaruk K., Zhuravchak R.* Zooplankton of water bodies of Rivnenskiy Nature Reserve // *Visnyk of the Lviv University. Series Biology*. 2015. Issue 69. P. 220–226. (In Ukrainian).
7. *Oleksiv T. I.* Indicators of quality of natural waters from an environmental position. Lviv: Svit, 1992. 235 p. (In Russian).
8. Ukraine. Byle Lake and Koza Berezyna Mire [Electronic resource] // Ramsar Sites Information Service. Created by RSIS V.1.7 on – 25 January 2017. Source access: https://rsis Ramsar.org/RISapp/files/RISrep/UA2281RIS_1701_en.pdf.
9. Ukraine. Perebrody Peatlands [Electronic resource] // Ramsar Sites Information Service. Created by RSIS V.1.6 on – 8 November 2016. Source access: https://rsis Ramsar.org/RISapp/files/RISrep/UA1402RIS_1611_en.pdf.
10. Ukraine. Somyne Swamps [Electronic resource] // Ramsar Sites Information Service. Created by RSIS V.1.7 on – 13 December 2016. Source access: https://rsis Ramsar.org/RISapp/files/RISrep/UA2275RIS_1612_en.pdf.
11. Ukraine. Syra Pogonia Bog [Electronic resource] // Ramsar Sites Information Service. Created by RSIS V.1.7 on – 13 December 2016. Source access: https://rsis Ramsar.org/RISapp/files/RISrep/UA2274RIS_1612_en.pdf.

12. Wetland ecosystems of Eastern Carpathians in Ukraine / Kovalchuk A. A., Felbaba-Klushyna L. M., Kovalchuk N. at al. // Under the editorship A. A. Kovalchuk. Uzhgorod: Lira, 2006. 228 p. (In Ukrainian).
13. Wetlands Ukraine: a handbook / ed. G. B. Marushevsky, I. S. Zharuk. K.: Wetlands International Black Sea Programme, 2006. 312 p. (In Ukrainian).
14. Zhuravchak R. O., Yakushanko D. M., Golovko O. V., Martyniuk V. O. Wetland of International Importance "Perebrody Peatlands" // Monitoring of Wetland of International Importance. Methods and results (Proceedings of seminar "Organization and results of monitoring of Wetland of International Importance in Ukraine". Odessa, March 4–6, 2014). K.: DIA, 2014. P. 67–72. (In Ukrainian).

Стаття: надійшла до редакції 02.03.17

доопрацьована 29.06.17

прийнята до друку 30.06.17

ЗООПЛАНКТОН ВОДНИХ ОБ'ЄКТІВ БОЛІТ РІВНЕНСЬКОГО ПРИРОДНОГО ЗАПОВІДНИКА

К. Назарук¹, Р. Журавчак²

¹Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: katja.nazaruk@gmail.com

²Рівненський природний заповідник
урочище "Дубки", с. Чудель, Сарненський р-н, Рівненська обл. 34542, Україна
e-mail: rpz-10@ukr.net

Розглянуто особливості зоопланктону водних об'єктів боліт Рівненського природного заповідника. Загалом відзначено 50 видів зоопланктерів, серед яких було 23 види (46 %) гіллястовусих рачків, 9 видів (18 %) веслоногих рачків і 8 видів (16 %) коловерток. Встановлено види, що трапляються найчастіше: *Chydorus latus* Sars 1862 (частота трапляння 80 %) та *Chydorus sphaericus* (O.F. Müller 1785) (67 %), а також *Pleuroxus trigonellus* (O. F. Müller, 1776), *Polyphemus pediculus* (Linnaeus, 1761), *Scapholeberis mucronata* (O. F. Müller, 1776) (47 %). Переважаючими за чисельністю були два види – *Chydorus ovalis* Kurz, 1874 та *Daphnia longispina* (O. F. Müller, 1785). Обчислено індекс Шеннона $2,3 \pm 0,2$. Наведено екологічну характеристику цих видів. Класичного співвідношення, коли фітофільні форми переважають над іншими, не виявлено, оскільки досліджувані водойми були різнотиповими. Встановлено, що кожна досліджувана водойма боліт Рівненського природного заповідника має специфічний видовий склад зоопланктерів, притаманний тільки їй.

Ключові слова: зоопланктон, водно-болотні угіддя, болото, Рівненський природний заповідник

ВІДТВОРЮВАЛЬНА ЗДАТНІСТЬ САМОК САЙГАКА *SAIGA TATARICA* LINNAEUS, 1766 АСКАНІЙСЬКОЇ ПОПУЛЯЦІЇ

Є. Стекленъов, В. Смаголь

Біосферний заповідник «Асканія-Нова» НААН України
вул. Паркова, 15, смт Асканія-Нова
Чаплинський р-н, Херсонська обл. 75230, Україна
e-mail: smagol19750@ukr.net

Досліджено показники відтворювальної здатності самок сайгака в умовах напіввільного утримання на півдні України. Встановлено, що активізація овогенезу в самок сайгака починається у літні місяці (липень–серпень) і визначається зростанням значної кількості фолікулів. Дозрівання фолікулів у дорослих самок спостерігається пізньої осені та взимку, що вказує на їхню готовність до парування. Парування тварин відбувається у досить стислі строки – протягом двох–трьох тижнів. У всіх самок, досліджених у зимово-весняний період, зафіксована вагітність із досить синхронним розвитком зародків і плодів. У молодих самок активізація овогенезу починається у пізніші строки (жовтень–листопад), ніж у дорослих, і характеризується поступовим розвитком фолікулів та дозріванням ооцитів. Статевої зрілості у 7–8 місяців досягають лише деякі добре розвинуті самки (не більше 20 %), фізіологічно зрілими ж вони стають у 18–19-місячному віці. Показники відтворювальної здатності самок сайгака асканійської популяції мало чим відрізняються від аналогічних показників цього виду тварин із автохтонних популяцій. Деякі відхилення у той чи інший бік у строках початку статевої активності визначається перш за все кліматичними умовами того чи іншого року, а також наявністю зеленого корму. Напіввільне утримання сайгаків на великих степових територіях і їхнє самостійне визначення власної трофічної бази сприяють нормальному функціонуванню всіх органів і систем, що в кінцевому результаті визначає їхню успішну реакліматизацію в степових районах півдня України.

Ключові слова: *Saiga tatarica*, реакліматизація, напіввільне утримання, заповідник «Асканія-Нова», відтворювальна здатність самок, статева активність, парування

Сайгак *Saiga tatarica* Linnaeus, 1766 – один із видів антилоп, який у недалекому минулому заселяв великі території південноукраїнського степу. Останні свідчення про існування досить великої кількості сайгаків у Таврійських степах припадають на кінець XVIII ст. [2]. Під кінець XIX ст. західна границя ареалу сайгака переміщується за р. Дон; пізніше – у північно-східному (Волго-Уральські степи) і східному напрямках (Башкирія, Оренбург, Орел, Кустанай).

У кінці XIX – першій половині XX ст. було зроблено кілька спроб реакліматизувати сайгаків на південь України за умов утримання в неволі, але всі вони виявилися безрезультатними [11, 12]. Незважаючи на порівняно успішне розмноження, тварини за досить хорошого стану вгодованості поступово гинули у результаті захворювання травного тракту і паренхіматозних органів. Причина такого явища – відсутність різноманітності кормів (різнотрав'я), достатнього моціону, що, зрештою, призводило до порушення обміну речовин, переродження печінки, нирок, селезінки тощо.

Сайгак – тварина, що сезонно розмножується. Сезон підвищеної статевої активності й плідних парувальних припадає на пізньоосінній і ранньозимовий період (кінець листопада –

перша половина грудня); його конкретні строки великою мірою визначаються погодними умовами того чи іншого року і, зокрема, наявністю зеленого (гідрофільного) корму, який стимулює статеві процеси. Враховуючи сувору сезонність розмноження сайгака в умовах сучасного ареалу, ми провели дослідження фізіологічних властивостей відтворення самок цього виду тварин у процесі його реакліматизації на півдні України. У роботі використано результати досліджень за 1979–2016 рр.

Матеріали та методи

У 1979 р. була зроблена чергова спроба реакліматизувати сайгаків у зоопарку «Асканія-Нова». На цей раз 72 особини (в основному 3-місячного віку), відловлені у Калмицькому степу та завезені у зоопарк, були випущені в серпні у великий за площею (600 га) загін № 6, з хорошим і різноманітним травостоем. Якщо не враховувати відхід частини тварин (приблизно 30 %), в основному через травми, одержані при відловленні і транспортуванні, всі вони благополучно прижилися й успішно розмножувалися.

Наприкінці 1979 р. частина тварин через загорожу проникла у сусідній загін № 7 (площею 1383 га), розташований на степовій ділянці «Великий Чапельський під». У зимовий період сайгаки мають можливість переміщуватися ще й у загін № 2 (32,6 га). Невелика група перебуває ізольовано в загоні № 3 (площею 89,8 га). Таким чином, сучасна асканійська популяція сайгака утримується напіввільно на території загальною площею 2097,6 га. Загальна чисельність – близько 600 особин, що дає можливість планового розселення та реалізації сайгаків іншим природоохоронним установам.

Проведені систематичні спостереження за статевою поведінкою тварин, строками проявів статевої активності, паруванням, перебігом вагітності, народженням потомства; у молодих тварин вивчали інтенсивність розвитку, строки становлення статевої та фізіологічної зрілості. Під наглядом перебувало все стадо, чисельність якого в різні роки коливалась у межах від 35 до 620 особин. Для проведення гістологічних досліджень було використано 100 особин самок сайгаків, які загинули внаслідок травм або були еліміновані з різних причин (без ознак відхилення від фізіологічної норми).

Під час дослідження статевих органів самиць головну увагу звертали на вивчення розвитку яєчників, проходження овогенезу в різні вікові періоди і сезони року, строки дозрівання фолікулів, їхньої овуляції (чи атрезії), розвиток циклічних жовтих тіл і жовтих тіл вагітності [7]. Усі ці дані аналізували у посезонному розрізі з урахуванням вгодованості й поведінки тварин.

Одержані дані біометрично оброблено [8].

Результати і їхнє обговорення

У результаті досліджень встановлено, що активізація овогенезу в яєчниках дорослих самок сайгака розпочинається у літні місяці (липень-серпень) і визначається розвитком значної кількості фолікулів. Вони помітно виділяються своїми розмірами (3–5 мм у діаметрі), значним вмістом фолікулярної рідини, що надає їхнім стінкам щільності. Спостерігаючи за появою в яєчниках жовтих тіл атретичного походження, можна стверджувати, що в початковий період вони не досягають повної зрілості, а дегенерують з утворенням невеличких острівців лютеїнової тканини. Гормональна активність останньої відіграє важливу роль у зрушенні фізіологічного статусу організму самиць, спрямованого на інтенсифікацію статевих процесів, що, подібно до інших видів зі сезонним характером розмноження, зумовлюється скороченням світлового дня. Дозрівання фолікулів у дорослих самиць із подальшою їхньою овуляцією і утворенням справжніх жовтих тіл спостерігається восени та взимку, що вказує на їхню готовність до парування.

Враховуючи досить ранню активізацію сперматогенезу у самців і їхню високу статеву активність упродовж майже всього осіннього періоду, парування відбувається у відносно стислі строки – впродовж двох-трьох тижнів. У більшості спарованих самиць, досліджених у цей період, відмічена наявність зачаття зі синхронним розвитком зародків і плодів.

Активізація статевих процесів у дорослих самиць сайгака чітко підпорядкована сезонній біоритміці, про що свідчать дані досліджень генеративної функції яєчників у різні періоди року (див. таблицю).

Маса дорослої самиці впродовж року змінюється відносно мало і значною мірою зумовлена її фізіологічним станом та інтенсивністю проходження овогенезу в яєчниках. Овогенез, незважаючи на строгу сезонність відтворення у цього виду тварин, не припиняється повністю, про що свідчить наявність у яєчниках будь-якої пори року порівняно невеликої кількості фолікулів різних розмірів. Натомість у весняно-літній період настає сезон відносного статевого спокою, коли їхня кількість помітно зменшується.

Вікова та сезонна характеристика яєчників самок сайгака асканійської популяції

Строки дослідження	n	Вік самок	Маса яєчників, г	У яєчниках відмічено						
				жовтих тіл			фолікулів дозрілих	фолікулів діаметром, мм		
				циклічних	вагітності	атретичних		6 і >	5-3	до 2
27.IV	1	новонар.	0,8	–	–	–	–	–	–	5
24. V-I.VI	2	1 місяць	0,17–0,2	–	–	–	–	–	–	11–16
31. VII-16.VIII	6	3 місяці	0,15–0,37	–	–	–	–	–	–	10–28
22.VIII-29.VIII	2	4 місяці	0,44	–	–	–	–	–	0–8	24–32
3.IX	1	5 місяців	0,74	–	–	–	–	–	2	18
3-31.XI	2	6 місяців	0,7–0,8	–	–	0–2	–	–	–	15–25
7. I- 21. II	4	9 місяців	0,75–1,9	–	0–2	0–6	–	–	1–6	1–48
3. III	1	10 місяців	0,7	–	1	3	–	–	–	30
27. III-22. IV	6	11 місяців	0,4–1,42	–	0–2	0–1	–	–	0–4	1–21
6-28.V	6	12 місяців	0,72–0,11	–	1–2	0–1	–	–	–	6–19
21-26. VI	2	13 місяців	0,67–1,05	–	0–3	0–8	–	–	–	19–24
30. VII	1	14 місяців	0,82	–	–	–	–	–	2	27
1.VIII-7.VIII	3	15 місяців	0,67–0,86	–	–	0–2	–	–	0–3	9–14
1. X	1	17 місяців	1,11	–	–	1	–	1	9	16
11. VI	1	24 місяці	1,42	–	–	–	–	–	4	21
10-28.IV	2	доросла	1,2–1,9	–	2	0–1	–	–	–	3–13
28. V	1	доросла	1,2	–	2	–	–	–	1	17
6-18.VI	2	доросла	1,59–1,64	–	2	0–1	–	–	0–1	16–17
5-29.VII	4	доросла	0,98–1,66	–	0–2	1–5	–	–	2–8	11–39
1-29.VIII	6	доросла	1,05–1,6	–	–	1–4	0-1	–	0–8	8–42
12-27. IX	2	доросла	0,86–1,1	–	–	0–1	–	–	0–2	8–27
13. X	1	доросла	1,4	–	–	–	1	1	1	16
16-20. XII	3	доросла	0,86–1,6	0-2	–	0–3	0-1	0-1	1–6	7–13
21-29.I	2	доросла	1,5–2,27	1	–	–	0-1	–	1	4–9
22-23. II	2	доросла	1,15–1,51	0–2	0–1	1–3	1	0-1	3	14–16

Починаючи з другої половини літа з'являються крупніші фолікули, які, досягнувши певної стадії розвитку, дегенерують, утворюючи циклічні жовті тіла атретичного походження. Їхня гормональна активність сприяє подальшій активізації статевих процесів і, починаючи з другої половини вересня – в жовтні, у яєчниках більшості самиць з'являються вже дозрілі фолікули, або циклічні жовті тіла – спочатку ановуляторного, а згодом і овуляторного походження, що вказує на їхню готовність до парування, а отже, на початок статевого сезону.

Характерним для самиць сайгака є проходження субестрального періоду під час становлення сезону підвищеної статевої активності. У цей період відмічається лютеїнізація дозрілих фолікулів або їхня спонтанна овуляція, що супроводжується негативною реакцією на залицяння самців. Про це свідчить стан яєчників двох самиць, досліджених нами наприкінці II – на початку III декади грудня. У них знайдено циклічні жовті тіла 10–12-денної давності. Поряд із тим, відсутність зародків у порожнині рогів матки вказує на те, що субестральний період проходить спокійно (тихо), без зовнішніх ознак статевої активності. Відтак, самиці не парувалися з уже активними самцями і не запліднювались. Водночас наявність великих і вже дозрілих фолікулів у яєчниках цих самиць вказує на наближення наступного естрального періоду, який, судячи з поведінки більшості самиць стада, відбувався активно, з позитивною реакцією на залицяння самців. Наші спостереження підтверджуються наявністю жовтих тіл вагітності й розвинених ембріонів, відмічених у чотирьох вагітних самиць, досліджених у зимовий період. Судячи зі стану розвитку ембріонів, зачаття відбулося в середині грудня. У яєчниках цих самиць відмічено добре розвинені жовті тіла вагітності діаметром 8–10 мм і по 1–2 жовтих тіл субестрального циклу діаметром 3–4 мм.

Судячи з фізіологічного стану яєчників ялових самиць, нормальні статеві цикли у них спостерігаються впродовж усього осінньо-зимового періоду і визначаються переважно вгодованістю самок і їхньою підготовкою до парування. Про це свідчать також показники розвитку плодів у окремих самиць, досліджених у зимово-весняний період. Так, середня маса чотирьох плодів від чотирьох самиць, досліджених упродовж I–II декади січня, становила $1,43 \pm 0,39$ г з коливаннями в межах 0,5–2,4 г; п'яти плодів від трьох самиць, досліджених у III декаді січня, становила $5,5 \pm 2,07$ г з коливаннями в межах 0,4–9,4 г; восьми плодів від шести самиць, досліджених упродовж лютого $77,21 \pm 17,64$ г з коливаннями в межах 0,9–150,0 г.

У яєчниках лактуючих самиць спостерігаються добре розвинені жовті тіла вагітності, гормональна активність яких сприяє процесові лактації та успішному вгодовуванню потомства. Взаємодія ж естрогенних гормонів із гормональною активністю жовтих тіл вагітності підтримує статус відносного статевого спокою та сприяє поступовій підготовці до наступного парувального сезону.

Орієнтуючись на наявність жовтих тіл вагітності у яєчниках піддослідних самиць і кількість народженого потомства, ми визначили показники фізіологічної активності яєчників (строки дозрівання фолікулів, їхньої овуляції (чи атрезії), розвиток циклічних жовтих тіл і жовтих тіл вагітності), їхнє фактичне та потенційне багатопліддя. Встановлено, що фізіологічна активність яєчників вагітних самиць поширюється майже рівномірно на обидва яєчники і становить сумарно 51 випадок, у т.ч. у правому яєчнику – 31, у лівому – 20. Цей показник теоретично визначає ймовірне багатопліддя. Що стосується реального багатопліддя, то, орієнтуючись на наявність плодів, які розвивались у період досліджень, воно виявилось значно меншим і становило тільки 40 випадків (в т.ч. у правому розі матки – 22 «особини», у лівому – 18 «особин»). У самиць із наявністю одного плоду він розвивався в тому розі матки, у яєчнику якого відбулась овуляція, і запліднення яйцеклітини. Один випадок розвитку плоду в сусідньому розі був зумовлений завмиранням плоду в основному розі матки, вже після остаточного розподілу зародків до моменту їхньої нідації. У всіх випадках одностороннього дозрівання двох і більше фолікулів, їхньої овуляції та зачаття, «зайві» зародки мігрували у сусідній ріг матки. Нами відмічено 8 таких випадків, у т.ч. з правого рогу в лівій – 7 і з лівого у правій – 1.

Багаторічні спостереження за статевою поведінкою самиць сайги вказують, що їхнє парування на півдні України відбувається переважно у II декаді грудня з незначними від-

хиленнями і в більшості випадків вкладається в один статевий цикл (15–16 діб). Синхронний прояв статевої активності (охоти) самиць дає змогу брати участь у паруванні не лише самцям – домінантам гарему, але і самцям нижчого рангу, які ведуть конкурентну боротьбу за володіння самицями. Це відбувається в результаті одночасної появи у гаремі кількох самиць у стані охоти, коли основний самець проявляє зацікавленість однією з них, залишаючи на деякий час без уваги інших. Такі моменти використовують самці нижчого рангу, відбиваючи таких самиць із групи і паруючись із ними. Цим явищем можна пояснити синхронне запліднення основної маси самиць у короткі терміни впродовж практично одного статевого циклу. Із деяким відставанням відбувається парування молодих самиць поточного року народження.

У такі ж короткі терміни відбувається народження потомства, яке, враховуючи тривалість вагітності близько 145 діб [5, 14], у природних умовах припадає на I–II декаду травня. В Асканії-Нова отелення самиць сайгаків відбувається зі зміщенням на більш ранні терміни (до двох тижнів) і зумовлюється строками активізації статевих процесів у період попереднього гону. Зокрема, у 2010 р. масове ягніння зафіксоване з 25 квітня до 2 травня, у 2011 р. – з 27 квітня до 5 травня, у 2012 р. – з 30 квітня до 6 травня, у 2013 р. – з 27 квітня до 5 травня, у 2014 р. – з 23 до 28 квітня, у 2015 р. – з 1 до 5 травня. Натомість у 2014 р. відмічено випадок пізнього ягніння (28 липня), що свідчить про настання естрального періоду взимку та парування зі ще активними у цей період самцями.

Незначні коливання у термінах запліднення та ягніння самиць зумовлюється кормовим чинником, зокрема, наявністю зеленого корму, поїдання якого у літньо-осінній період активізує проходження овогенезу, дозрівання ооцитів, їхню біологічну повноцінність, що, врешті, сприяє підвищенню багатопліддя.

Такі результати підтверджуються і літературними даними [6, 14]. Зокрема, тривала посуха 1958 р. у Калмикії зумовила затримку прояву статевої активності самиць, їхнього парування та ягніння на 10–12 діб, що негативно відобразилося на багатоплідді [14]. Останній показник зумовлений також віковим чинником і притаманний, в основному, дорослим – 3–6-річним самцям [3, 9, 10]. Оскільки дорослі самиці виявляють статеву активність у більш ранні терміни, відтак багатопліддя (переважно двійні) припадає на ранні строки ягніння. Що стосується залежності пересічних строків прояву статевої активності самиць і їхнього парування від кліматичних умов в окремих географічних зонах, то вони, судячи з літературних даних, помітно зміщуються на більш пізні строки із просуванням у північно-східному напрямку. Якщо для півдня України вони припадають в основному на I–II декаду грудня з максимальною кількістю плідних парувань з 5 по 15 грудня і поступовим спадом до кінця місяця, то для Калмикії основний період парувань припадає на II та III декаду грудня з максимальною кількістю плідних парувань з 16 по 26 грудня при загальній тривалості парувального періоду з 3 по 30 грудня [4]. На цьому тлі, для районів лівого берега Волги і західного Казахстану строки парувань майже збігаються (20–28 грудня) [9]. Для центральних і східних районів Казахстану строки плідних парувань зміщуються приблизно на 10 діб [10], для Монголії – ще на 10 діб [14]. Загальна тривалість основного парувального періоду на теренах сучасного ареалу виду становить 35–45 діб, але прояви статевої активності у незапліднених самиць тривають довше. В умовах півдня України статеві цикли з дозріванням фолікулів, їхньою овуляцією й утворенням жовтих тіл відбуваються впродовж усієї зими і навіть ранньої весни, про що свідчить стан яєчників двох самиць, досліджених у цей період. У яєчниках однієї з них, дослідженої у III декаді лютого, відзначено 2 циклічних жовтих тіла, що утворилися на місці фолікулів, які овулювали за 13–15 діб напередодні, 17 фолікулів діаметром 2–5 мм і 1 дозрілий фолікул діаметром 7 мм,

наявність якого вказує на наближення наступного естрального періоду. У другій самиці, дослідженої у I декаді березня цього ж року, відмічена наявність одного циклічного жовтого тіла овуляторного походження і 30 дрібних фолікулів діаметром до 2 мм. Наявність більших фолікулів, які би свідчили про дозрівання ооцитів у яєчниках цієї самиці, не відмічено, що вказує на настання періоду відносного статевого спокою.

Стосовно жовтих тіл атретичного походження, то їхня наявність у яєчниках вказує на лютеїнізацію додатково дозрілих фолікулів, яка відбувається паралельно з розвитком нормальних циклічних жовтих тіл овуляторного походження (за відсутності вагітності) або жовтих тіл вагітності (за наявності зачаття).

Можливе статеве дозрівання молодих самиць на першому році життя (у 7–8-місячному віці) [5, 6, 10, 13]. Так, відмічено, що зі 140 досліджених у 1958 р. самиць у віці 8–12 місяців вагітними виявилися 85 %; із 67 досліджених у 1959 р. – 44,8 %. Зменшення кількості вагітних молодих самиць у 1959 р. пояснюється епідемією упродовж літніх і осінніх місяців 1958 р. [13].

Активізація овогенезу у самиць поточного року народження розпочинається у трохи пізніші строки (жовтень–листопад), ніж у дорослих, і характеризується поступовим розвитком фолікулів та дозріванням ооцитів. Згідно з літературними даними, статевої зрілості вони досягають у віці 7–8 місяців [2, 5] або ж у віці 19–20-місяців [4, 10]. Окремі автори [6, 10] вважають, що самки поточного року народження беруть участь у розмноженні частково, маючи на увазі лише добре розвинених тварин. Таке явище типово і для молодих самиць асканійської популяції. У цей період (січень–грудень) вони привертають увагу ще активних самців 18–20-місячного віку, які у період гону, з огляду на низький ієрархічний статус, залишаються поза межами гаремів. Їхнє передчасне парування рідко дає позитивні результати. Нами встановлено, що утворені зародки чи навіть плоди у більшості випадків відмирили на різних стадіях розвитку через біологічну неповноцінність. Сформовані плоди часто гинули під час важких пологів, новонароджені – за неспроможності матерів годувати їх у постнатальний період. За нашими спостереженнями, не більше 20 % таких самиць спроможні нормально виносити, народити й вигодувати потомство.

Характерно, що під час дослідження геніталій трьох самиць поточного року народження впродовж відтворювального сезону 2015 р. та 2016 р. у їхніх яєчниках не відмічено циклічних жовтих тіл субестрального походження. Вони утворюються на місці вперше дозрілих фолікулів і в подальшому гормонально стимулюють підготовку фізіологічного стану матки для прийому майбутнього зародка. Відтак, можна стверджувати, що у віці 7–8 місяців самиці сайги не досягають статевої зрілості. Проте «насильне» покриття рефлекторно викликає у них овуляцію ще не дозрілих фолікулів, виділення біологічно неповноцінних яйцеклітин і їхнє запліднення. Тому стає очевидним, що вже з цього періоду починається негативний вплив вказаних чинників на подальшу долю зародків і плодів. Дані Є.П. Васенко [4] та А.А. Фандеева [13] також свідчать про високу ембріональну смертність у таких самиць і низьке виживання одержаного від них потомства.

Дослідження геніталій ще двох самиць у віці 18–19 місяців свідчать, що у їхніх яєчниках, крім «справжніх» жовтих тіл вагітності, наявні також жовті тіла субестрального походження, які сприяють подальшому проходженню всіх біологічних процесів (розвитку матки, яєчників, фолікулів і яйцеклітин, слизової оболонки рогів матки тощо), спрямованих на утворення нормальних умов розвитку майбутнього плоду. Відтак, стає очевидним, що самиці сайгака стають фізіологічно зрілими на другому році життя, зокрема, у 18–19-місячному віці – в період настання гону [4, 13].

Підводячи підсумки проведеного нами аналізу показників відтворювальної здатності самок сайгака в умовах напіввільного утримання на півдні України, можна дійти висновку, що вони мало чим відрізняються від аналогічних показників цього виду тварин із автохтонних популяцій. Деякі відхилення у той чи інший бік визначаються в основному кліматичними умовами та наявністю зеленого корму. Напіввільне утримання сайгаків на великих степових територіях і їхнє самостійне визначення власної трофічної бази сприяють нормальному функціонуванню репродуктивних органів, що, зрештою, визначає їхню успішну реакліматизацію у степових районах півдня України.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Адольф Т. А.* Некоторые данные по биологии сайгака в Астраханских степях // Ученые записки МГПИ им. Потемкина. Зоология. 1954. Т. 7. Вып. 2. С. 125–139.
2. *Банников А. Г., Журнов Л. В., Лебедева Л. С., Фандеев А. А.* Биология сайгака. М., 1961. 336 с.
3. *Банников А. Г.* Млекопитающие Монгольской Народной Республики // Труды Монгольской комиссии АН СССР. 1954. № 53. 669 с.
4. *Васенко Е. П.* Экология и распространение сайги (*Saiga tatarica* L.) // Труды гос. заповедника Барса-Кельмес. Алма-Ата. 1950. Вып. 1. С. 38–115.
5. *Даль С. К., Гусев В. М., Бедный С. Н.* Об экологии и размножении сайги // Зоолог. журнал. 1958. Т. 37. Вып. 3. С. 447–456.
6. *Лавровский А. А.* О влиянии летней засухи и суровой зимы 1949/50 г. на численность и размещение сайгаков // Охрана природы. 1950. № 10. С. 83–87.
7. *Паришутин Г. В., Смирнов-Угрюмов Д. В.* Искусственное осеменение сельскохозяйственных животных. М.: Сельхозиздат, 1962. 280 с.
8. *Плохинский Н. А.* Руководство по биометрии для зоотехников. М.: Колос, 1969. 256 с.
9. *Раков Н. В.* Сайгак в Западном Казахстане // Труды Ин-та зоологии АН Каз. ССР. Алма-Ата. 1956. Т. 6. С. 28–60.
10. *Слудский А. А.* Сайгак в Казахстане // Труды Ин-та зоологии АН Каз. ССР. 1955. Т. 4. С. 18–55.
11. *Смаголь В. О.* Динаміка чисельності популяції сайгака *Saiga tatarica* L. в заповіднику «Асканія-Нова» та чинники, що її зумовлюють // Вісті Біосферного заповідника «Асканія-Нова». 2015. Т. 17. С. 77–81.
12. *Степленьов Є. П., Смаголь В. О.* Формування субпопуляції сайгака (*Saiga tatarica* L.) в заповіднику «Асканія-Нова» // Наук. вісн. Нац. ун-ту біоресурсів і природокористування України. Сер. Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва. К., 2011. Вип. 160. Ч. 1. С. 352–363.
13. *Фандеев А. А.* Размножение и развитие сайгака в связи с вопросами рационализации промысла: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1965. 21 с.
14. *Vannicov A. G.* Exploitation on the Saiga antelope in the USSR // Symp. Inst. Biol. 1963. N 11. P. 45–52.

Стаття: надійшла до редакції 27.02.17

доопрацьована 01.06.17

прийнята до друку 15.06.17

**REPRODUCTIVE ABILITY OF SAIGA FEMALES *SAIGA TATARICA*
LINNAEUS, 1766 OF ASKANIAN POPULATION**

Ye. Steklenev, V. Smagol

*The F.E. Falz-Fein Biosphere Reserve "Askania Nova", NAAS of Ukraine
15, Parkova St., Askania-Nova, Chaplynka district
Kherson region, 75230 Ukraine
e-mail: smagol19750@ukr.net*

The reproductive ability indicators of saiga female under conditions of semi-free dwelling in southern Ukraine were studied. It has been defined that activation of ovogenesis of saiga females begins in summer months (July-August) and is determined by the growth of a significant number of follicles. Maturation of follicles in adult females is observed in late autumn and in winter, that indicates their readiness to mate. Animal mating occurs in the short term within two or three weeks. The availability of pregnancy with enough simultaneous development of embryos and fetuses was surveyed in all females in winter-spring period. Activation of ovogenesis in young females begins later (October-November) than in adults, and is characterized by follicular development and oocytes' maturation. Only a few well-developed females (up 20 %) reach puberty in 7–8-months, they become physiologically mature at 18–19 months of age. The indicators of reproductive females ability of Askanian saiga populations do not differ from similar parameters of this species of autochthonous populations. Some deviations in direction of terms of display of sexual activity are determined primarily by the climatic conditions and the availability of green fodder. The semi-free saiga dwelling at the large areas of Southern steppes and selective grazing of grasses promote normal functioning of all organs and systems, which ultimately determines its successful re-acclimatization.

Keywords: Saiga tatarica, re-acclimatization, semi-free dwelling, the reserve "Askania Nova", reproductive females ability, sexual activity, mating

МІКРОБІОЛОГІЯ

УДК 579.26:635.1/8-035.2

**ДЕТЕКЦІЯ ЕНТЕРОТОКСИГЕННИХ *BACILLUS CEREUS*
У РОСЛИННІЙ СИРОВИНІ**

Г. Ямборко^{1*}, Л. Пилипенко², І. Пилипенко²

¹Одеський національний університет імені І.І. Мечникова
вул. Дворянська, 2, Одеса 65082, Україна
e-mail: jamborko@mail.ru

²Одеська національна академія харчових технологій
вул. Канатна, 112, Одеса 65039, Україна

Своєчасне виділення й ідентифікація бактерій роду *Bacillus* – представників епіфітної мікробіоти рослинної сировини – є необхідним кроком для прогнозування і гарантування безпеки рослинної продукції та дає змогу оперативно вносити корективи у технологічний процес консервування, а це, у свою чергу, забезпечує відповідність продуктів харчування міжнародним стандартам. У результаті досліджень розроблено методику підготовки зразків харчових продуктів і оптимізовано параметри полімеразно-ланцюгової реакції з підібраними групо- і видоспецифічними праймерами для діагностики у тестованих зразках регламентованих бацилярних контамінантів, які впливають на безпеку продукції – штамів *Bacillus cereus*. Полімеразна ланцюгова реакція зі специфічними праймерами *nhe A F* і *nhe A R*, підібраними до ділянки гена *nhe A*, підтвердила приналежність усіх тестованих штамів, виділених із рослинної сировини та консервів, до виду *Bacillus cereus*; розмір ампліконів становив 553 п.о. Температура 50 °С виявилася оптимальною для відпалу праймерів *nhe AF* та *nhe AR* гена до *nhe A B. cereus*. Мінімальна кількість клітин *B. cereus*, яку можна виявити у рослинній сировині методом ПЛР, дорівнює 10²КУО/мл, що свідчить про високу чутливість ПЛР.

Ключові слова: безпека рослинної продукції, полімеразна ланцюгова реакція, ентеротоксигенні *Bacillus cereus*

Підвищення ризиків захворювання від їжі пов'язане з поширенням і накопиченням традиційних та емерджентних мікроорганізмів у зв'язку з новими технологіями переробки, пакування і тривалого зберігання сировини, з використанням продукції із географічно віддалених від виробника країн та ін. [1]. При контролюванні санітарної безпеки харчових продуктів особливу увагу приділяють умовно-патогенним і патогенним мікроорганізмам, тоді як спороутворювальні мікроорганізми вивчають тільки за показником мезофільних анаеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів (МАФАНМ). Однак, за даними науковців, деякі мікроорганізми цієї групи не є індиферентними і здатні спричинити псування продукції та харчові отруєння; значна частина цих отруєнь обумовлена ентеротоксигенними штамми *Bacillus cereus* [5, 10]. Класичні методи дослідження даних мікроорганізмів тривалі та трудомісткі, потребують виділення чистої культури з визначенням комплексу властивостей для ідентифікації та дають змогу провести лише умовну видову діагностику виділених мікроорганізмів. Тому мета роботи – провести молекулярно-генетичну діагностику ентеротоксигенних бактерій групи *B. cereus* у зразках рослинної сировини – овочів, фруктів, ягід – і продуктів її переробки півдня України.

Матеріали та методи

Для імітації інфікування та пошуку бактерій і їхніх ДНК у зразках рослинної продукції використовували штами мікроорганізмів із колекції культур кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова і кафедри біохімії, мікробіології та фізіології харчування Одеської національної академії харчових технологій: *Bacillus cereus* ATCC 11778; *B. cereus* ATCC 10702; *B. cereus* УКМ В-5650; *B. cereus* УКМ В-5671; *Paenibacillus polymyxa* В-5760^Т; *P. macerans* В-5803^Т, *Geobacillus stearothermophilus* ВКМ В-718, а також штами бацил, що були ізольовані з рослинної сировини, районованої в Україні та вирощеної в Одеській області (морква, перець болгарський, баклажани, томати, кабачки), та з консервів з ознаками псування («Гриби натуральні відварені», «Сік морквяний», «Ікра кабачкова»).

Попередня обробка зразків. Для досліджень були використані свіжий зелений горошок, салат, зелений горошок консервований і яблучний сік консервований. Зі свіжої рослинної сировини брали змиви із середньої проби стерильним фізіологічним розчином згідно з нормативними рекомендаціями [3]. Усі консервовані зразки їжі раніше були підтверджені як такі, що не були контаміновані *B. cereus*, чашковим методом Коха. Зразки рідини, отриманої з консервів і рослинної сировини, було інокульовано добовою культурою кожного зі штамів бацил ($\sim 10^8$ КУО/мл) у співвідношенні 1:1. Тестовані штами вирощували у серцево-мозковому бульйоні (BHI, Difco Laboratories, Detroit, MI, U.S.A.) протягом 24 год за температури 30 °С.

Надалі дослід проводили у трьох варіантах: 1) 1,5 мл рідини, інокульованої бактеріями, без попередньої обробки брали для виділення ДНК; 2) 2,5 мл рідини, інокульованої бактеріями, центрифугували для видалення суспензії залишків органічних речовин 2 хв при 2000 об/хв, після чого зразки фільтрували крізь нітроцелюлозні мембранні фільтри «Millipore» (діаметр пор 0,22 мкм); 3) 2,5 мл рідини, інокульованої бактеріями, піддавали подвійному центрифугуванню за обраними параметрами. Після центрифугування відбирали 1,5 мл осаду. Для швидкого виділення з фільтра і очищення ДНК бактеріальних клітин використовували набір F1021 (SureFast[®] PREP Bacteria, CONGEN Biotechnologie GmbH, Germany).

Визначення *B. cereus* за допомогою ПЛР. Детекція ДНК бактерій у зразках рослинної продукції та визначення приналежності досліджуваних штамів до бактерій групи *B. cereus* у процесі імітації інфікування тестованої сировини проводили за допомогою полімеразної ланцюгової реакції за методом Park і співавт. [12]. Склад суміші для проведення ПЛР: 10хПЛР буфер – 2 мкл, 50 мМ MgCl₂ – 0,8 мкл, 2,5 мМ дНТФ – 1,6 мкл, Таq-полімераза (5 Од/мкл) – 0,4 мкл, загальний об'єм суміші ПЛР – 20 мкл. Цикли ПЛР: первинна денатурація – 94 °С 5 хв, 30 циклів ампліфікації при денатурації 94 °С 30 с, відпалі при 63 °С 30 с, елонгації при 72 °С 30 с, та фінальна елонгація 72 °С 5 хв. Реакцію проводили в ампліфікаторі BioRad (США).

Використовували такі пари специфічних олігонуклеотидних праймерів для гена *groEL*, який характерний для всіх штамів групи *Bacillus cereus*: BCGSH – 1F GTGCGAAC-ССААТGGGTCTTC, BCGSH – 1R CCTTGTGTACCACTTGCTC [6, 12]. Як негативний контроль використовували ПЛР-суміш без ДНК. Візуальну оцінку розміру утворених ампліконів проводили з використанням маркерів молекулярної ваги (pBR322/BsuRI, Fermentas, Латвія).

Для детекції ентеротоксигенних штамів *B. cereus* у зразках було використано такі комбінації штамів бактерій: 1) суміш штамів *B. cereus* для імітації виявлення природного

забруднення; 2) суміш штамів *B. cereus*, *Paenibacillus polymyxa* і *P. macerans* для виявлення окремих видів у суміші.

Для проведення молекулярно-генетичної діагностики бацилярних контамінантів за допомогою ПЛР використовували пару специфічних олігонуклеотидних праймерів (nhe AF AAGGCGAATGTACGAGAGTGG, nhe AR CTTCTCTCGTTTGACATCTGCAG), які були обрані на підставі даних літератури [9] та синтезовані ТОВ НПФ «Сіместа ВААЛ» (Одеса, Україна) для ентеротоксичного гена *nhe A*, характерного для всіх ентеротоксигенних штамів виду *Bacillus cereus*. Оптимізацію температури відпалу ПЛР-ампліфікації здійснювали, використовуючи формулу

$$T_m = [(A + T) \times 2^\circ \text{C}] + [(G + C) \times 4^\circ \text{C}] \quad [7],$$

з урахуванням того, що сумарна довжина олігонуклеотиду не перевищує 20 основ.

Для виявлення чутливості ПЛР під час індикації ентеротоксигенних бактерій групи *B. cereus* було застосовано вісім десятикратних розведень суміші добових культур штамів *B. cereus* у рослинній консервованій продукції: 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 КУО/мл. Рідину з консервованої продукції попередньо центрифугували 2 хв при 2000 об/хв для видалення залишків органічних речовин. Потім 5 мл рідини з певного розведення, інокульованої клітинами *B. cereus*, фільтрували крізь нітроцелюлозні мембранні фільтри «Millipore» (діаметр пор 0,22 мкм) для видалення залишків органічних речовин у продукті, а також для концентрування мікроорганізмів. Фільтр після фільтрації використовували для виділення ДНК з використанням експрес-набору F1021, як на попередніх етапах.

Результати і їхнє обговорення

Харчові отруєння, спричинені наявністю *B. cereus* у продуктах харчування як рослинного, так і тваринного та змішаного походження, реєструють практично в усіх країнах. Під час виробництва консервованих продуктів головним джерелом їхнього інфікування *B. cereus* слугує основна сировина і допоміжні матеріали. Оскільки мікроорганізми цієї групи викликають хвороби харчового походження та є потенційно ентеротоксичними для людини, здатність швидко виявляти *B. cereus* у рослинній сировині має вирішальне значення [8].

Тому на першому етапі за допомогою ПЛР підтверджували приналежність досліджених штамів, якими інокулювали тестовану сировину, до бактерій виду *B. cereus*. Усі зразки раніше були підтверджені як негативні за наявністю *B. cereus*. Використовували колекційні штами бацил *B. cereus* ATCC 11778; *B. cereus* ATCC 10702; *B. cereus* УКМ В-5650; *B. cereus* УКМ В 5671, а також штами бацил, що були ізольовані з рослинної сировини та з консервів з ознаками псування та, згідно з результатами попередніх досліджень, ідентифіковані як *B. cereus* шляхом встановлення їхніх фізіолого-біохімічних ознак і жирнокислотного складу клітин [4].

Для обрання найбільш ефективного методу попередньої обробки зразків сировини та продуктів для виявлення ентеротоксинпродукуючих бактерій виду *B. cereus* зразки інокулювали культурою кожного з досліджених штамів бацил, а подальші експерименти з виділенням ДНК бацил проводили у трьох варіантах: зразки, інокульовані бактеріями, без попередньої обробки (лунки 4, 5), зразки, які підлягали центрифугуванню для видалення органічних залишків із подальшим фільтруванням крізь нітроцелюлозні мембранні фільтри (лунки 2, 3) і зразки після подвійного центрифугування за обраними параметрами (лунки 6, 7) (рис. 1).

У разі проведення ПЛР з двома парами специфічних праймерів BCGSH усі тестовані штами *B. cereus* утворювали амплікон розміром 400 п.н. до гена *groEL*, який характерний для всіх представників групи *Bacillus cereus*.

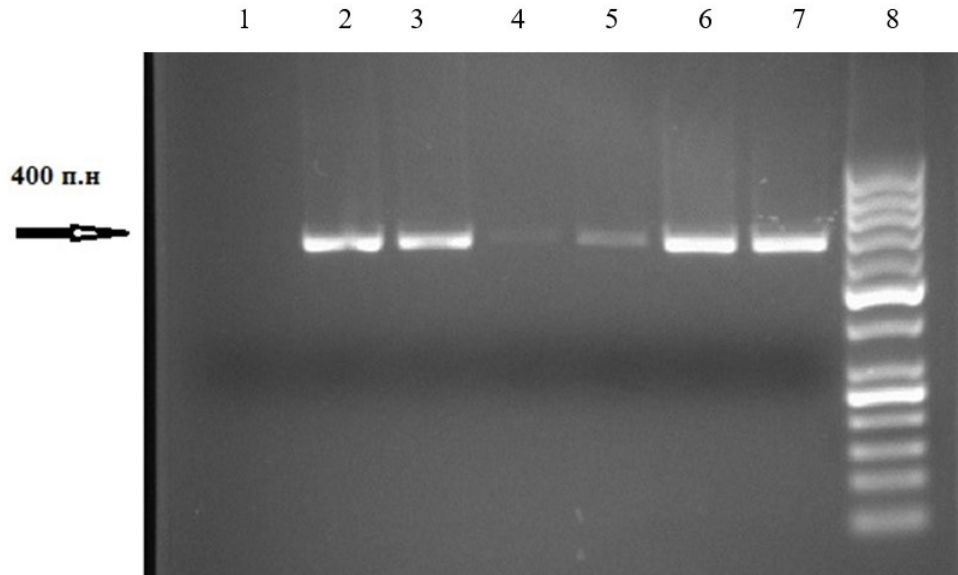


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ПЛР із ДНК штамів *B. cereus* з парою специфічних олігонуклеотидних праймерів до гена *groEL*: 1) негативний контроль ПЛР; 2) *B. cereus* УКМ В-5671 (центрифугування, фільтрування); 3) *B. cereus* АТСС 10702 (центрифугування, фільтрування); 4) *B. cereus* УКМ В-5671 (без попередньої обробки); 5) *B. cereus* АТСС 10702 (без попередньої обробки); 6) *B. cereus* УКМ В-5671 (подвійне центрифугування); 7) *B. cereus* АТСС 10702 (подвійне центрифугування); 8) маркери молекулярної маси (pBR322/BsuRI, Fermentas)

Таким чином, метод попередньої обробки зразків рослинної сировини і продуктів з подвійним центрифугуванням дає змогу видалити залишки органічних речовин у продуктах, а також сконцентрувати мікроорганізми. Виявлено, що основна маса мікроорганізмів міститься в осаді після другого центрифугування, що дає змогу повноцінно проводити ПЛР їх дослідження, зокрема, *B. cereus* із групо- і видоспецифічними праймерами. Даний спосіб обробки проб був визначений як пріоритетний і використовувався для подальших досліджень.

B. cereus викликає діарейний і блювотний синдроми, оскільки продукує різні екзотоксини, до яких належать їх три основних типи, а саме гемолізін ВЛ (HBL), негемолітичний ентеротоксин (NHE) і цитотоксин К (cyt K) [11]. Серед штамів *B. cereus* набули значного поширення ентеротоксичні гени *hbl A*, *nhe A*, *cyt K* і Fm (ентеротоксин FM). Проте ми відібрали тільки ген *nhe A* для проведення ПЛР, зважаючи на його найбільшу поширеність, яку пов'язують з основною роллю у харчових отруєннях. Результати ПЛР зі зразками продуктів, що інокульовані різними комбінаціями бактерій, з використанням специфічних праймерів *nhe A F* і *nhe A R*, наведено на рис. 2.

Полімеразна ланцюгова реакція зі специфічними праймерами *nhe A F* і *nhe A R*, підібраними до ділянки гена *nhe A*, підтвердила приналежність усіх тестованих штамів до ентеротоксигенного виду *Bacillus cereus*. Розмір ампліконів становив 553 п.н., що вказувало на належну специфічність ПЛР. У разі проведення ПЛР-аналізу ДНК колекційних штамів *Paenibacillus polymyxa* В-5760^T, *P. macerans* В-5803^T і *Geobacillus stearothermophilus* ВКМ В-718 з праймерами *nhe A* і в негативному контролі (ПЛР-суміш без ДНК) не було виявлено продуктів ампліфікації.

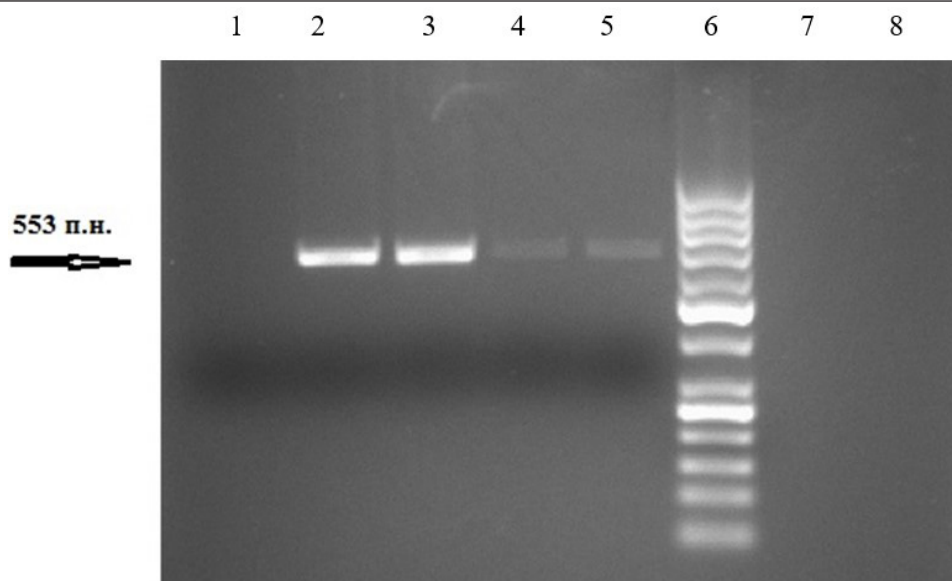


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ПЛР із ДНК штамів *B. cereus*, *P. polymyxa* і *P. macerans* з парою специфічних праймерів до гена *nhe A*: 1) негативний контроль ПЛР; 2) суміш штамів *B. cereus* (*B. cereus* ATCC 11778, *B. cereus* ATCC 10702, *B. cereus* УКМ В-5650, *B. cereus* УКМ В-5671); 3) суміш штамів *B. cereus*, *P. macerans* і *P. polymyxa* (*P. macerans* В-5803^T, *P. polymyxa* В-5760^T, *B. cereus* ATCC 11778, *B. cereus* ATCC 10702, *B. cereus* УКМ В-5650, *B. cereus* УКМ В-5671); 4) *B. cereus* П90-1 (з моркви); 5) *B. cereus* Л-3 (з консервів «Ікра кабачкова»); 6) маркери молекулярної маси (pBR322/BsuRI, Fermentas); 7) суміш штамів *P. polymyxa* В-5760^T і *P. macerans* В-5803^T; 8) *Geobacillus stearothermophilus* ВКМ В-718

Становило інтерес протестувати штами *B. cereus*, ізольовані нами з рослинної сировини та консервів, на наявність ентеротоксичного гена *nhe A*, який характерний для всіх ентеротоксигених представників виду *Bacillus cereus*. Виявлено, що при застосуванні специфічних праймерів *nhe AF* і *nhe AR* утворювалися амплікони розміром 553 п.н. у всіх досліджуваних штамів виду *B. cereus*, що вказує на наявність у цих штамів ентеротоксичного гена *nhe A*. Оскільки бактерії виду *B. cereus* поширені у зовнішньому середовищі, а саме у ґрунті, виявлення їх у змивах із поверхні рослинної сировини цілком ймовірне. Однак викликає стурбованість той факт, що ентеротоксигенний штам *B. cereus* Л-3 був ізольований нами з консервів «Ікра кабачкова». Найбільш імовірною причиною наявності цих бактерій у стерилізованих консервах може бути потрапляння їх у продукт за умов порушення герметичності тари під час стерилізації, укупорювання, тимчасової негерметичності у процесі охолодження консервів або за недотримання режимів теплової обробки.

У ході роботи було проведено оптимізацію параметра ПЛР-ампліфікацій – температури відпалу – з метою підвищення чутливості методу. Для точного розрахунку оптимальної температури відпалу праймерів *nhe AF* та *nhe AR* за їхнім нуклеотидним складом використовували рекомендовану формулу [7]. Однак розрахункова температура відпалу є приблизною і потребує експериментальної оптимізації. Варіювали температурою відпалу праймерів 48 °С, 50 °С, 54 °С. За низької температури відпалу праймерів 48 °С спостерігали велику кількість неспецифічних ампліконів. За температури відпалу 54 °С не вдалося одержати специфічні продукти ампліфікації. Температура 50 °С виявилася оптимальною для відпалу праймерів *nhe AF* та *nhe AR* гена до *nhe A Bacillus cereus*.

Видимі зміни органолептичних властивостей консервованого продукту, в якому розмножуються мікроорганізми, зазвичай спостерігають за титру бактерій не менш 10^7 – 10^8 КУО у 1 г. З цього випливає, що загальне бактеріальне обсіменіння продуктів не має перевищувати 10^7 КУО/г. Нормативи допустимої контамінованості продуктів збудниками харчових отруень, зокрема, ентеротоксигенним видом *B. cereus*, встановлюють за санітарно-гігієнічними показниками, які набагато нижчі 10^7 КУО у 1 г. Продукт, який містить збудники харчових отруень, частіше за все має нормальні органолептичні властивості [2]. Тому було проведено визначення чутливості ПЛР для виявлення клітин бацилярних контамінантів у тестованих зразках.

Для цього було підготовлено зразки продуктів зі сумішню колекційних штамів *B. cereus* (*B. cereus* ATCC 11778, *B. cereus* ATCC 10702, *B. cereus* УКМ В-5650, *B. cereus* УКМ В- 5671) шляхом десятикратних розведень до концентрацій 10^1 – 10^8 КУО/мл.

У результаті проведених досліджень виявлено, що контамінацію клітинами бацил зразків рідини з консервів виявляли вже у розведенні 10^{-2} (рис. 3).

1 2 3 4 5 6

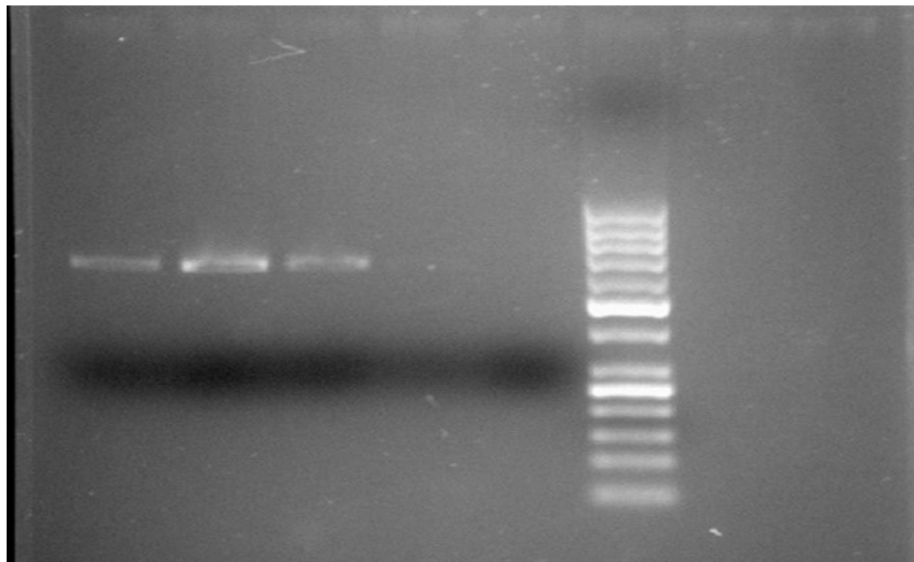


Рис. 3. Електрофореграма продуктів ПЛР із ДНК штамів виду *B. cereus* з парою специфічних олігонуклеотидних праймерів до гена *nhe A*, з різним титром бактерій (КУО/мл): 1) 10^4 ; 2) 10^3 ; 3) 10^2 ; 4) 10^1 ; 5) негативний контроль ПЛР; 6) маркери молекулярної маси (pBR322/BsuRI, Fermentas)

Згідно з отриманими даними щодо чутливості ПЛР для виявлення клітин бацил у зразках рідини з консервів, було з'ясовано, що титр бактеріальних клітин має становити не менш 10^2 КУО/мл, що свідчить про високу чутливість ПЛР.

Так, полімеразна ланцюгова реакція з видоспецифічними праймерами, підібраними до ділянки гена *nhe A*, надає можливість ідентифікації окремих штамів та індивідуальних контамінантів виду *B. cereus*, на що вказувала наявність ампліконів на електрофореграмі продуктів ПЛР розміром 553 п.н., що дає можливість проводити прискорену молекулярно-генетичну діагностику бактерій виду *B. cereus* у разі контамінування консервованої продукції бацилами.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Галынкин В. А., Заикина Н. А., Шевелева С. А. и др. Микробиологические основы НАССР при производстве пищевых продуктов. СПб.: Проспект науки, 2007. 350 с.
2. Джей Дж. М., Лёсснер Дж., Гольден Д. А. Современная пищевая микробиология. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. 886 с.
3. ГОСТ 26668-85. Продукты пищевые и вкусовые. Методы отбора проб для микробиологических анализов. М.: СТАНДАРТИНФОРМ, 2008. 6 с.
4. Ямборко Г. В., Остапчук А. М., Сергеева Ж. Ю. та ін. Хемотаксономічні особливості та плазмідні профілі аеробних та факультативно-анаеробних спороутворювальних бактерій з овочевої продукції // Мікробіологія і біотехнологія. 2017. № 1 (37). С. 56–72.
5. Biesta-Peters E. G., Dissel S., Reij M. W. et al. Characterization and Exposure Assessment of Emetic *Bacillus cereus* and Cereulide Production in Food Products on the Dutch Market // J. Food Prot. 2016. Vol. 79. N 2. P. 230–238.
6. Chang Y. H., Shangkuan Y. H., Lin H. C., Liu H. W. PCR assay of the groEL gene for detection and differentiation of *Bacillus cereus* group cells // Appl. Environ. Microbiol. 2003. P. 4502–4510.
7. Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J. Optimization of PCRs. In PCR protocols: A guide to methods and applications // Academic Press. San Diego. 1990. P. 3–12.
8. Flores-Urbá K., Natividad-Bonifaci I., Vázquez-Quiñone, C. et al. Detection of Toxigenic *Bacillus cereus* Strains Isolated from Vegetables in Mexico City // J. Food Prot. 2014. Vol. 77. Issue 12. P. 21–44.
9. Kalyan Kumar T. D., Murali H. S., Batra H. V. Multiplex PCR assay for the detection of enterotoxigenic *Bacillus cereus* group strains and its application in food matrices // Indian J. Microbiol. 2010. Vol. 50. N 2. P. 165–171.
10. Kleter G. A., Parandini A., Filippi L., Marvin H. J. P. Identification of potentially emerging food safety issues by analysis of reports published by the European Community's Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) // Food Chem. Toxicol. 2009. Vol. 47(5). P. 932–950.
11. Ngamwongsatita P., Buasria W., Pianariyanona P. et al. Broad distribution of enterotoxin genes (hblCDA, nheABC, cytK, and entFM) among *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* as shown by novel primers // Int. J. Food Microbiol. 2008. Vol. 121. P. 352–356.
12. Park S. H., Kim H. J., Kim J. H., Kim T. W. Simultaneous detection and identification of *Bacillus cereus* group bacteria using multiplex PCR // J. Microbiol. Biotechnol. 2007. Vol. 17 (7). P. 1177–1182.

Стаття: надійшла до редакції 24.04.17

доопрацьована 03.07.17

прийнята до друку 10.07.17

**DETECTION OF ENTEROTOXYGENIC *BACILLUS CEREUS*
IN VEGETABLE RAW MATERIALS**

G. Yamborko¹, L. Pylypenko², I. Pylypenko²

¹*Odessa I. I. Mechnikov National University
2, Dvoryanska St., Odesa 65082, Ukraine
e-mail: jamborko@mail.ru*

²*Odessa National Academy of Food Technologies
112, Kanatna St., Odesa 65039, Ukraine*

The distinction and identification of bacilli – representatives of the plant raw materials epiphytic microbiota is a necessary step for forecasting and ensuring the safety of plant products. It allows to promptly make adjustments to the technological process of preservation, which ensures the accordance of food products to the international standards. The technique for preparing food samples has been developed and polymerase chain reaction parameters with selected group- and species-specific primers have been optimized. This provides a way to diagnose regulated bacillary contaminants in the test samples that affect the safety of products – *Bacillus cereus* strains. Polymerase chain reaction with specific primers nhe A F and nhe A R, selected to the site of the gene *nhe A*, confirmed the affiliation of all tested strains isolated from plant material and canned to the enterotoxigenic *Bacillus cereus* species; the size of the amplicons was 553 bp. The temperature of 50 °C was found to be optimal for the annealing of the nhe AF and nhe AR primers to *nhe A Bacillus cereus* gene. The minimum quantity of *B. cereus* cells that can be detected in the plant material by PCR is 10² CFU/ ml, which indicates a high PCR sensitivity.

Keywords: safety of plant products, polymerase chain reaction, enterotoxigenic *Bacillus cereus*

ЕКОЛОГО-ТРОФІЧНІ ГРУПИ МІКРООРГАНІЗМІВ ВОДИ ОЗЕРА ЯВОРІВСЬКЕ

О. Тарабас¹, О. Мороз¹, С. Гнатуш¹, Г. Яворська¹, Г. Звір¹, М. Ковальчук²

¹Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна

²ТЗОВ “Інститут Гірхімпром” Академії гірничих наук України
вул. Стрийська, 98, Львів 79026, Україна
e-mail: otarabas@gmail.com

Досліджено хімічний склад води озера Яворівське восени 2016 р. на різних глибинах (0–70 м) та вивчено основні еколого-трофічні групи мікроорганізмів, які беруть участь у трансформуванні сполук карбону, нітрогену та сульфуру. Кислотність, мінералізація та вміст Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , HCO_3^- , Cl^- і NO_3^- на всіх глибинах озера, K^+ , P_2O_5 та NH_4^+ на глибинах до 20–50 м виявилися незначними і не перевищували гранично допустимих концентрацій (ГДК). На всіх глибинах вміст SO_4^{2-} (913–1530 мг/л) і на глибинах понад 30 м вміст H_2S (30–34 мг/л) значно перевищували ГДК. Встановлено, що зміна чисельності різних еколого-трофічних груп мікроорганізмів та їхнє співвідношення у воді озера, порівняно з водоймою джерельного типу заповідника Розточчя, є адаптивною відповіддю мікробного угруповання на несприятливі фактори довкілля. Загальна кількість усіх еколого-трофічних груп мікроорганізмів у воді озера Яворівське з глибиною зменшується від $5,24 \times 10^6$ до $2,45 \times 10^6$ КУО/мл води і є у 2–5 разів нижчою, ніж у контролі: $1,28 \times 10^7$ КУО/мл води. У озері Яворівське відбувається формування нового мікробоценозу, в якому на поверхні води і на глибині 30 м найбільш численними еколого-трофічними групами є нейтрофільні безбарвні сіркоокиснювальні бактерії (39,3 і 13,3 %), мікроорганізми, які використовують органічні форми нітрогену (21,6 і 42,9 %), нітрифікувальні (7,3 і 9,4 % I фази та 13,5 і 4,9 % II фази нітрифікації), денітрифікувальні (7,1 і 11,3 %), олігонітрофільні бактерії (4,4 і 5,1 %), мікроорганізми, що використовують мінеральні форми нітрогену (5,8 і 1,4 % відповідно), та фототрофні несіркові бактерії (4,9 % на глибині 30 м). Сульфат- і сірководновідновлювальні (42,9 і 44,9 %), фототрофні сіркові (2,7 і 4,5 %) і несіркові бактерії (4,4 і 3,7 % відповідно) є найбільш численними еколого-трофічними групами мікроорганізмів на глибинах 50 і 70 м озера. Кількість ацидофільних безбарвних сіркоокиснювальних бактерій, ціанобактерій, целюлозоруйнувальних мікроорганізмів і мікроскопічних грибів на усіх глибинах була незначною. У контролі найбільш численними еколого-трофічними групами є мікроорганізми, які використовують органічні форми нітрогену (28,3 %), олігонітрофільні (25,6 %), нітрифікувальні (23,5 % II фази і 15,7 % I фази нітрифікації), нейтрофільні безбарвні сіркоокиснювальні бактерії (3,0 %), мікроскопічні гриби (1,9 %). Їхня кількість, окрім нейтрофільних безбарвних сіркоокиснювальних бактерій, є значно вищою, ніж у воді озера Яворівське.

Ключові слова: еколого-трофічні групи мікроорганізмів, гідроген сульфід, озеро Яворівське

Яворівське державне гірничо-хімічне підприємство “Сірка”, площею 74 км², у 1993 р. припинило промислову діяльність. Відкритий спосіб видобутку сірчаної руди у 70-ті роки ХХ ст. спричинив утворення одного із найбільших у світі кар’єру площею 1080 га. З 1998 р. значна територія родовища, а власне центральний зумпф і прилеглі рукави кар’єру,

затоплювалися водою. У результаті утворилося озеро Яворівське, площею понад 700 га та глибиною понад 90 м [2, 3, 5].

Унаслідок видобутку сірки відкритим способом компоненти природного еволюційно сформованого біогеоценозу зруйнувалися. Утворився техногенний ландшафт, рекультивация якого супроводжувалася формуванням якісно нових біогеоценозів, зокрема, мікробоценозів. Їхні компоненти постійно вступають у тісну взаємодію між собою і з породою, винесеною на поверхню з недоступної раніше глибини. Формуються нові гідрогеологічні та гідрологічні умови, нові угруповання мікроорганізмів, яким немає аналогів у природі [2, 8, 22].

Мікроорганізми, завдяки великій поверхні контакту зі середовищем і ефективним процесам регулювання метаболізму, краще за інші живі організми адаптуються до впливу шкідливих чинників середовища, заселяючи водойми з несприятливими умовами. Вони активно трансформують різні речовини, забезпечуючи розвиток рослинних і тваринних організмів [20]. Зміни кількісного і функціонального складу мікробоценозів є комплексним сигналом екологічних змін [9, 10, 14, 16, 17]. Саме тому мікробіологічний контроль основних еколого-трофічних груп мікроорганізмів техногенно сформованого озера Яворівське, їхніх взаємозв'язків є надзвичайно актуальним.

Вивчення розвитку і життєдіяльності мікробіоти озера Яворівське здійснюється нами з 2001 р. з урахуванням вертикальної зональності хімічного складу води. Найбільша увага приділяється дослідженню розповсюдження у затопленому сірчаному кар'єрі, водоносний комплекс якого містить великі кількості розчиненого H_2S , бактерій циклу сульфору. Метаболічні процеси, які здійснюють ці мікроорганізми, є суттєвим фактором оцінки екологічного стану води трансформованого біоценозу [2, 5, 13]. Метою нашої роботи було дослідити хімічний склад води озера Яворівське на різних глибинах та основні еколого-трофічні групи мікроорганізмів, які беруть участь у кругообігу карбону, нітрогену та сульфору, для оцінки екологічного стану водойми, що допоможе науково обґрунтувати оптимальний комплекс заходів із її ремедіації.

Матеріали та методи

Відбір проб води з різних глибин озера (0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 м) проводили за допомогою батометра. Для здійснення фонових мікробіологічних моніторингу використали екосистему водойми джерельного типу заповідника Розточчя, яка не зазнала прямого антропогенного впливу. Контрольну пробу води відбирали з глибини 2 м придонного шару.

Концентрації Ca^{2+} та Mg^{2+} визначали титриметрично за реакцією з трилоном Б; Na^+ та K^+ аналізували за методом полум'яно-емісійної спектрометрії ($\lambda_K=768$ нм, $\lambda_{Na}=589$ нм; СФ Flahho-4 Carl Zeiss, Jena); H_2S+HS^- – спектрофотометрично за утворенням метиленої сині ($\lambda=665$ нм; СФ-46); рН води – потенціометрично (рН-метр 150 М). Концентрації HCO_3^- і Cl^- визначали титриметрично за реакціями з HCl (10 %) і $AgNO_3$ відповідно. Концентрацію SO_4^{2-} визначали турбідиметричним методом ($\lambda=520$ нм; КФК-301) за утворенням барій сульфату після осадження їх барій хлоридом. Концентрацію P_2O_5 визначали фотоколориметрично ($\lambda=440$ нм; КФК-301) за реакцією з амоній молібденовокислим, ванадій молібденовокислим і HNO_3 (1:2). Концентрацію NO_3^- визначали фотоколориметрично ($\lambda=400$ нм; КФК-301) після випарювання зі саліциловою кислотою та додавання розчину на основі натрій гідроксиду і сегнетової солі. Концентрацію NH_4^+ визначали колориметричним методом ($\lambda=400$ нм; КФК-301) за реакцією зі сегнетовою сіллю (50 %) та реактивом Несслера [6, 12, 23].

Мікроорганізми, які використовують органічні форми нітрогену (сапрофіти, у тому числі амоніфікатори), виявляли на м'ясо-пептонному агарі (МПА) та бульйоні (МПБ); мікроскопічні гриби, у тому числі дріжджі – на сусло-агарі (СА); олігонітрофіли – на середовищі Ешбі; актинобактерії – на середовищі Гінсбурга; мікроорганізми, які використовують мінеральні форми нітрогену, – на крохмально-аміачному агарі (КАА) та середовищі Чапека; нітрифікувальні бактерії (I і II фази нітрифікації) – на відповідних середовищах Виноградського; денітрифікувальні бактерії – на середовищах Гільтая і Баалсруда; целюлозоруйнівальні аеробні бактерії – на середовищі Гетченсона із фільтрувальним папером; фототрофні несіркові бактерії – на середовищі АТСС № 1449 (з або без $\text{Na}_2\text{S}\times 9\text{H}_2\text{O}$); ціанобактерії – на суміші Кнопа; сульфат- і сірководновлювальні бактерії – на середовищі Кравцова-Сорокіна зі сульфатами або елементарною сіркою відповідно; безбарвні сіркоокиснювальні бактерії: нейтрофільні – на середовищі Бейеринка, ацидофільні – на середовищі Ваксмана; фототрофні сіркові бактерії – на середовищі Ван Ніля; автохтонну мікробіоту – на агаризованій воді з озера (агар 2,5 %) [6].

Мікроорганізми вирощували у пробірках об'ємом 25 мл (зі середовищами МПБ, Виноградського, Гільтая, АТСС № 1449, Кнопа, Кравцова-Сорокіна чи ван Ніля) або на чашках Петрі (зі середовищами МПА, сусло-агар, Ешбі, Гінсбурга, КАА, Чапека, Баалсруда, Гетченсона, агаризованою водою з озера (на поверхні й у товщі агару), Бейеринка, Ваксмана) за температури 25–30 °С, упродовж 10–15 діб. Фототрофні (несіркові й сіркові) бактерії та ціанобактерії виділяли після культивування на світлі (інтенсивністю 40–300 лк, видима ділянка спектра (360–870 нм)), розвиток цих мікроорганізмів спостерігали за наявністю бурих, пурпурових, зелених або синьо-зелених пігментів [6].

Підрахунок кількості колонієутворювальних одиниць (КУО) мікроорганізмів у 1 мл води на щільних середовищах здійснювали безпосередньо на чашках, враховуючи розведення, у рідких середовищах – методом граничних розведень, враховуючи розведення, за таблицею Мак-Креді [6, 21].

Отримані результати опрацьовували статистично з використанням програми Microsoft Excel 2010. Досліди повторювали тричі з двома паралельними постановками для кожного варіанта експериментальних і контрольних умов. Для оцінки достовірності різниці між статистичними характеристиками двох альтернативних сукупностей даних обчислювали коефіцієнт Стьюдента *t*. Достовірною вважалася різниця при рівні значимості $p \leq 0,05$ [11].

Результати і їхнє обговорення

У воді озера Яворівське безперервно відбуваються складні взаємоперетворення органічних і мінеральних речовин, причому мікроорганізми забезпечують циклічність і збалансованість кругообігу основних хімічних елементів, енергетичний взаємозв'язок процесів, які відбуваються у різних екологічних зонах. Шари водної товщі відрізняються за фізико-хімічними властивостями, містять неоднакову кількість поживних речовин і є складною динамічною системою [15, 18]. Від фізико-хімічних властивостей води (температури, рН, мінералізації) залежить токсичність багатьох розчинених у ній неорганічних речовин, які згубно діють на мікроорганізми [1, 4].

Оскільки влітку та на початку осені кількість мікроорганізмів у водоймах є найвищою [1, 2, 5, 13], проводили хімічний аналіз проб води озера, відібраних восени 2016 р. з різних глибин (табл. 1). Кислотність води на всіх глибинах була слабколужною (рН від 6,6 до 7,8), що є в межах норми. Загальна твердість води або мінералізація, яка характеризується сумарним числом мг-еквівалентів йонів Ca^{2+} та Mg^{2+} у 1 л води, була невисокою: від 1404 на поверхні до 2678 мг-екв/л на дні, порівняно з гранично допустимою концентраці-

єю (ГДК) <7000, а отже, досліджувана вода за цим показником є придатною як середовище існування для живих організмів. Вміст йонів калію на усіх глибинах перевищував ГДК, зокрема, на глибинах понад 20 м – більш ніж удвічі. Концентрації йонів натрію, кальцію та магнію були на всіх глибинах незначними і не перевищували ГДК. Вміст HCO_3^- , Cl^- та NO_3^- теж виявився у межах норми, хоча кількість гідрокарбонатів на глибині 50 м і нижче була майже рівною або незначно вищою від ГДК. Концентрації P_2O_5 та NH_4^+ перевищували ГДК лише на глибинах понад 40–50 м. На відміну від інших сполук, ситуація з вмістом сульфатів і гідроген сульфід у воді озера виявилася критичною. На всіх глибинах концентрація SO_4^{2-} виявилася приблизно у 4–6 разів вищою, ніж ГДК, і коливалась у межах 913 на поверхні до 1530 мг/л на дні. Якщо з 2001 року по 2007 рік концентрація сульфатів у воді кар'єру (придонних шарах) зросла більш ніж удвічі: від 784 до 1725 мг/л [2, 13], то у 2016 р. їхній вміст незначно зменшився. Як і у попередні роки, гідроген сульфід до глибини 20 м не виявлено, але вже на глибинах 30 м і нижче його концентрація у 138–170 разів перевищувала ГДК. З роками вміст H_2S у придонних шарах поступово зменшився: від 121 мг/л у 2001 р. [2] і 47 мг/л у 2007 р. [13] до 30–34 мг/л у 2016 р. Оскільки гідроген сульфід є надзвичайно токсичним для живих організмів, він пригнічує у них дихальні процеси, пошкоджує структуру білків, нуклеїнових кислот та інших молекул [4, 24], його наявність за високих концентрацій у воді впливає на чисельність еколого-трофічних груп мікроорганізмів і функціонування мікробіоценозу озера загалом.

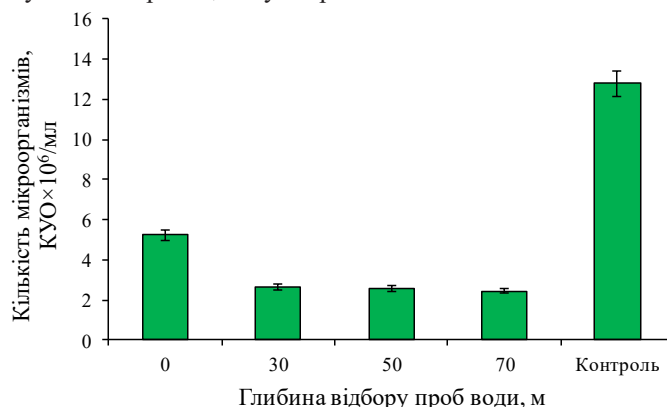


Рис. 1. Чисельність автохтонної мікробіоти у воді озера Яворівське, відібраній восени 2016 р. з різних глибин. Контроль – проба води, відібрана з придонного шару водойми джерельного типу заповідника Розточчя. * – $p < 0,05$

Через забруднення токсичними сполуками сульфуру, зменшення вмісту кисню, зниження температури та інші фізико-хімічні властивості загальна кількість усіх еколого-трофічних груп мікроорганізмів або автохтонної мікробіоти у воді озера Яворівське, відібраній в осінній період, з глибиною зменшувалася від $5,24 \times 10^6$ до $2,45 \times 10^6$ КУО/мл води і виявилася у 2–5 разів нижчою, ніж у воді, відібраній у цей же час із придонного шару водойми джерельного типу заповідника Розточчя: $1,28 \times 10^7$ КУО/мл води (рис. 1).

Аналіз чисельності еколого-трофічних груп мікроорганізмів води озера Яворівське та їхнього співвідношення показав, що найчисленнішою еколого-трофічною групою у поверхневому шарі води є аеробні нейтрофільні безбарвні сіркоокиснювальні бактерії (39,3 %), де їх титр становить $2,06 \times 10^6$ КУО/мл води (табл. 2, рис. 2). З глибиною кількість цих бактерій різко зменшувалася: від $3,54 \times 10^5$ КУО/мл води на глибині 30 м (13,3 %) до $2,63 \times 10^4$ КУО/мл води на глибині 70 м (1,1 %). Ацидофільні безбарвні сіркоокиснювальні

Таблиця 1

Хімічний аналіз води озера Яворівське (20 вересня 2016 р.)

Глибина, м	рН	мг/л												Мінералізація, мг-екв/л
		Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	HCO ₃ ⁻	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻	NO ₃ ⁻	P ₂ O ₅	NH ₄ ⁺	H ₂ S+HS ⁻		
0	6,8±0,2	29,7±0,3	6,2±0,3	270,5±3,3	19,4±0,5	139,1±1,7	24,5±1,2	913,3±6,1*	0,5±0,1	0,6±0,1	0,0±0,0	0,0±0,0	1403,8±3,1	
5	7,7±0,3	29,5±0,2	6,2±0,4	268,5±2,2	20,7±0,9	139,1±2,4	25,5±1,4	940,1±4,8*	1,3±0,1	0,6±0,1	0,0±0,0	0,0±0,0	1431,5±4,7	
10	7,8±0,2	29,8±1,5	7,2±0,7	272,5±1,4	20,7±0,7	141,6±2,8	25,5±1,6	983,3±3,2*	1,9±0,1	0,8±0,2	0,0±0,0	0,0±0,0	1483,3±3,8	
20	7,6±0,1	32,5±0,7	8,5±0,3*	274,5±3,7	25,5±0,5	151,3±1,6	24,1±1,2	992,9±3,0*	1,6±0,1	1,3±0,3	0,1±0,0	0,0±0,0	1512,3±6,2	
30	7,1±0,4	36,0±1,2	9,0±0,2*	280,6±3,5	51,0±0,4	170,8±1,8	24,6±2,0	1142,9±4,5*	0,7±0,2	2,4±0,2	2,0±0,1	27,5±0,4*	1747,5±7,1	
40	6,9±0,1	39,0±0,4	10,0±0,4*	276,6±2,5	60,8±1,2	195,3±1,9	26,6±1,5	929,6±3,4*	0,9±0,3	8,7±0,6*	2,9±0,2	30,2±0,5*	1580,6±8,7	
50	6,8±0,2	42,0±2,2	10,5±0,1*	268,5±1,7	105,7±2,3	261,2±2,4	26,7±1,7	1540,8±2,2*	1,8±0,4	15,4±0,5*	4,3±0,4*	27,5±0,3*	2304,4±5,3	
60	6,7±0,3	42,0±1,1	10,7±0,2*	280,6±2,3	100,9±1,9	244,1±2,6	25,5±1,3	1239,7±1,7*	1,3±0,4	25,6±0,5*	14,1±0,5*	34,0±0,4*	2018,5±6,5	
70	6,6±0,1	43,0±1,6	10,0±0,3*	420,8±1,5	109,4±1,5	395,4±3,4	34,5±2,4	1529,5±3,9*	2,5±0,5	69,1±0,8*	33,3±0,4*	30,2±0,2*	2677,7±4,3	
ГДК [4]	6,7-8,6	50,0	4,0	550,0	125,0	240,0	200,0	250,0	10,0	3,0	2,0	0,2	<7000	

Примітка: * – p<0,05

Таблиця 2

Чисельність еколого-профічних груп мікроорганізмів у воді озера Яворівське, відібраній восени 2016 р. з різних глибин

Екологопрофічні групи мікроорганізмів	Кількість мікроорганізмів, КУО/мл води			Контроль	
	Глибина відбору проб води, м				
	0	30	50		70
Мікроорганізми, які використовують органічні форми нітрогену	(1,13±0,02)×10 ^{6*}	(1,14±0,04)×10 ^{6*}	(4,16±0,04)×10 ^{3*}	(1,36±0,08)×10 ^{3*}	(3,61±0,51)×10 ⁶
Мікрокопічні гриби, у т.ч. дріжджі	(2,23±0,01)×10 ^{3*}	(2,22±0,02)×10 ^{3*}	(1,60±0,02)×10 ^{4*}	(1,68±0,02)×10 ^{3*}	(2,42±0,05)×10 ⁵
Олігонітрофіли	(2,31±0,10)×10 ^{5*}	(1,35±0,20)×10 ^{5*}	(3,20±0,10)×10 ^{3*}	(6,50±0,10)×10 ^{3*}	(3,26±0,51)×10 ⁶
Мікроорганізми, які використовують мінеральні форми нітрогену	(2,25±0,04)×10 ^{5*}	(2,72±0,05)×10 ^{4*}	(1,94±0,03)×10 ^{3*}	(1,33±0,01)×10 ^{2*}	(1,93±0,06)×10 ⁴
Загальна кількість	(3,06±0,08)×10 ^{5*}	(3,72±0,06)×10 ^{5*}	(3,80±0,11)×10 ^{3*}	(3,83±0,04)×10 ^{2*}	(8,33±0,14)×10 ⁴
Нітрифікувальні бактерії	(3,80±0,01)×10 ^{5*}	(2,50±0,02)×10 ^{5*}	(7,10±0,01)×10 ^{3*}	(7,00±0,01)×10 ^{3*}	(2,00±0,21)×10 ⁶
І фази нітрифікації	(7,10±0,02)×10 ^{5*}	(1,30±0,01)×10 ^{5*}	(1,30±0,01)×10 ^{4*}	(5,10±0,01)×10 ^{3*}	(3,00±0,05)×10 ⁶
ІІ фази нітрифікації	(3,72±0,20)×10 ^{5*}	(3,00±0,18)×10 ^{5*}	(4,75±0,09)×10 ^{3*}	(2,43±0,15)×10 ^{2*}	(6,50±0,12)×10 ⁴
Денітрифікувальні бактерії	(1,01±0,05)×10 ^{4*}	(7,63±0,05)×10 ^{3*}	(5,42±0,06)×10 ^{3*}	(3,55±0,06)×10 ^{3*}	(8,78±0,07)×10 ²
Целлозоруйні бактерії	(6,00±0,02)×10 ³	(1,31±0,03)×10 ^{3*}	(1,13±0,01)×10 ^{3*}	(9,00±0,02)×10 ^{4*}	(6,25±0,08)×10 ³
Фототрофні несіркові бактерії	(1,10±0,01)×10 ^{4*}	(3,00±0,01)×10 ^{4*}	0	0	(7,50±0,21)×10 ⁴
Ціанобактерії	(1,30±0,03)×10 ^{4*}	(7,00±0,02)×10 ^{4*}	(1,10±0,01)×10 ^{6*}	(1,10±0,01)×10 ^{6*}	(2,50±0,05)×10 ³
Сульфатвідновлювальні бактерії	(6,00±0,01)×10 ^{4*}	(7,00±0,01)×10 ^{4*}	(1,10±0,01)×10 ^{6*}	(1,10±0,01)×10 ^{6*}	(1,30±0,11)×10 ⁴
Сірководновлювальні бактерії	(2,06±0,08)×10 ^{6*}	(3,54±0,04)×10 ⁵	(3,09±0,07)×10 ^{4*}	(2,63±0,04)×10 ^{4*}	(3,83±0,27)×10 ⁵
Нейтрофільні бактерії	(2,25±0,07)×10 ⁴	(2,31±0,05)×10 ⁴	0	0	(1,45±0,32)×10 ⁴
Ацидофільні бактерії	(6,00±0,02)×10 ^{4*}	(1,30±0,01)×10 ^{4*}	(7,00±0,01)×10 ^{4*}	(1,10±0,01)×10 ^{6*}	(3,50±0,17)×10 ²

Примітки: * – p<0,05; контроль – проба води, відібрана з придонного шару водойми джерельного типу заповідника Розточчя

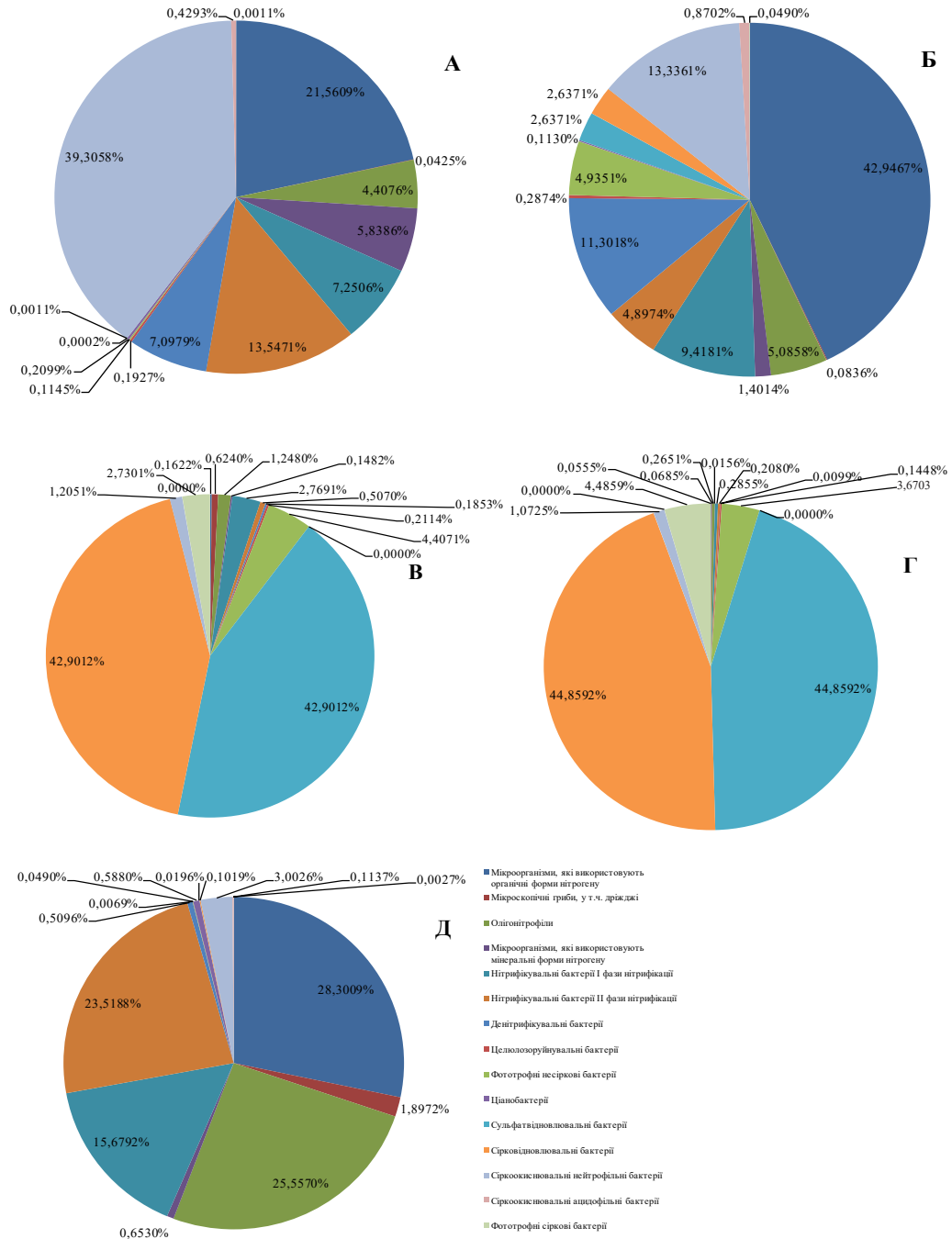


Рис. 2. Співвідношення еколого-трофічних груп мікроорганізмів у воді озера Яворівське, відібраній з різних глибин (м): 0 (А), 30 (Б), 50 (В), 70 (Г), та у воді, відібраній з придонного шару водойми джерельного типу заповідника Розточчя (Д)

бактерії були виявлені тільки на поверхні та глибині 30 м, де їхня кількість не перевищувала $2,31 \times 10^4$ КУО/мл води (0,9 %). Значна кількість цих бактерій на поверхні води свідчить про активні процеси окиснення відновлених сполук сульфуру, які вони здійснюють. Трансформація речовин, які містять сульфур, складається з двох принципово відмінних процесів: окиснення відновлених сполук сульфуру до сірки та сульфатної кислоти і відновлення окиснених сполук сульфуру до гідроген сульфід [7, 9, 19]. Окиснення сполук сульфуру з різним ступенем відновлення у природних умовах здійснюють безбарвні сіркоокиснювальні бактерії (роди *Achromatium*, *Beggiatoa*, *Hyphomicrobium*, *Macromonas*, *Sulfolobus*, *Thiobacillus*, *Thiodendron*, *Thiothrix*, *Thioploca*, *Thiobacterium*, *Thiospira*, *Thiovulum*, *Thermothrix*, *Thiomicrospira*, *Thiosphaera*, *Acidiphilium*) [19]. У роботі використано елективні середовища для нейтрофільних представників тіонових бактерій роду *Thiobacillus*, зокрема, *Thiobacillus thioeparus* (середовище Бейеринка), які відіграють важливу роль в утворенні епігенетичних місцезароджень сірки, і ацидофільних представників, зокрема, *Thiobacillus thiooxidans* (середовище Ваксмана), які окиснюють сірку й інші відновлені сполуки сульфуру. У водоймі джерельного типу заповідника Розточчя кількість нейтрофільних і ацидофільних безбарвних сіркоокиснювальних бактерій нижча, ніж у поверхневому шарі води озера Яворівське, і становить $3,83 \times 10^5$ і $1,45 \times 10^4$ КУО/мл води (3,0 і 0,1 %) відповідно.

Сульфат- і сірковідновлювальні бактерії (роди *Desulfotomaculum*, *Desulfovibrio*, *Desulfobacter*, *Desulfobulbus*, *Desulfonema*, *Desulfomonas*, *Desulfosarcina*, *Desulfuromonas*, *Desulfurella*, *Desulfuromusa*, *Geobacter*, *Pelobacter*, *Campylobacter*, *Wolinella*, *Sulfospirillum*, *Alteromonas*, *Shewanella*) переносять гідроген від органічних субстратів на сульфати чи елементну сірку з відновленням їх до гідроген сульфід, що є небезпечним забруднювачем довкілля [19]. Сульфат- і сіркоредакція – основний механізм утворення відновлених сполук сульфуру в усіх водоймах. За рахунок органічного сульфуру в донних відкладах утворюється не більше 10 % цих сполук. Утворений бактеріями гідроген сульфід зв'язується в зоні відновлених осадів йонами феруму, що є важливим біогеохімічним процесом його виведення з глобального кругообігу [9]. В місцях активної життєдіяльності сульфат- і сірковідновлювальних бактерій відбувається інтенсивне анаеробне окиснення органічної речовини та нагромадження біогенної вуглекислоти і її похідних – бікарбонатів і карбонатів [20]. Кількість сульфат- і сірковідновлювальних бактерій зі збільшенням глибини озера зростає від 13 і 60 КУО/мл води (0,0002 і 0,0011 %) у поверхневому шарі води до $1,10 \times 10^6$ КУО/мл води (44,9 %) на глибині 70 м відповідно, що свідчить про інтенсивні процеси утворення гідроген сульфід в глибинній зоні водойми (табл. 2, рис. 2). Оскільки ці бактерії, окрім окиснених сполук сульфуру, інтенсивно відновлюють окиснені сполуки нітрогену з утворенням NH_4^+ [19], це пояснює виявлення його значних кількостей (як і H_2S) на глибинах понад 40 м (табл. 1). Сульфат- і сірковідновлювальні бактерії є найбільш численними еколого-трофічними групами мікроорганізмів на глибинах 50 і 70 м озера Яворівське. У придонному шарі водойми джерельного типу заповідника Розточчя кількість цих бактерій не перевищує $2,50 \times 10^3$ і $1,30 \times 10^4$ КУО/мл води (0,0196 і 0,1019 %) відповідно і є значно нижчою, ніж у воді озера на глибинах 30–70 м.

Фототрофні пурпурові (роди *Allochro-matium*, *Amoebobacter*, *Chromatium*, *Halo-chromatium*, *Isochromatium*, *Lamprobacter*, *Lamprocystis*, *Marichromatium*, *Rhabdochromatium*, *Thermochromatium*, *Thioalkalicoccus*, *Thiobaca*, *Thiocapsa*, *Thiococcus*, *Thiocystis*, *Thiodictyon*, *Thioflavicoccus*, *Thiohalocapsa*, *Thiolampro-vum*, *Thiopedia*, *Thiorhodococcus*, *Thiorhodovibrio*, *Thiospirillum*) та зелені (*Ancalochloris*, *Chlorobium*, *Chloroherpeton*, *Pelodictyon*, *Prostecochloris*, *Chloroflexus*, *Chloronema*, *Heliiothrix*, *Oscillochloris*) сіркові бактерії в анаеробній зоні водойми використовують відновлені сполуки сульфуру і, в першу чергу, гідро-

ген сульфід як донори електронів у процесі аноксигенного фотосинтезу [19]. Пігментний склад фотосинтезувальних сіркобактерій дає їм змогу використовувати сонячне світло в широкому спектральному діапазоні та поширюватись у різних екологічних зонах водойм. Фототрофні сіркобактерії часто вступають у синтрофні взаємозв'язки зі сульфідогенними хемотрофними бактеріями [9, 15]. У поверхневому шарі води озера кількість фототрофних сіркобактерій виявилася незначною – 60 КУО/мл води (0,0011 %), але зі збільшенням глибини їхня чисельність зростає і була найбільшою на глибинах 50 і 70 м: $7,00 \times 10^4$ і $1,10 \times 10^5$ КУО/мл води (2,7 і 4,5 %) відповідно, що свідчить про інтенсивну окиснювальну трансформацію сполук сульфуру в цій зоні озера (табл. 2, рис. 2). У водоймі джерельного типу заповідника Розточчя кількість фототрофних сіркобактерій значно нижча, ніж у воді озера Яворівське на глибинах 30–70 м, і становить $3,50 \times 10^2$ КУО/мл води (0,0027 %).

Фототрофні несіркові бактерії (роди *Rhodobaca*, *Rhodobacter*, *Rhodovulum*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodoblastus*, *Blastochloris*, *Rhodomicrobium*, *Rhodobium*, *Rhodoplanes*, *Rhodocista*, *Rhodospirillum*, *Phaeospirillum*, *Rhodopila*, *Rhodospira*, *Rhodovibrio*, *Rhodothalassium*, *Roseospira*, *Roseospirillum*, *Ectothiorhodospira*, *Halorhodospira*, *Thiorhodospira*, *Ectothiorhodosinus*, *Rhodocyclus*, *Rhodoferax*, *Rubrivivax*, *Bradyrhizobium*) ростуть за умов освітлення, використовуючи H_2 , органічні сполуки, H_2S , $S_2O_3^{2-}$, SO_3^{2-} як донори електронів у процесі аноксигенного фотосинтезу [19]. У більшості випадків сульфід окиснюється лише до молекулярної сірки, яка (на відміну від фототрофних сіркобактерій) ніколи не відкладається у клітинах [9, 19]. У поверхневому шарі води озера Яворівське чисельність фототрофних несіркових бактерій не відрізнялася від контролю (табл. 2, рис. 2). На глибині 30 м їхня кількість виявилася найбільшою: $1,31 \times 10^5$ КУО/мл води (4,9 %), а на глибинах 50 і 70 м чисельність цих бактерій знижувалася до $1,13 \times 10^5$ і $9,00 \times 10^4$ КУО/мл води (4,4 і 3,7 %) відповідно, та все ж на глибинах 30–70 м була значно вищою, ніж у водоймі джерельного типу заповідника Розточчя: $6,25 \times 10^3$ КУО/мл води (0,049 %).

Широко розповсюджені у водоймах ціанобактерії (роди *Chamaesiphon*, *Chroococcus*, *Cyanothece*, *Gloeobacter*, *Gloeocapsa*, *Gloeothece*, *Microcystis*, *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Myxobaktron*, *Dermocarpella*, *Stanieria*, *Chroococcidiopsis*, *Myxosarcina*, *Pleurocapsa*, *Xenococcus*, *Arthrospira*, *Crinalium*, *Lyngbya*, *Microcoleus*, *Oscillatoria*, *Spirulina*, *Starria*, *Trichodesmium*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Nostoc*, *Nodularia*, *Rivularia*, *Scytonema*, *Tolythrix*, *Chlorogloeopsis*, *Geitleria*, *Stigonema*, *Fischerella*) можуть здійснювати кисневий і безкисневий фотосинтез з використанням як H_2O , так і інших екзогенних донорів електронів: H_2S , $Na_2S_2O_3$, H_2 , органічних сполук [19]. Деякі їхні представники (понад 100 видів) є вільноживучими азотофіксувальними мікроорганізмами. Завдяки процесам фотосинтезу ціанобактерії постачають гетеротрофним мікроорганізмам вуглеводи й інші енергетичні субстрати, а за рахунок азотофіксації нагромаджують у середовищі мінеральні форми нітрогену. Будучи численною складовою частиною планктону, ціанобактерії є важливою ланкою більшості харчових ланцюгів [9]. Якщо аноксигенні фототрофні бактерії виявляли на всіх глибинах озера, то ціанобактерії було виявлено лише до глибини 30 м, що пов'язано з їхніми потребами у кисні, вищій температурі й освітленні (табл. 2, рис. 2). У поверхневому шарі води озера Яворівське їхня чисельність була найбільшою і становила $1,10 \times 10^4$ КУО/мл води (0,21 %). У зв'язку зі значним забрудненням озера сполуками сульфуру, нітрогену, важких металів та іншими поллютантами на поверхні його води і на глибині 30 м чисельність ціанобактерій виявилася відповідно у 7 і 25 разів нижчою, ніж у контролі: $7,50 \times 10^4$ КУО/мл води (0,59 %), що, очевидно, є адаптивною відповіддю мікробного угруповання на їхній токсикогенний вплив пригніченням життєздатності чутливих видів і виживанням видів, метаболічно активних за даних стресових умов.

Трансформацію целюлози, найбільш поширеної карбоновмісної сполуки у природі, здійснюють різні мікроорганізми. Значна роль у цьому процесі належить бактеріям родів *Pseudomonas*, *Cytophaga*, *Sporocytophaga*, *Cellvibrio*, *Cellfalcicula*, *Vibrio*, *Polyangium*, *Sporangium*, *Archangium*, *Cellulomonas*, *Clostridium*, а також актинобактеріям *Micromonospora*, *Streptomyces*, *Streptosporangium*, *Actinomyces*, грибам *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fusarium* [10, 19]. У поверхневому шарі води озера Яворівське чисельність целюлозоруйнівальних мікроорганізмів виявилася найвищою, порівняно з іншими глибинами, і становила $1,01 \times 10^4$ КУО/мл води (0,19 %) (табл. 2, рис. 2). Кількість цих мікроорганізмів на всіх глибинах значно перевищувала їхню кількість у контролі ($8,78 \times 10^2$ КУО/мл води або 0,007 %), що є індикатором забруднення води озера, у першу чергу нітратами та сполуками карбону.

У природних екосистемах постійно відбуваються взаємно протилежні перетворення складних органічних речовин на мінеральні й навпаки, вирішальну роль у яких відіграють мікроорганізми. Вони утилізують органічні та неорганічні форми нітрогену, переводячи їх з однієї форми в іншу [7, 9]. Найбільш численною еколого-трофічною групою у поверхневому шарі води озера Яворівське після нейтрофільних безбарвних сіркоокиснювальних бактерій є мікроорганізми, які використовують органічні форми нітрогену або сапрофіти, у тому числі амоніфікувальні бактерії (які здійснюють мінералізацію нітрогеновмісних органічних сполук із виділенням аміаку), де їхня кількість становить $1,13 \times 10^6$ КУО/мл води (21,6 %) (табл. 2, рис. 2). Кількість сапрофітів у водоймі джерельного типу заповідника Розточчя перевищує кількість представників інших еколого-трофічних груп і є у 3 рази вищою, ніж у поверхневому шарі води озера Яворівське, та сягає $3,61 \times 10^6$ КУО/мл води (28,3 %). Мінералізацію органічних форм нітрогену в мінеральні форми: амонійні солі, солі нітритної та нітратної кислот, аміак, молекулярний азот забезпечують представники родів *Proteus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Mycobacterium*, актинобактерії, гриби родів *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* та ін. [19]. На глибині 30 м озера частка сапрофітів щодо інших еколого-трофічних груп є найбільшою і сягає 42,9 %, а на глибинах 50 і 70 м – різко зменшується до 0,16 і 0,06 % відповідно.

Мікроскопічних грибів (до яких належать представники родів *Alternaria*, *Fusarium*, *Chaetomium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Botrytis*, *Trichothecium*, *Candida*, *Ogataea*, *Rhodotorula* та ін. [19]) на глибинах 0, 30 і 70 м було виявлено $1,68\text{--}2,23 \times 10^3$ КУО/мл води (0,04–0,08 %), а на глибині 50 м їхня кількість була майже вдвічі вищою і сягала $1,60 \times 10^4$ КУО/мл води (0,62 %) (табл. 2, рис. 2). Але чисельність цих мікроорганізмів у водоймі джерельного типу заповідника Розточчя перевищувала їхню кількість, визначену у воді озера з усіх глибин, більш ніж у 15 разів і сягала $2,42 \times 10^5$ КУО/мл води (1,9 %).

Про активні процеси метаболізму сполук нітрогену свідчить наявність у воді озера великої кількості нітрифікувальних, денітрифікувальних та олігонітрофільних бактерій. Нітрифікувальні хемолітоавтотрофні бактерії у водному середовищі можуть окиснювати аміак, амонійні солі, гідроксиламін, нітрити й інші відновлені неорганічні сполуки нітрогену, причому нітробактерії (роди *Nitrosococcus*, *Nitrosolobus*, *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosovibrio* і ін.) окиснюють амоній до гідроксиламіну та нітритів, нітробактерії (роди *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospina*, *Nitrospira* і ін.) – нітрити до нітратів [7, 9, 15, 19]. Чисельність нітрифікувальних бактерій з глибиною озера зменшувалася, можливо, у зв'язку з їхньою чутливістю до низької концентрації кисню, що пригнічує розвиток цих бактерій [9, 19]. У воді озера, відібраній з різних глибин, кількість цих мікроорганізмів була значно меншою, ніж у воді, відібраній з водойми джерельного типу заповідника Розточчя (табл. 2, рис. 2). Найбільшу кількість нітрифікувальних бактерій I і II фази нітрифікації виявлено у поверхневому шарі води озера Яворівське і на глибині 30 м: $2,50\text{--}3,80 \times 10^5$ КУО/мл води

(7,25–9,42 %) і $1,30\text{--}7,10 \times 10^5$ КУО/мл води (4,9–13,6 %) відповідно, яка була у понад 5 і 4 рази нижчою, ніж у контролі: $2,00 \times 10^6$ і $3,00 \times 10^6$ КУО/мл води (15,7 і 23,5 %) відповідно, очевидно, у зв'язку з несприятливими для них умовами техногенно сформованого екотопу.

Денітрифікувальні бактерії (роди *Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Bacillus*, *Thiobacillus*) здійснюють зворотний до нітрифікації процес – відновлюють нітрати і нітрити (дією нітрат- і нітритредуктаз) до NO та N₂O або до молекулярного нітрогену чи аміаку і зв'язують потоки карбону й нітрогену в анаеробних зонах водойм, окиснюючи органічні сполуки до CO₂ і води [9, 19]. Утворення великих кількостей N₂O збільшує парниковий ефект, а оксиди нітрогену, що досягають стратосфери, сприяють виснаженню озонового шару [9, 15]. У роботі використано середовища Гільтая для хемоорганогетеротрофних денітрифікувальних бактерій та Баалсруда для хемолітоавтотрофних сіркоокиснювальних бактерій *Thiobacillus denitrificans*, які за анаеробних умов здійснюють анаеробне дихання з використанням нітратів, нітритів, N₂O як акцепторів електронів. Чисельність денітрифікувальних бактерій з глибиною озера зменшувалася (табл. 2, рис. 2). У воді, відібраній з поверхні та глибини 30 м, кількість цих мікроорганізмів ($3,00\text{--}3,72 \times 10^5$ КУО/мл води (7,1–11,3 %)) у 6 разів перевищувала чисельність мікроорганізмів у водоймі джерельного типу заповідника Розточчя: $6,50 \times 10^4$ КУО/мл води (0,51 %), що свідчить про значне забруднення поверхневих шарів води озера окисненими сполуками нітрогену і його евтрофікацію у цій зоні.

Наявність олігонітрофільних, у тому числі азотофіксувальних, бактерій (роди *Azotobacter*, *Azotomonas*, *Derxia*, *Beijerinckia*, *Clostridium*), у воді озера Яворівське є показником перебігу активного процесу азотофіксації у цій техногенно зміненій екосистемі [19]. Олігонітрофільні мікроорганізми завершують мінералізацію органічних речовин і здатні рости тільки за низької концентрації нітрогеновмісних сполук [7]. Для функціонування нітрогеназного комплексу, чутливого до вільного кисню та кількості зв'язаного нітрогену, бактеріям потрібні значні затрати енергії (легкодоступні органічні речовини) і низький окисно-відновний потенціал середовища. Найбільшу кількість олігонітрофільних бактерій виявлено у поверхневому шарі води озера Яворівське і на глибині 30 м: $2,31\text{--}1,35 \times 10^5$ КУО/мл води (4,4–5,1 %), яка з глибиною зменшувалася (табл. 2, рис. 2). Чисельність цих мікроорганізмів у озері була в 14 разів нижчою, ніж у контролі: $3,26 \times 10^6$ КУО/мл води (25,6 %), де олігонітрофільні бактерії є другою після сапрофітів найчисленнішою екологічною групою.

Мікроорганізми, які здійснюють окисно-відновну трансформацію мінеральних сполук нітрогену (роди *Bacillus*, *Micrococcus*, *Escherichia*, *Brevibacterium*, *Sarcina*, *Pseudomonas*, *Aspergillus*, актинобактерії *Streptomyces*, *Nocardia*, *Actinoplanes*, *Micromonospora*, *Streptosporangium*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Actinomadura*, *Rhodococcus*, *Thermoactinomyces*, *Dietzia*, *Salinispora*, *Marinophilus*, *Solwaraspora*, *Salinibacterium*), розщеплюють природні біополімери: крохмаль, целюлозу, пектин, хітин, органічні кислоти, залишки білків, гумусу, пестициди та ін., завдяки їхній здатності до синтезу амілолітичних ферментів [19]. Актинобактерії синтезують до 10 тис. промислово важливих вторинних метаболітів, зокрема, низку біологічно активних сполук і антибіотиків [9]. Загальна кількість мікроорганізмів, що використовують мінеральні форми нітрогену, у воді озера Яворівське з глибиною зменшувалася (табл. 2, рис. 2). У воді, відібраній з поверхні озера, кількість цих мікроорганізмів ($3,06 \times 10^5$ КУО/мл води (5,8 %)) була у 4 рази більшою, ніж у водоймі джерельного типу заповідника Розточчя: $8,33 \times 10^4$ КУО/мл води (0,65 %). У воді, відібраній з глибин 30–70 м, кількість цих мікроорганізмів була значно меншою, ніж у контролі, можливо, у зв'язку з недостатнім забезпеченням киснем і впливом інших фізико-хімічних умов середовища існування. Чисельність актинобактерій на глибині озера 30 м не відрізнялася

від контролю: $2,72 \times 10^4$ і $1,93 \times 10^4$ КУО/мл води відповідно, але також виявилася найвищою на його поверхні: $2,25 \times 10^5$ КУО/мл води (табл. 2).

Таким чином, вода озера Яворівське є придатною як середовище існування для живих організмів, хоча ситуація з вмістом сульфатів і гідроген сульфід у ній залишається критичною. Встановлено, що зміна чисельності різних еколого-трофічних груп мікроорганізмів та їхнє співвідношення у воді озера, забрудненій насамперед токсичними сполуками сульфуру, порівняно з їхньою чисельністю і співвідношенням у водоймі джерельного типу заповідника Розточчя, є адаптивною відповіддю мікробного угруповання на несприятливі фактори довкілля. Загальна чисельність мікроорганізмів усіх еколого-трофічних груп у воді озера Яворівське з глибиною зменшується від $5,24 \times 10^6$ до $2,45 \times 10^6$ КУО/мл води і є у 2–5 разів нижчою, ніж у контролі: $1,28 \times 10^7$ КУО/мл води. У озері Яворівське відбувається формування нового мікробоценозу, в якому на поверхні води і на глибині 30 м найбільш численними еколого-трофічними групами є нейтрофільні безбарвні сіркоокиснювальні бактерії, мікроорганізми, які використовують органічні форми нітрогену, нітрифікувальні, денітрифікувальні, олігонітрофільні бактерії, мікроорганізми, що використовують мінеральні форми нітрогену, та фототрофні несіркові бактерії. Сульфат- і сірководновлювальні, фототрофні сіркові та несіркові бактерії є найбільш численними еколого-трофічними групами мікроорганізмів на глибинах 50 і 70 м озера. Кількість ацидофільних безбарвних сіркоокиснювальних бактерій, ціанобактерій, целюлозоруйнувальних мікроорганізмів і мікроскопічних грибів на всіх глибинах була незначною, що дає підстави зробити припущення про звуження видової різноманітності мікробоценозу озера. У контролі найбільш численними еколого-трофічними групами є мікроорганізми, які використовують органічні форми нітрогену, олігонітрофільні, нітрифікувальні, нейтрофільні безбарвні сіркоокиснювальні бактерії, мікроскопічні гриби. Їхня кількість, окрім нейтрофільних безбарвних сіркоокиснювальних бактерій, є значно вищою, ніж у воді озера Яворівське. Різні еколого-трофічні групи мікроорганізмів займають окремі екологічні ніші, зумовлені фізіолого-біохімічними особливостями, типом взаємовідносин і фізико-хімічними умовами техногенно сформованого біотопу, на всіх глибинах якого активно відбувається трансформування сполук карбону, нітрогену та сульфуру. Тому рекультивация озера є неможливою без участі мікроорганізмів, які відіграють важливу роль у балансі речовин, що засвоюються організмами інших трофічних рівнів. Сіркоокиснювальне та сульфідогенне мікробне угруповання озера Яворівське може бути середовищем виділення нових штамів, цінних для біотехнологічного застосування.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Алматов Б. И., Нуралиев Н. А., Курбанова С. Ю. Посезонная динамика изменения микробного состава воды некоторых водохранилищ Узбекистана // Микробиол. журнал. 2016. Т. 78. № 2. С. 95–102.
2. Баран І. М., Подопрігора О. І., Грищук Г. В. та ін. Екологічний моніторинг водойм Яворівського сіркового родовища; мікробіологічний контроль // Довкілля та здоров'я. 2003. Вип. 27. № 4. С. 56–62.
3. Гайдін А. М., Зозуля І. І. Нові озера Львівщини. Львів: Афіша, 2009. 103 с.
4. Грушко Я. М. Вредные неорганические соединения в промышленных сточных водах. Л.: Химия, 1979. 161 с.
5. Гудзь С., Гнатуш С., Перетятко Т. та ін. Динаміка змін титру сульфатвідновлювальних бактерій та вмісту сульфатів і сірководню у водах кар'єру Яворівського сіркового родовища в процесі його затоплення // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2004. Вип. 37. С. 185–189.

6. Гудзь С. П., Гнатуш С. О., Яворська Г. В. та ін. Практикум з мікробіології: підручник. Львів: ЛНУ імені Івана Франка, 2014. 436 с.
7. Іутинська Г. О. Ґрунтова мікробіологія: навч. посіб. К.: Арістей, 2006. 284 с.
8. Колодяжний О. Ю., Пати́ка М. В. Формування мікробного комплексу чорнозему типового в агроценозі пшениці озимої за різних систем землеробства // Вісн. Полтав. держ. аграр. академії. 2014. Вип. 73. № 2. С. 26–33.
9. Козлова І. П., Радченко О. С., Степура Л. Г. та ін. Геохімічна діяльність мікроорганізмів та її прикладні аспекти. К.: Наукова думка, 2008. 526 с.
10. Курдиш І. К. Роль мікроорганізмів у відтворенні родючості ґрунтів // Сільськогосп. мікробіологія: міжвід. темат. наук. зб. Чернігів, 2009. Вип. 9. С. 7–32.
11. Лакин Г. Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
12. Лурье Ю. Ю. Аналитическая химия природных и сточных вод. М.: Химия, 1984. 312 с.
13. Мороз О. М., Колісник Я. І., Подопригора О. І. та ін. Мікрофлора води озера “Яворівське” // Наук. вісн. Ужгород. ун-ту. Сер. біол. 2008. Вип. 24. С. 131–138.
14. Патька Н. В., Колодяжний А. Ю., Ибатуллин И. И. Оценка метагенома и детекция функционально значимых полиморфизмов прокариот почвы с использованием метода пиросеквенирования // Мікробіол. журнал. 2016. Т. 78. № 2. С. 43–51.
15. Пати́ка В. П., Омелянець Т. Г., Гриник І. В., Петриченко В. Ф. Екологія мікроорганізмів: посібник / за ред. В.П. Пати́ки. К.: Основа, 2007. 192 с.
16. Пати́ка В. П., Симочко Л. Ю. Мікробіологічний моніторинг ґрунту природних та трансформованих екосистем Закарпаття України // Мікробіол. журнал. 2013. Т. 75. № 2. С. 21–31.
17. Пати́ка В. П., Тараненко С. В., Тараненко А. О., Калініченко А. В. Мікробний біом різних ґрунтів й ґрунтово-кліматичних зон Полтавської області // Мікробіол. журнал. 2014. Т. 76. № 5. С. 20–25.
18. Савилов Е. Д., Анганова Е. В. Микробиологический мониторинг водных экосистем // Гигиена и санитария. 2010. № 5. С. 56–58.
19. Современная микробиология. Прокариоты / ред. Й. Ленгелер, Г. Древис, Г. Шлегель; пер. с англ. М.: Мир, 2005. Т. 1. 654 с. Т. 2. 496 с.
20. Теплинская Н. Г. Микробная трансформация биогенных элементов в сапропелевых илах Каламитского залива Черного моря // Мікробіол. журнал. 2007. Т. 69. № 5. С. 15–20.
21. Теплер Е. З., Шильникова В. К., Переверзева Г. И. Практикум по микробиологии. М.: Дрофа, 2004. 256 с.
22. Узбек И. Х. Эколого-биологическая оценка эдафотопов техногенных ландшафтов степной зоны Украины: дис.... д-ра биол. наук. Днепропетровск, 2001. С. 164–229.
23. Harris D. C. Quantitative Chemical Analysis. 6-th ed. 2003. 928 p.
24. Hydrogen sulfide: human health aspects [Electronic resource]. World health organization. Geneva. 2003. Available from: <http://www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad53.htm>.

Стаття: надійшла до редакції 14.06.17

доопрацьована 29.09.17

прийнята до друку 06.10.17

**ECOLOGICAL TROPHIC GROUPS OF MICROORGANISMS
OF YAVORIVSKE LAKE WATER****O. Tarabas, O. Moroz, S. Hnatush, G. Yavorska, G. Zvir, M. Kovalchuk***¹Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine**²LLC "Institute Hirhimprom", Academy of Mining Sciences of Ukraine
98, Stryjska St., Lviv 79026, Ukraine
e-mail: otarabas@gmail.com*

The chemical composition of Yavorivske lake water in the autumn of 2016 at different depths (0–70 m) was investigated and the main ecological trophic groups of microorganisms, involved in transformation of carbon, nitrogen and sulfur compounds, were studied. Acidity, mineralization and Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , HCO_3^- , Cl^- and NO_3^- content at all depths, K^+ , P_2O_5 and NH_4^+ at depths up to 20–50 m were insignificant and did not exceed the permissible norms. At all depths the content of SO_4^{2-} (913–1530 mg/l) and H_2S (30–34 mg/l) at depths over 30 m significantly exceeded the norms. It was established that the change in the quantity of different ecological trophic groups of microorganisms and their ratio in the lake water, compared with the source type reservoir of Roztochya_reserve, is an adaptive response of the microbial community to stress environmental factors. The total quantity of all ecological trophic groups of microorganisms in water of Yavorivske lake with depth decreases from 5.24×10^6 to 2.45×10^6 CFU/ml of water and is 2–5 times lower than in the control: 1.28×10^7 CFU/ml of water. In Yavorivske lake is formed new microocenosis, in which on the surface and at depth of 30 m the most numerous ecological trophic groups are neutrophilic colorless sulfur oxidizing bacteria (39.3 and 13.3 %), microorganisms that use organic forms of nitrogen (21.6 and 42.9 %), nitrifying (7.3 and 9.4 % of phase I, 13.5 and 4.9 % of phase II of nitrification), denitrifying (7.1 and 11.3 %), oligonitrophilic bacteria (4.4 and 5.1 %), microorganisms that use mineral forms of nitrogen (5.8 and 1.4 % respectively) and phototrophic nonsulfur bacteria (4.9 % at depth of 30 m). Sulfate and sulfur reducing (42.9 and 44.9 %), phototropic sulfur (2.7 and 4.5 %) and nonsulfur bacteria (4.4 and 3.7 % respectively) are the most numerous ecological trophic groups of microorganisms at depths of 50 and 70 m of the lake. The quantity of acidophilic colorless sulfur oxidizing bacteria, cyanobacteria, cellulose degrading microorganisms and microscopic fungi at all depths was insignificant. In control the most numerous ecological trophic groups are microorganisms that use organic forms of nitrogen (28.3 %), oligonitrophilic (25.6 %), nitrifying (23.5 % of phase II and 15.7 % of phase I of nitrification), neutrophilic colorless sulfur oxidizing bacteria (3.0 %), microscopic fungi (1.9 %). Their number, besides neutrophilic colorless sulfur oxidizing bacteria, is much higher than in Yavorivske lake water.

Keywords: ecological trophic groups of microorganisms, hydrogen sulfide, Yavorivske lake

УДК 577.125:577.115:57.085:639.215.2:591.543.42

**ВМІСТ ЛІПІДІВ У БІЛИХ М'ЯЗАХ І ЗЯБРАХ КОРОПА
(*CYPRINUS CARPIO* L.) ЗА ГІПОКСИ-ГІПЕРКАПНІЧНОГО ВПЛИВУ**

С. Сисолятін

*Національний університет біоресурсів і природокористування України
вул. Героїв Оборони, 15, Київ 03041, Україна
e-mail: sergiy_sv@ukr.net*

У статті наведено результати дослідження методом висхідної одномірної тонкошарової хроматографії вмісту окремих класів ліпідів у білих м'язах і зябрах коропа за гіпокси-гіперкапнічного впливу за зниження температури середовища (штучний гіпобіоз). Встановлено зменшення вмісту загальних ліпідів і перерозподіл індивідуальних ліпідів у досліджуваних тканинах зі зростанням терміну експозиції. Зростання у тканинах рівня фосфоліпідів і холестеролу, основних структурних компонентів клітинних мембран, ймовірно, пов'язано з модифікацією структури мембран в умовах досліду. Виявлене зниження рівня триацилгліцеролів, а також підвищення кількості неестерифікованих жирних кислот і етерів холестеролу, можливо, спрямоване на забезпечення енергетичного потенціалу організму коропа за гіпокси-гіперкапнічного впливу. Відмічені відмінності для білих м'язів і зябер коропа вмісту окремих класів ліпідів за гіпокси-гіперкапнічного впливу може зумовлюватися їхніми фізіолого-біохімічними і функціональними особливостями. Отримані дані свідчать про залучення ліпідів в енергетичні й адаптаційні процеси за дії гіпобіотичних чинників.

Ключові слова: ліпіди, білі м'язи, зябра, короп, гіпоксія, гіперкапнія

Однією з центральних проблем біології є проблема адаптації до стрес-факторів навколишнього середовища (зниження температури, гіпоксія тощо) завдяки комплексу біохімічних механізмів, які беруть участь у розвитку компенсаторних реакцій організму [2, 13, 14]. У риб у ході еволюції виробились механізми пристосування до впливу стрес-факторів водного середовища на молекулярному, клітинному, біохімічному, фізіологічному, поведінковому та інших рівнях організації. Вивчення фундаментальних основ механізму розвитку стану оберненого пригнічення життєдіяльності організму внаслідок гіпокси-гіперкапнічного впливу за зниження температури, так званий штучний гіпобіоз [5, 11], викликає значний науковий і практичний інтерес.

Формування гіпобіотичного стану як у пойкилотермних, так і у гомойотермних тварин призводить до гіпометаболізму і супроводжується низкою адаптаційних пристосувань за участі ліпідів, що пов'язано з їхньою роллю у сигнальних системах клітин. Крім того, ліпіди, які є пластичним матеріалом клітинних мембран і основним енергетичним джерелом, відіграють провідну роль у функціонуванні та перебігу різноманітних процесів в організмі [1, 15].

Одна з відмінних особливостей метаболізму ліпідів риб полягає у значній амплітуді складу й інтенсивності накопичення ліпідів в організмі, що настають як у результаті ендогенних змін, так і під впливом умов зовнішнього середовища. Модифікація ліпідної складової є компенсаторним механізмом, що забезпечує функціональні можливості організму за різноманітних умов [3, 7, 9, 10]. Виходячи з цього, важливим є дослідження особливос-

тей ліпідного складу зябер як органа, що безпосередньо контактує з водним середовищем, та білих м'язів – як основного місця депонування ліпідів в організмі прісноводних риб.

Метою роботи було дослідити вміст ліпідів і співвідношення їхніх класів у білих м'язах і зябрах коропа української лускатої породи за гіпокси-гіперкапнічного впливу.

Матеріал та методи

Досліди проводили за використання коропа української лускатої породи (*Cyprinus carpio* L.) масою 250–270 г, якого отримували з Іванківського рибокомбінату Київської обл. Рибу відбирали в осінній період і протягом трьох днів утримували в басейні об'ємом 2000 дм³ для адаптації.

Для проведення досліджень було сформовано дві групи: перша – контрольна ($n=5$), риба перебувала в активному стані життєдіяльності, друга – дослідна ($n=5$, для кожного досліджуваного терміну), риба перебувала у стані штучного гіпобіозу (гіпокси-гіперкапнічний вплив за зниження температури середовища), як описано [5]. Після розтину риб першої (контроль) і другої (на 3-тю, 6-ту і 24-ту год експозиції) груп вилучали білі м'язи та зябра. Проводили гомогенізацію тканин і екстракцію ліпідів хлороформ-метаноловою сумішшю методом Фолча [12]. Кількість загальних ліпідів у тканинах визначали ваговим методом після відгонки екстрагуючої суміші [16].

Розділення ліпідів на окремі класи проводили методом висхідної одномірної тонкошарової хроматографії на пластинках розміром 15x15 см із нанесеним на них силікагелем марки «Silufol» (Чехія) [8]. Пластинки з підсушеними плямами ліпідів розташовували в герметично зачинені скляні хроматографічні камери, в яких містилася рухома фаза такого складу: гексан – діетиловий етер – оцтова кислота (90:10:1, об./об.). Після проходження розчинника пластинку підсушували та піддавали дії проявника. Проявник – пари кристалічного йоду, які забарвлювали ліпіди в коричневий колір.

Проявлені плями були ідентифіковані при визначенні R_f [4] і шляхом порівняння з відомими маркерами ліпідів (для фосфоліпідів – *фосфатидилхолін*; для триацилгліцеролів – *трипальмітилгліцерол*; для неестерифікованих жирних кислот – *стеаринова або пальмітинова кислота*; для неестерифікованого холестеролу – *холестерол*, а для естерифікованого холестеролу – *холестерилвалеріанат*) фірм «Reanal» (Угорщина) та «Sigma-Aldrich» (Німеччина). Кількісне визначення загальних фосфоліпідів і триацилгліцеролів проводили за використання гідроксаматного методу; холестеролу та його етерів – колориметричного методу з хлорним залізом; неестерифікованих жирних кислот – колориметричного методу з 1,5-дифенілкарбазидом [6].

Отримані результати обробляли методом варіаційної статистики з використанням t -критерію Стьюдента, з використанням пакетів комп'ютерних програм MS Excel 2016.

Результати і їхнє обговорення

У результаті проведених досліджень встановлено, що вміст загальних ліпідів (ЗЛ) у дослідних тканинах коропа зменшується за гіпокси-гіперкапнічного впливу порівняно зі станом активної життєдіяльності.

Зокрема, на 24-ту год експозиції штучного гіпобіозу вміст ЗЛ у білих м'язах коропа знижується на 6,9 % ($P<0,05$), а у зябрах – на 4,8 % ($P<0,05$), порівняно зі станом активної життєдіяльності (див. таблицю).

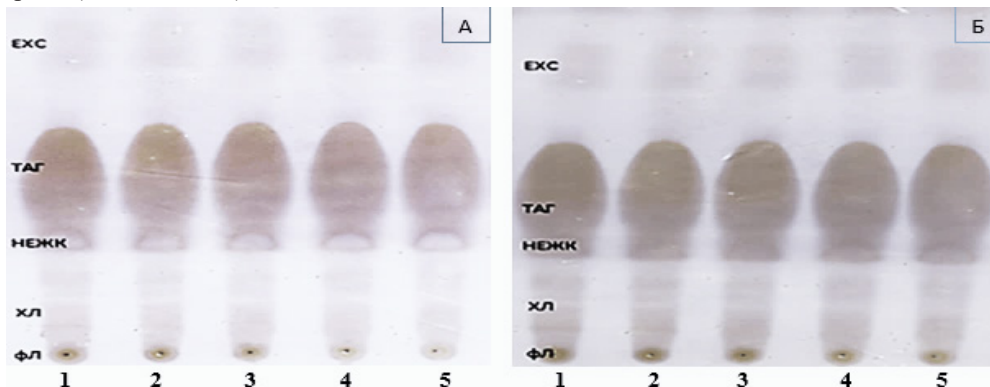
У результаті проведення висхідної одномірної тонкошарової хроматографії загальних ліпідів білих м'язів і зябер коропа виявлено такі ліпіди: триацилгліцероли (ТАГ), неестерифіковані жирні кислоти (НЕЖК), фосфоліпіди (ФЛ), холестерол (ХС) і естерифікований холестерол (ЕХС).

Загальний вміст ліпідів і співвідношення окремих їхніх класів у білих м'язах і зябрах коропа за гіпокси-гіперкапічного впливу, мг/г сирової тканини, (M±m; n=5)

Класи ліпідів	Контроль	Дослід, год експозиції		
		3 год експозиції	6 год експозиції	24 год експозиції
Білі м'язи				
Загальні ліпіди	86,00±2,51	84,60±2,34	83,90±1,21	80,10±2,05*
Триацилгліцероли	12,20±0,79	8,30±0,46*	5,40±0,42*	1,90±0,67*
НЕЖК	10,80±0,46	11,60±0,49	12,30±0,29	13,10±0,50*
Фосфоліпіди	60,20±0,63	61,00±0,67	61,90±0,59	63,30±0,34*
Холестерол	2,00±0,25	2,50±0,13	2,80±0,13*	3,20±0,29*
Етери холестеролу	0,80±0,13	1,20±0,12*	1,50±0,13*	1,80±0,17*
Зябра				
Загальні ліпіди	108,00±0,92	106,80±0,75	105,50±1,25	102,80±1,02*
Триацилгліцероли	17,60±2,09	14,00±2,65*	10,20±1,29*	5,40±1,38*
НЕЖК	11,10±1,13	12,40±0,92	13,10±1,13*	13,70±1,04*
Фосфоліпіди	74,80±3,51	75,20±0,13	76,40±0,22	77,10±0,13
Холестерол	1,50±0,25	1,80±0,29	2,10±0,29*	2,60±0,33*
Етери холестеролу	3,00±0,38	3,40±0,18*	3,70±0,29*	4,00±0,33*

Примітки: НЕЖК – нестерифіковані жирні кислоти; * – P<0,05 щодо контрольної групи

Отримані результати свідчать, що склад ліпідів м'язів і зябер риб у стані активної життєдіяльності та в умовах гіпокси-гіперкапічного впливу (на 3-тню, 6-ту та 24-ту год експозиції) однаковий і складається з полярних та неполярних ліпідних компонентів (див. рисунок). Однак зі зростанням терміну експозиції гіпокси-гіперкапічного впливу спостерігаються зміни кількісного вмісту індивідуальних ліпідів у білих м'язах і зябрах коропа (див. таблицю).



Хроматографічне розділення загальних ліпідів білих м'язів (А) та зябер (Б) коропа: фосфоліпіди (ФЛ), холестерол (ХЛ), нестерифіковані жирні кислоти (НЕЖК), триацилгліцероли (ТАГ) та етерифікований холестерол (ЕХС); 1 – стандартна суміш індивідуальних ліпідів, 2 – контрольна група, 3–5 – дослідні групи (3, 6 та 24 год експозиції штучного гіпобіозу). Типові тонкошарові хроматограми

Встановлено, що за всіх термінів експозиції гіпокси-гіперкапічного впливу в білих м'язах і зябрах коропа спостерігаються особливості змін кількісного вмісту полярних та неполярних ліпідів. Зокрема, на 24-ту год експозиції в білих м'язах і зябрах коропа вміст ХС збільшується в 1,6 разу (P<0,05), у зябрах – 1,7 разу (P<0,05), а вміст ЕХС (основної запасної форми ХС) збільшується у 2,3 разу (P<0,05) та 1,3 разу (P<0,05) відповідно, порівняно зі станом активної життєдіяльності. За гіпокси-гіперкапічного впливу кількісний вміст ФЛ у білих м'язах зростає на 5,2 % (P<0,05), а в зябрах – недостовірно порівняно з коропом

у стані активної життєдіяльності (див. таблицю). Виходячи з того, що основні структурні компоненти клітинних мембран – ФЛ та ХС [3, 7, 10], зростання у дослідних тканинах вмісту ХС, який упорядковує гідрофобну частину мембран, можливо, супроводжується зменшенням плинності мембран і пов'язано з адаптаційними процесами.

Водночас, на 24-ту год експозиції гіпокси-гіперкапічного впливу рівень ТАГ зменшується на 84,4 % ($P < 0,05$) та 69,3 % ($P < 0,05$), а вміст НЕЖК збільшується на 23,4 % ($P < 0,05$) та 21,3 % ($P < 0,05$) в білих м'язах і зябрах коропа відповідно, порівняно зі станом активної життєдіяльності (див. таблицю). Відомо, що ТАГ найбільш варіабельні щодо екзогенного впливу та піддаються гідролізу з утворенням жирних кислот [9].

Результати дослідження свідчать про збільшення швидкості ліполізу, можливо, для забезпечення енергетичного потенціалу організму коропа [15] за гіпокси-гіперкапічного впливу за зниження температури тіла.

Порівняльний аналіз змін вмісту індивідуальних ліпідів у досліджуваних тканинах за гіпокси-гіперкапічного впливу вказує на відмінності, що може зумовлюватись їхніми фізіолого-біохімічними і функціональними особливостями за розвитку адаптаційних можливостей, які спрямовані на підтримання енергетичного гомеостазу. *Отримані дані узгоджуються* з результатами впливу абіотичних і біотичних чинників довкілля на вміст ліпідів у тканинах і органах тварин [3, 7, 9, 15].

Результати досліджень свідчать, що в білих м'язах і зябрах коропа української лускатої породи за дії гіпокси-гіперкапічного середовища спостерігаються зміни вмісту й характер перерозподілу індивідуальних ліпідів, який свідчить про залучення їх в енергетичні й адаптаційні процеси.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Веланский П. В., Костецкий Э. Я. Липиды морских холодноводных рыб // Биология моря. 2008. Т. 34. № 1. С. 53–57.
2. Гулевский А. К., Щенявский И. И., Релина Л. И. и др. Холодовая адаптация пойкилотермных и гетеротермных животных // Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины. Х., 2012. С. 127–164.
3. Коломийцева И. К. Липиды в гибернации и искусственном гипобриозе млекопитающих (обзор) // Биохимия. 2011. Т. 76. № 12. С. 1604–1614.
4. Куліков А. Ю. Тонкошарова хроматографія: теоретичні основи та практичне використання: навч-метод. посіб. Х.: ХНУ імені В.Н. Каразіна. 2011. 260 с.
5. Мельничук С. Д., Мельничук Д. О. Гіпобриоз тварин: молекулярні механізми та практичне значення для сільського господарства і медицини: монографія. К.: Вид. центр НАУ, 2007. 220 с.
6. Петровский В. И., Регеранд Т. И., Лизенко Е. И. Экстракция, разделение и количественное определение липидных фракций сыворотки крови // Лаб. дело. 1986. № 6. С. 339–343.
7. Попова Е. М., Коцкій І. В. Ліпіди як компонент адаптації риб до екологічного стресу // Рибогосподарська наука України. 2007. № 1. С. 49–56.
8. Рівіс Й. Ф., Федорук Р. С. Кількісні хроматографічні методи визначення ліпідів і жирних кислот у біологічному матеріалі: метод. посіб. Львів: СПОЛОМ, 2010. 109 с.
9. Сисолятин С. В. Ліпідний склад тканин лускатої коропа (*Cyprinus carpio* L.) за умов штучного вуглекислотного гіпобриозу // Рибогосподарська наука України. 2016. № 3(37). С. 111–122.

10. Смирнов Л. П., Богдан В. В. Липиды в физиолого-биохимических адаптациях экотермных организмов к абиотическим и биотическим факторам среды. М.: Наука, 2007. 181 с.
11. Тимофеев Н. Н. Гипобиоз и криобиоз. Прошлое, настоящее, будущее. М.: Информ-Знание, 2005. 256 с.
12. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues // J. Biol. Chem. 1957. Vol. 226. P. 497–509.
13. Guschina L. A., Harwood J. L. Mechanisms of temperature adaptation in poikilotherms // FEBS Lett. 2006. Vol. 580. N 23. P. 5477–5483.
14. Hochacka P. W., Somero G. N. Biochemical adaptation mechanism and process in physiological evolution // New York, London, Oxford University Press US. 2002. 466 p.
15. Hong H., Zhou Y., Wu H. et al. Lipid content and fatty acid profile of muscle, brain and eyes of seven fresh water fish: a comparative study // J. Am. Oil Chem. Soc. 2014. Vol. 91, N. 5. P. 795–804.
16. Kates M. Techniques of Lipidology: Analysis, isolation and Identification of Lipids. American Elsevier Pub. Co., Inc., New York, N.Y. 1986. P. 163–164.

Стаття: надійшла до редакції 28.04.17

доопрацьована 06.09.17

прийнята до друку 19.09.17

CONTENT OF LIPIDS IN WHITE MUSCLES AND GILLS OF CARP (*CYPRINUS CARPIO* L.) FOR HYPOXIA AND HYPERCAPNIC

S. Sysolyatin

*National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine
15, Heroyiv Oborony St., Kyiv 03041, Ukraine
e-mail: sergiy_sv@ukr.net*

In the article it is presented the results of the research of the content of certain classes of lipids in white muscles and gills of carp with the ascending TLC method by hypoxia and hypercapnic influence at lower temperature of the environment (artificial hibernation). It is established the decrease of total lipids and redistribution of individual lipids in the studied tissues with the increasing of exposure duration. The increase of phospholipids and cholesterol in tissue levels, the main structural component of cell membranes, is probably connected with the modification of the structure of the membrane in the conditions of experience. It is observed that the decrease of triacylglycerols and increase of the number of nonetherified esters of fatty acids and cholesterol are probably aimed at ensuring of the energy potential of the carp for hypoxia and hypercapnic. The differences in white muscles and gills of carp with content of certain classes of lipids for hypoxia and hypercapnic influence can be determined with their physiological and biochemical and functional features. The obtained data indicate about the involvement of lipids into energy and adaptation processes with the actions of the hibernation factors.

Keywords: lipids, white muscles, gills, carp, hypoxia, hypercapnia

ФАКТОР VIII ЗСІДАННЯ КРОВІ: БУДОВА МОЛЕКУЛИ ТА ЗАСТОСУВАННЯ

Н. Шурко*, Т. Даниш, В. Новак

*ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України»
вул. Генерала Чупринки, 45, Львів 79044, Україна
e-mail: natalia_shurko@ukr.net*

У статті зроблено огляд наукових публікацій, присвячених дослідженню будови, функції та біологічної ролі фактора VIII. Фактор VIII зсідання крові людини (антигемофільний фактор А) є ключовим компонентом системи гемостазу. Роль фактора VIII полягає у підвищенні каталітичної ефективності фактора IXа у процесі активації фактора X. Ген фактора локалізований на довгому плечі X-хромосоми розміром 186 тисяч пар нуклеотидів, що складається з 26 екзонів, розділених 25 інтронами. Фактор VIII є глікопротеїном з 2332 амінокислотних залишків і має доменну структуру конформації: A1-A2-B-A3-C1-C2. У результаті посттрансляційної модифікації (furin протеази) та під дією протеолітичних ферментів плазми крові цей білок розщеплюється на два ланцюги: важкий 200 кДа (A1-A2-B) і легкий 80 кДа (A3-C1-C2). У плазмі крові людини фактор VIII представлений кількома формами з молекулярними масами 170–280 кДа та наявний у концентрації 0,1–0,2 мкг/мл. Практично весь фактор у кров'яному руслі є в комплексі з фактором фон Віллебранда, який стабілізує його у кровотоці та є ключовим регулятором активності, оскільки, з одного боку, сприяє його активації тромбіном, а з іншого – запобігає розщепленню молекули фактора протеїназами. Дефіцит фактора VIII, кількісний або якісний, призводить до порушення системи зсідання крові та розвитку захворювання, відомого як гемофілія А, з частотою виникнення 1 на 5000 новонароджених. З метою корекції дефіциту фактора або запобігання кровотеч у пацієнтів з гемофілією А проводять замісну терапію, яка полягає у введенні плазмових або рекомбінантних препаратів фактора VIII. Для лікування гемофілії А в Україні використовують зареєстровані препарати факторів зсідання крові як плазмового, так і рекомбінантного походження.

Ключові слова: фактор VIII зсідання крові, мутація, гемофілія А, препарати фактора

Фактор VIII (FVIII) зсідання крові – глікопротеїн плазми, неферментативний кофактор активного фактора IX (FIXa), який при протеолітичній активації утворює з FIXa нековалентний комплекс на поверхні фосфоліпідної мембрани, що активує фактор X (FX) [21]. Цей потрійний комплекс факторів зсідання на поверхні фосфоліпідної мембрани називають «X-аза» або «теназа» [4]. Після активації FXa вивільняється з комплексу та запускає реакцію перетворення протромбіну (FII) на тромбін (FIIa), який ініціює перетворення розчинного білка плазми фібриногену на нерозчинний фібрин. Унікальна властивість теназного комплексу полягає в надзвичайно великому ступені підвищення каталітичної активності (на п'ять порядків) FIXa, що обумовлена конформаційними змінами молекули FIXa при зв'язуванні з FVIIIa [3].

Біохімічна характеристика фактора зсідання VIII

Синтез молекули FVIII є тканиноспецифічним. Найвищий рівень мРНК і, відповідно, білка FVIII виявлено в клітинах ендотеліальної вистилки синусоїдних капілярів печінки, значна кількість є в гепатоцитах і клітинах Купфера (резидентні макрофаги вистилки

синусоїдів) [15]. Відомо, що синтез фактора відбувається також у нирках, ендотеліальних клітинах і лімфатичній тканині [21], селезінці та плаценті [2].

Ген FVIII людини локалізований на довгому плечі X-хромосоми (хромосомна локалізація Xq28) [1], займає ділянку завдовжки приблизно 186 тисяч пар нуклеотидів (тпн) і складається з 26 екзонів розміром від 69 до 3106 пар нуклеотидів (пн), розділених 25 інтронами розміром від 207 пн до 32,4 тпн [3]. Загальна довжина кодуючої послідовності цього гена дорівнює 9 тпн. Повний ген становить близько 0,1 % від усієї довжини X-хромосоми [10].

У літературі наведено небагато даних про ініціацію транскрипції гена FVIII. З основних елементів, що регулюють експресію, виявлено проксимальний ТАТА-бокс, який скеровує РНК-полімеразу до сайту ініціації мРНК, але не виявлено СААТ-бокс, який контролює частоту ініціації транскрипції. Охарактеризовано 12 білокзв'язуючих сайтів у промоторі гена FVIII. Один із них має спорідненість до ядерного фактора NF- Υ , а інший, відповідальний за транскрипцію сайт 1, – до ядерного фактора гепатоцитів HNF-1 [4].

Особливістю гена FVIII є наявність двох додаткових генів F8A і F8B в інтроні 22 (IVS22). F8A транскрибується в протилежному напрямку щодо гена FVIII. Є дві додаткові копії гена F8A, які розміщені ззовні в 400 тпн у напрямку теломери. Функції генів F8A і F8bB на теперішній час невідомі [21].

Протеїн FVIII синтезується у вигляді одного поліпептидного ланцюга з молекулярною масою приблизно 280–330 кДа та містить 2332 амінокислотних залишки (акз), яким передують 19 акз гідрофобного сигнального пептиду [21, 31]. У лідерний пептид входить ядро з 10-ти гідрофобних амінокислотних залишків, оточених радикалами, які несуть електростатичний заряд, утворюючи структуру як у більшості секреторних білків [2]. FVIII має доменну структуру конформації [3, 8, 17, 33]. У ньому виділяють: домен-А, який повторюється тричі, центральний В-домен і два С-домени. На границях А-доменів розміщені три кислі субдомени (містять в основному кислі амінокислоти), які позначають як a1-a3 (A1(a1)-A2(a2)-B-(a3)A3-C1-C2) і які відіграють важливу роль при взаємодії FVIII з іншими білками. У крові людини під дією протеолітичних процесів (фурипротеази) цей білок розщеплюється на два ланцюги: важкий 200 кДа (A1-A2-B) та легкий 80 кДа (A3-C1-C2). Ланцюги з'єднані один з одним за допомогою ковалентного зв'язку. Домени А FVIII на 30 % гомологічні один одному (A1 – 336, A2 – 337 та A3 – 329 акз відповідно), А доменам фактора V (FV) та мідь-зв'язуючому білку людини – церулоплазміну [18]. Домени A1 і A3 містять по одному атому купруму. У літературі зазначено, що саме взаємодія поліпептидного ланцюга FVIII з іонами металів відповідає за його структурну цілісність і кофакторну функцію [35].

Ділянка 558-565 домену A2 відповідає за зв'язування з FIXа та його конформаційну перебудову в складі тенази [22, 25]. Сайт зв'язування FX розташований у кінці домену A1 (від 337 до 372 акз). Залишок Arg336 домену A1 та Arg562 домену A2 є сайтами зв'язування для активованого протеїну С (APC) [10, 26].

Роль центрального В-домену FVIII не з'ясована до кінця. Він частково відщеплюється від молекули «зрілого» білка. На В-домен припадає приблизно 40 % амінокислотної послідовності (983 акз). Він містить 25 потенційних місць для N-глікозилювання, 16–19 з яких фактично мають N-зв'язуючі олігосахариди при значному рівні мікрогетерогенності [4]. Виходячи зі значної гомології факторів VIII та V, висувається припущення про еволюційне походження гена FVIII у результаті процесу дуплікації. При цьому відзначено, що функціональні домени А і С цих білків консервативні, а подібність доменів В обмежена високим ступенем глікозилювання, що свідчить на користь функціональної значущості високої щільності олігосахаридних груп у домені В FVIII [3, 4].

Домені С1 (153 акз) та С2 (160 акз), що входять до складу легкого ланцюга «зрілої» молекули FVIII, гомологічні доменам С1 та С2 FV [20], С-кінцевим доменам білка MFGE8 (milk fat globule EGF factor 8, lactadherin) [35] та фрагментові дискоїдину I [4]. Основою третинної структури С2-домену є конформація β -сендвіч, яка утворює внутрішню структуру домену, β -шпильки та петлі, які формують гідروفобну поверхню молекули. На верхній частині першої β -шпильки розташовані амінокислоти Met2199 і Phe2200, що відповідають за зв'язування FVIII з фосфоліпідами. С2-домен містить також сайти зв'язування тромбіну та FXa. «Зрілий» FVIII у плазмі крові людини представлений серією форм із молекулярними масами 170–280 кДа, що зумовлено процесами активації/інактивації молекули FVIII, та перебуває в концентрації порядку 0,1–0,2 мкг/мл [1].

Для відновлення прокоагулянтної активності FVIII при дисоціації-ресоціації ланцюгів необхідні як іони купруму, так й іони кальцію та марганцю. При цьому відзначено, що іони кальцію та марганцю не впливають на димеризацію ланцюгів, але сприяють утворенню активної конформації у відновленій молекулі FVIII [35], зв'язуючись зі сайтами, розміщеними на обох ланцюгах білка [11]. До складу FVIII входить 19 цистеїнових залишків, 16 із яких утворюють дисульфідні зв'язки з двовалентними іонами металів [1].

Взаємодія фактора VIII з фактором фон Віллебранда

Практично весь FVIII у плазмі крові людини входить до складу нековалентного комплексу з шапероном – фактором фон Віллебранда (vWF) та може дисоціювати при високій іонній силі. Період півжиття FVIII в цьому комплексі становить 10–12 год, а в дисоційованому вигляді – 2,5 год. Константа зв'язування становить $5,9 \pm 1,9 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ [2].

Основним регулятором активності FVIII виступає vWF, а саме: дає можливість тромбіну активувати зв'язаний у комплексі FVIII [29], запобігає розщепленню протеазами FXa [12] і APC [13, 27]. Зазначено, що vWF запобігає неспецифічному зв'язуванню FVIII з мембранами клітин ендотелію судин і тромбоцитів [37].

vWF приєднується до N-кінцевої ділянки легкого ланцюга, де розташовані два сульфатованих залишки тирозину (Tyr1664 та Tyr1668) і кислий фрагмент 1649-1689 (ділянка a2). Ця ділянка не лише задіяна у зв'язуванні, але й впливає на С2-домен, надаючи йому спорідненості до vWF. Саме тому синтез дисфункціональної молекули FVIII, у якій Tyr1680 замінено на фенілаланін (Phe), веде до розвитку клінічної картини «м'якої» (легкої) форми гемофілії через порушення стабільності комплексоутворення [2].

Активация/інактивація фактора VIII зсідання крові

Активация FVIII при ініціації процесу зсідання крові здійснюється тромбіном (FII) чи FXa (рис. 1) та полягає у протеолітичних розривах в певних місцях білкової молекули [1, 2, 4]. Відмічено, що на першому етапі активації FII гідролізовані пептидні зв'язки в положеннях Arg372 (A1-A2 зв'язування доменів), Arg740 (A2-B зв'язування доменів) та Arg1689 (B-A3 домен зв'язування) [4]. У результаті цього відщеплюється домен В, важкий ланцюг розділяється на незв'язані ковалентні домени та відокремлюється коротка кисла область a3 перед доменом А3 [24].

Активация FVIII FXa відбувається за аналогічною схемою розриву цих пептидних зв'язків і двох додаткових у положенні Arg1721 і Arg336 [28], причому зауважено, що взаємодія FVIII з тромбіном опосередкована через сульфатування залишків тирозину в молекулі FVIII, тоді як активация FXa практично нечутлива до замін у сайтах сульфатування [26].

Одним із суттєвих етапів активації FVIII є його вивільнення з комплексу FVIII/vWF. Це відбувається під дією тромбіну після виділення кислого фрагмента a3, який прилягає з

N-кінця Arg1689 домену A3. FVIIIa – це гетеротример, до складу якого входить A1-домен (1-372 акз), A2 (373-740 акз) та зв’язаний A3-C1-C2 домени (1690-2332 акз) [1]. Зв’язування субодиниці A2 з іншими в четвертинній структурі білка, очевидно, має електростатичний характер, бо руйнується навіть за низької концентрації NaCl і підвищенні рН з 6,0 до 7,0, тобто при фізіологічному значенні рН. FVIII дуже лабільний через невисоку спорідненість субодиниці A2 до інших. В асоціації A1/A3-C1-C2 задіяні гідروفобні взаємодії та іони Ca²⁺ [3, 33].

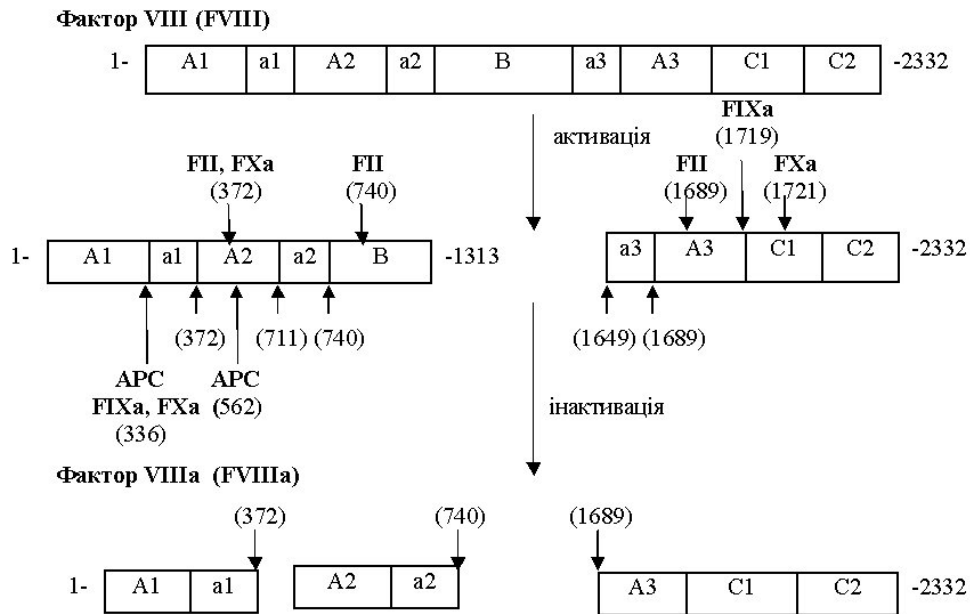


Рис. 1. Схема активації/інактивації FVIII [21, 23]

Щодо інактивації FVIIIa, то вона може відбуватися спонтанно та полягає у відділенні домену A2 важкого ланцюга, який не зв’язується з іншими доменами FVIII ковалентними зв’язками [14, 16].

Описано дві специфічні інактивації FVIIIa – опосередкована APC та FXa [3]. APC інактивує FVIIIa через низку протеолітичних розщеплень у положеннях Arg336 A1-домену та Arg562 A2-домену [9]. При цьому порушується область контакту FVIIIa/FIXa і дестабілізується взаємодія доменів A1 і A2. У літературі описано взаємодію між компонентами теназної й APC антикоагулянтної систем, які впливають на швидкість інактивації FVIIIa: FIXa запобігає розщепленню FVIIIa в положенні Arg562, а FX – сайту Arg336. Проте білок S нівелює захисний ефект FX і за відсутності FIXa також значно стимулює швидкість розщеплення в положенні Arg562 [2].

Інактивація FVIIIa за допомогою FXa відбувається значно швидше, ніж APC, та полягає у протеолітичному розщепленні зв’язків у позиціях Arg336, що спричиняє дестабілізацію домену A1 та відокремлення вільного A2-домену [4].

Гемофілія А

Дефекти гена FVIII можуть спричинити розвиток гемофілії А – X-зв’язаного спадкового рецесивного захворювання, що спостерігається з частотою 1 на 5000 новонароджених [4, 19, 21]. У 70 % пацієнтів спостерігається спадковий анамнез хвороби, 30 % припадає на спорадичні випадки захворювання внаслідок мутацій у локусі гена FVI-

II. Мутації можуть виникати як в екзонах, так і в інтронах, а також у 3'-нетрансльованій області, промоторі та в сигнальній ділянці. Так, приблизно у половини хворих із тяжкою формою гемофілії А виявлено пошкодження в інтронах 22 і 23, які відповідальні за кодування C1-домену [4].

Найпоширенішою мутацією у пацієнтів із тяжкою формою гемофілії А (близько 45 % випадків) є інверсія з транслокацією екзонів 1–22 (включаючи інтрони), як наслідок гомологічної рекомбінації між геном F8A в інтроні 22 та однією з копій F8A поза геном фактора зсідання крові VIII [21]. Інші мутації, що викликають розвиток гемофілії, – це точкові (85 % міссенс- і 15 % нонсенс-мутацій), 5 % з яких є великі або малі делеції та вставки, а також інверсії в межах інтрону 1 [7]. Із проаналізованих 80 точкових мутацій 27 викликають розвиток тяжкої форми гемофілії А, 29 – середньої форми тяжкості та 18 – легкої [15].

Описано більш ніж 60 різних видів делецій у гені FVIII. Встановлено, що гемофілія, яка виникає в результаті делецій, у 5 разів частіше супроводжується появою імунних антитіл, ніж у пацієнтів без делецій [2].

Залежно від активності FVIII, розрізняють три форми гемофілії: тяжка (рівень фактора <1,0 %), середня (від 1,1 до 5,0 %) та легка (від 5,1 до 15,0 %) [3, 21].

З метою корекції дефіциту фактора або уникнення кровотеч у пацієнтів з гемофілією А проводять замісну терапію, яка полягає у введенні плазмових або рекомбінантних препаратів фактора VIII. Для лікування гемофілії в Україні використовують низку препаратів фактора як плазмового, так і рекомбінантного походження [6].

Залежно від наявності баластних білків («чистоти»), розрізняють плазмові препарати проміжного ступеня очищення, отримані за допомогою традиційних методів осадження/адсорбції, та високоочищені препарати, виділені методами іонообмінної або афінної хроматографії [6].

З кінця 1980-х років у клінічній практиці почали застосовувати рекомбінантні препарати фактора [6, 21, 32, 34, 36], які за етапами технологічного одержання також поділяють на три покоління (залежно від наявності білка людини чи тварини в культуральному середовищі та кінцевому продукті).

Сучасні препарати FVIII мають бути вільні від надлишкових компонентів, таких як додаткові білки, активовані гемолізани, вірусні патогени й інші хімічні домішки, які використовуються у процесі отримання, та мати високу питому активність [30].

У табл. 1 та 2 наведено препарати FVIII (в алфавітному порядку), які зареєстровані в Україні, та перелічено основні методи їхнього отримання [6].

Лікування гемофілії А за допомогою препаратів FVIII на сьогоднішній час є розповсюдженою практикою і потребує препаратів високої чистоти, щоб, з одного боку, зменшити ризик зараження пацієнта вірусними захворюваннями, а з іншого, оскільки ін'єкції необхідно часто повторювати, – запобігти розвиткові небажаних імунних реакцій, які виникають у процесі накопичення залишкових забруднюючих речовин [8]. Тому надзвичайно важливими є створення сучасних і вдосконалення наявних методик виділення й очищення FVIII зсідання крові. У нашій лабораторії розроблено метод отримання високоочищеного вірус-безпечного FVIII зсідання крові з використанням методу афінної хроматографії на макропористих кремнеземних сорбентах і тріазинових барвників у ролі лігандів [5]. Проте створення нових ефективних методів виділення й очищення фактора неможливе без знання структурної організації досліджуваної молекули.

Таким чином, підсумовуючи усі ці дані, ми можемо стверджувати, що FVIII відіграє важливу роль у процесі зсідання крові. Вроджений чи набутий дефіцит FVIII є причиною

виникнення розвитку гемофілії А, лікування якої полягає у компенсаторному введенні препаратів фактора як плазмового, так і рекомбінантного походження.

Таблиця 1

Плазмові препарати FVIII, зареєстровані в Україні (2016)

Препарат	Виробник, країна	Методи отримання	Вірусна інактивація	Наявність інших білків
Біоклот А	PrAT «БІОФАРМА» Україна	іонообмінна хроматографія	сольвент-детергентний метод, сухе нагрівання	альбумін, vWF
Beriate	ЦСЛ Берінг ГмБХ/ CSL Behring GmbH Німеччина	преципітація, іонообмінна хроматографія	сольвент-детергентний метод, сухе нагрівання (60 °С, 10 год)	альбумін, vWF
Emoclot D.I.	Kedrion, Італія	іонообмінна хроматографія	сольвент-детергентний метод, сухе нагрівання (100 °С, 30 хв)	альбумін, vWF
Fanndi	Grifols, Іспанія	гепарин-афінна хроматографія	сольвент-детергентний метод, сухе нагрівання	альбумін, vWF
Feiba	Baxter AG, Австрія	іонообмінна хроматографія	сольвент-детергентний метод, сухе нагрівання (100 °С, 30 хв)	FII, FVII, FIX, FX, фактори калікреїн-кінінової системи
Immunate	Baxter BioScience, Австрія	іонообмінна хроматографія	сольвент-детергентний метод, сухе нагрівання-тиск (60 °С, тиск 190 мбар, 10 год)	альбумін, vWF
Octanate	Octapharma, Австрія, Швеція, Франція	преципітація, іонообмінна хроматографія	сольвент-детергентний метод, сухе нагрівання (100 °С, 30 хв)	альбумін, vWF
Wilate	Octapharma, Австрія	преципітація, іонообмінна хроматографія, гель-фільтрація	сольвент-детергентний метод, сухе нагрівання (100 °С, 120 хв)	альбумін, vWF

Таблиця 2

Рекомбінантні препарати фактора VIII, зареєстровані в Україні (2016)

Препарат	Виробник, країна	Методи отримання	Вірусна інактивація	Наявність інших білків
Advate	Baxter BioScience, Австрія	рекомбінант, іонообмінна, імуноафінна хроматографія	сольвент-детергентний метод, ультрафільтрація	–
Recombinate rAHF	Baxter BioScience, США	рекомбінант, імуноафінна хроматографія	сольвент-детергентний метод	альбумін людини
ReFactor AF	Pfizer, Швеція	рекомбінант, іонообмінна, імуноафінна хроматографія	сольвент-детергентний метод, нанофільтрація	–

Серед основних біологічних властивостей FVIII можна виділити такі: хромосомна локалізація – Xq28; молекулярна маса – 170–280 кДа; кількість амінокислотних залишків – 2323; складається зі субодиниць – A1(a1)-A2(a2)-B-(a3)A3-C1-C2; концентрація у плазмі крові – 0,1–0,2 мг/мл; час півжиття у комплексі з vFW – 10–12 год, а у вільному (дисоційованому) стані – 2,5 год; константа зв'язування vFW – з $5,9 \pm 1,9 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. Процес вірусної інактивації є обов'язковим під час отримання будь-яких препаратів із плазми крові. Сучасні препарати факторів зсідання крові є двічі вірус-інактивовані.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Волков Г. Л., Платонова Т. Н., Савчук А. Н. и др. Современные представления о системе гемостаза. К.: Наукова думка, 2005. 292 с.

2. *Зубайров А. Д.* Молекулярні основи згортання крові і тромбозоутворення. Казань: ФЕН, 2000. 364 с.
3. *Орлова Н. А.* Дизайн генетических элементов и оптимизация системы гетерологической экспрессии фактора свертывания крови VIII человека в клетках млекопитающих: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.01.03. М., 2013. 26 с.
4. *Орлова Н. А., Ковнир С. В., Воробьев И. И.* и др. Фактор свертывания крови VIII – от эволюции к терапии // *Acta Naturae*. 2013. Т. 5. 2 (17). С. 19–39 (русскоязычная версия).
5. Пат. 107509 UA, C07K 1/22, C07K 14/755, B01D 15/18. Спосіб виділення фактора VIII згортання крові / Шурко Н.О., Даниш Т.В., Новак В.Л. // u 201512302 від 11.12.2015. Опубл. 10.06.2016. Бюл. № 11. С. 5.
6. *Шурко Н. О., Вороняк М. І., Даниш Т. В.* Препарати фактора згортання крові VIII та способи їх отримання // *Біологічні студії*. 2014. Т. 8. № 1. С. 197–204.
7. *Al-Allaf F. A., Taher M. M., Abduljaleel Z.* et al. Mutation screening of the Factor VIII Gene in Hemophilia A in Saudi Arabia: Two Novel Mutations and Genotype-Phenotype Correlation // *J. Mol. Genet. Med*. 2016. Vol. 10 (2). P. 1–11.
8. *Ahmadian H., Hansen E. B., Faber J. H.* et al. Molecular design and downstream processing of processing of Turoctocog alfa (Novoeight), a B-domain truncated factor VIII molecule // *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2016. Vol. 27 (5). P. 568–575.
9. *Danese S., Vetrano S., Zhang L.* et al. The protein C pathway in tissue inflammation and injury: pathogenic role and therapeutic implications // *Blood*. 2010. Vol. 11. 115(6). P. 1121–1130.
10. *Fay P. J.* Activation of factor VIII and mechanism of cofactor action // *Blood Rev*. 2004. Vol. 18. P. 1–15.
11. *Fay P. J.* Factor VIII Structure and Function // *Int. J. Hematol*. 2006. Vol. 83. P. 103.
12. *Federici A. D., Lee Ma C. A., Berntorp E. E.* et al. Von Willebrand diseases: Basic and clinical aspect. Blacwell Publishing Ltd. 2011. 128 p.
13. *Gharagozlou S., Sharifian R. A., Khoshnoodi J.* et al. Epitope specificity of anti-factor VIII antibodies from inhibitor positive acquired and congenital haemophilia A patients using synthetic peptides spanning A and C domains // *Thromb Haemost*. 2009. Vol. 101 (5). P. 834–839.
14. *Hockin M. F., Jones K. C., Everse S. J.* et al. A model for the stoichiometric regulation of blood coagulation // *J. Biol. Chem*. 2002. 24, Vol. 277 (21). P. 18322–18333.
15. *Hollestelle M. J., Thinnest T., Crain K.* et al. Tissue distribution of factor VIII gene expression in vivo – a closer look // *Thromb Haemost*. 2001. Vol. 86 (3). P. 855–861.
16. *Koedam J. A., Meijers J. C., Sixma J. J.* et al. Inactivation of human factor VIII by activated protein C. Cofactor activity of protein S and protective effect of von Willebrand factor // *J. Clin. Invest*. 1988. Vol. 82 (4). P. 1236–1243.
17. *Lange A. M., Altynova E. S., Nguyen N. G.* et al. Overexpression of factor VIII after AAV delivery is transiently associated with cellular stress in hemophilia A mice // *Citation: Molecular Therapy – Methods & Clinical Development*. 2016. Vol. 3. P. 1–8.
18. *Lin L., Huai Q., Huang M.* et al. Crystal structure of the bovine lactadherin C2 domain, a membrane binding motif, shows similarity to the C2 domains of factor V and factor VIII // *J. Mol. Biol*. 2007. Vol. 17, 371 (3). P. 717–724.
19. *Lee C. A., Berntorp E. E.* Textbook of hemophilia. Second edition. A John Wiley & Sons, Ltd., Publication, 2010. 464 p.
20. *Liu M. L., Shen B. W., Nakaya S.* et al. Hemophilic factor VIII C1- and C2-domain missense mutations and their modeling to the 1.5-angstrom human C2-domain crystal structure // *Blood*. 2000. Vol. 1, 96 (3). P. 979–987.

21. Mazurkiewicz-Pisarek A., Ptucienniczak G., Ciach T. et al. The factor VIII protein and its function // *Acta Biochim. Pol.* 2016. Vol. 63 (1). P. 11–16.
22. Molinari M., Calanca V., Galli C. et al. Role of EDEM in the release of misfolded glycoproteins from the calnexin cycle // *Sci.* 2003. Vol. 299. 5611. P. 1397–1400.
23. Myles T., Yun T. H., Leung L. L. Structural requirements for the activation of human factor VIII by thrombin // *Blood.* 2002. Vol. 100. P. 2820–2826.
24. Newell J. L., Fay P. J. Acidic Residues C-Terminal to the A2 Domain Facilitate Thrombin-Catalyzed Activation of Factor VIII // *Biochem.* 2008. Vol. 47 (33). P. 8786–8795.
25. Ngo J. C., Huang M., Roth D. A. et al. Crystal structure of human factor VIII: implications for the formation of the factor IXa-factor VIIIa complex // *Structure.* 2008. Vol. 16 (4). P. 597–606.
26. Nogami K., Lapan K. A., Qian Zhou Q. et al. Identification of a Factor Xa-interactive Site within Residues 337–372 of the Factor VIII Heavy Chain // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. P. 15763–15771.
27. Nogami K., Shima M., Nishiya K. et al. A novel mechanism of factor VIII protection by von Willebrand factor from activated protein C-catalyzed inactivation // *Blood.* 2002. Vol. 1, 99 (11). P. 3993–3998.
28. Nogami K., Wakabayashi H., Schmidt K. et al. Altered interactions between the A1 and A2 subunits of factor VIIIa following cleavage of A1 subunit by factor Xa // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 17, 278 (3). P. 1634–1641.
29. Pittman D. D., Alderman E. M., Tomkinson K. N. et al. Biochemical, immunological, and in vivo functional characterization of B-domain-deleted factor VIII // *Blood.* 1993. Vol. 1, 81 (11). P. 2925–2935.
30. Radosevich M., Burnouf T. Affinity chromatography – fractionated and DNA-engineered plasma proteins // *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology.* 2009. P. 1–12.
31. Ro Sen S., Casoni Chiarion M. Chromogenic determination of factor VIII activity in plasma and factor VIII concentrates // *Chromogenix – monograph series.* 2000. 34 p.
32. Santagostino E. A new recombinant factor VIII: from genetics to clinical use // *J. Drug Design, Development and Therapy.* 2014. Vol. 8. P. 2507–2515.
33. Shen B. W., Spiegel P. C., Chang C-H. et al. The tertiary structure and domain organization of coagulation factor VIII // *Blood.* 2008. Vol. 111 (3). P. 1240–1247.
34. Thim L., Vandahl B., Karlsson J. et al. Purification and characterization of a new recombinant factor VIII (N8) // *Haemophilia.* 2010. Vol. 16. P. 349–359.
35. Wakabayashi H., Koszelak M. E., Matri M. et al. Metal ion-independent association of factor VIII subunits and the roles of calcium and copper ions for cofactor activity and inter-subunit affinity // *Biochem.* 2001. Vol. 28, 40 (34). P. 10293–10300.
36. Wynn T. T., Gumuscu B. Potential role of a new PEGylated recombinant factor VIII for hemophilia A // *J. Blood Med.* 2016. Vol. 7. P. 121–128.
37. Zhang B., Ginsburg D. Familial multiple coagulation factor deficiencies // *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice.* Sixth Edition. 2013. P. 709–714.

Стаття: надійшла до редакції 29.03.17

доопрацьована 13.08.17

прийнята до друку 22.09.17

THE COAGULATION FACTOR VIII: STRUCTURE AND APPLICATION**N. Shurko, T. Danysh, V. Novak**

*SI "Institute of Blood Pathology and Transfusion Medicine, NAMS of Ukraine"
45, Gen. Chuprynka St., Lviv 79044, Ukraine
e-mail: natalia_shurko@ukr.net*

The article reviews the scientific papers on the study of structure, function and biological role of coagulation factor VIII. Human coagulation factor VIII (anti-hemophilic factor A) is a key component of the blood hemostasis system and the nonenzymatic cofactor to the activated clotting factor IX. The role of factor VIII is to increase the catalytic efficiency of factor IXa in the process of activation of factor X. Factor VIII is a glycoprotein. The gene of factor is localized on the long arm of the X chromosome out occupies a region of 186 kbp, comprising of 26 exons and 25 introns. It consists of 2332 amino acids forming six domains described as A1-A2-B-A3-C1-C2. In blood, under the influence of proteolytic processes (furin protease), this protein is divided into two chains: a heavy chain of 200 kDa (A1-A2-B) and a light chain of 80 kDa (A3-C1-C2). In human plasma factor VIII can be in one of several forms with a molecular weight of 170–280 kDa and is present at a concentration of 0.1–0.2 µg/ml. Coagulation factor VIII in plasma forms complex with chaperone the von Willebrand factor, which stabilizes FVIII in the blood stream and is its key regulator as it allows thrombin to it activate and impedes cleavage of the molecules of nonactivated FVIII by the proteases FXa and activated protein C. The deficiency of factor VIII, either qualitative or quantitative, appears blood coagulation disorder is known as hemophilia A, a affecting approximately 1 in 5,000 newborns. To correct factor deficiency or prevent bleeding in patients with hemophilia A, the replacement therapy is carried out. This therapy involves administrating of plasma or recombinant preparations of factor VIII. A variety of plasma-derived and recombinant factor VIII preparations registered in Ukraine are used for haemophilia treatment in our country.

Keywords: coagulation factor VIII, mutation, hemophilia A, preparations of factor

РОЛЬ РІАНОДИНЧУТЛИВИХ Ca^{2+} -КАНАЛІВ У РЕГУЛЯЦІЇ ДИХАННЯ МІТОХОНДРІЙ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ

Н. Купиняк^{1,2}, О. Іккерт¹, В. Манько¹

¹Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна

²Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького
вул. Пекарська, 69, Львів 79000, Україна
e-mail: nadiya.kupnyak@gmail.com

Досліджено роль mRyRs у регуляції мітохондріального дихання гепатоцитів щурів за різної позамітохондріальної концентрації Ca^{2+} та окиснення сукцинату, пірватату і α -кетоглутарату. Ізольовані мітохондрії отримували методом диференційного центрифугування. Інтактність отриманих мітохондрій визначали методом електронної мікроскопії. АТФ-азну активність суспензії мітохондрій, як показник відсутності залишків плазматичної мембрани та мембран ендоплазматичного ретикулуму, визначали на основі змін вмісту неорганічного фосфату в середовищі після інкубації мітохондрій з еозином Y, оубаїном і тапсигаргіном. Швидкість дихання реєстрували полярографічним методом з використанням електрода Кларка. Для з'ясування ролі mRyRs у регуляції мітохондріального дихання суспензію мітохондрій преінкубували з ріанодином у концентрації 0,05 мкмоль/л або вносили його у концентрації 0,1 мкмоль/л безпосередньо в полярографічну комірку. Встановлено, що після преінкубації суспензії мітохондрій з ріанодином упродовж 5 та 10 хв за окиснення сукцинату відбувається зниження споживання кисню. Унаслідок безпосереднього внесення ріанодину до мітохондрій у полярографічну комірку з концентрацією Ca^{2+} в середовищі 0,1 і 1 мкмоль/л за окиснення сукцинату швидкість споживання кисню зменшилася у станах S_4 , S_3 та S_4^{ATP} . За окиснення пірватату преінкубація мітохондрій з ріанодином спричиняла зниження споживання кисню, як і після безпосереднього внесення ріанодину в полярографічну комірку з концентрацією Ca^{2+} у середовищі 0,1 мкмоль/л. За концентрації Ca^{2+} у середовищі 1 мкмоль/л зареєстроване збільшення швидкості споживання кисню під впливом ріанодину у станах S_4 та S_3 на 12,2 і 17,2 % відповідно. Споживання кисню мітохондріями за окиснення α -кетоглутарату після додавання ріанодину в полярографічну комірку з концентрацією Ca^{2+} 0,1 мкмоль/л у середовищі зростало у станах S_4 та S_3 , а в середовищі з концентрацією Ca^{2+} 1 мкмоль/л – зростало у стані S_4 на 19,1 % та зменшилось у стані S_4^{ATP} на 14,6 %. Аналіз даних дає змогу стверджувати, що у мітохондріях гепатоцитів mRyRs є важливою ланкою адаптивного регуляторного зв'язку між величиною мембранного потенціалу мітохондрій та інтенсивністю їхнього дихання за низьких значень позамітохондріальної концентрації Ca^{2+} й окиснення пірватату. Якщо ж переважає окиснення α -кетоглутарату чи позамітохондріальна концентрація Ca^{2+} є високою, то надходження Ca^{2+} за участю mRyRs призводить до пригнічення процесів дихання.

Ключові слова: ріанодин, mRyRs, мітохондріальне дихання, субстрати окиснення, гепатоцити

Акумуляція мітохондріями катіонів Ca^{2+} відіграє важливу роль у регуляції метаболічних процесів у клітині [21, 29, 31]. Причому ця роль реалізується як через активацію акумулятованими катіонами Ca^{2+} внутрішньомітохондріальних процесів, що завершуються синтезом АТФ, так і опосередковано – через їхню здатність змінювати концентрацію Ca^{2+}

у цитозолі і, відтак, генерацію цитозольних Ca^{2+} -сигналів [1, 8, 22]. У внутрішній мембрані мітохондрій гепатоцитів наявні такі Ca^{2+} -транспортувальні системи, які забезпечують вихід Ca^{2+} з матриксу: мітохондріальна пара транз'єнтної проникності [7] та H^+ - Ca^{2+} обмінник [10, 23, 32]. До Ca^{2+} -транспортувальних систем, що забезпечують акумуляцію Ca^{2+} у матриксі мітохондрій гепатоцитів, належать Ca^{2+} -уніпортер [19], система швидкого захоплення катіона (RaM) [22, 33, 35] та мітохондріальні ріанодинчутливі Ca^{2+} -канали (mRyRs) [26].

Ідентифіковано mRyRs у кардіоміоцитах [15], у нейронах [24], а згодом і в гепатоцитах [26]. З'ясувалося, що вони за своїми біохімічними, фармакологічними та функціональними властивостями подібні до типу 1 RyRs саркоплазматичного ретикулуму і відіграють важливу роль в акумуляції Ca^{2+} у мітохондріях [15, 24]. Аналогічно RyRs саркоплазматичного ретикулуму, для активації mRyRs характерна куполоподібна залежність від концентрації катіонів Ca^{2+} у цитозолі. Їхня максимальна активність спостерігається за концентрації 10 мкмоль/л, а повне інгібування – за 0,1–1 ммоль/л Ca^{2+} [12]. Ріанодин (10 мкмоль/л) індукує напівпровідний стан mRyR кардіоміоцитів, який триває лише кілька секунд [12]. А нещодавно ідентифіковані mRyRs гепатоцитів інгібуються ріанодином у концентраціях від 0,05 до 1 мкмоль/л, що супроводжується зниженням внутрішньомітохондріальної концентрації іонізованого Ca^{2+} [26]. Зважаючи на те, що mRyRs мають вищу електричну провідність Ca^{2+} , ніж Ca^{2+} -уніпортер мітохондрій, ймовірно, саме mRyRs відповідає за поглинання Ca^{2+} з мікродомених у ділянці МММ (мітохондрійасоційованих мембран на стику ендоплазматичного ретикулуму і мітохондрій) [20].

Експресовані у внутрішній мембрані мітохондрій кардіоміоцитів і нейронів mRyRs забезпечують акумуляцію Ca^{2+} в матриксі у відповідь на зростання його цитозольної концентрації [15, 22]. У серці така акумуляція Ca^{2+} мітохондріями стимулює споживання кисню [14]. У цьому дослідженні показано, що позамітохондріальні катіони Ca^{2+} у концентрації 10 мкмоль/л (але не у вищих) стимулювали споживання кисню і що цей ефект інгібувався ріанодином [14].

Як впливає активація mRyR на енергетичні процеси у гепатоцитах, достеменно не відомо. Тому мета цієї роботи – з'ясувати роль mRyRs у регуляції мітохондріального дихання гепатоцитів щурів за різної позамітохондріальної концентрації Ca^{2+} .

Матеріали та методи

Досліди виконані на білих нелінійних щурах-самцях масою 200–250 г. Тварин утримували у стаціонарних умовах віварію за постійної температури на основному раціоні. Тварин наркотизували хлороформом, після чого декапітували, робили розтин черевної порожнини і швидко виділяли печінку. Ін'єкцію та декапітацію здійснювали в лабораторії, ізольовано від інших тварин. Усі маніпуляції з тваринами проводили згідно з Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей, та Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Мітохондрії печінки щурів виділяли методом диференційного центрифугування [25]. Для цього печінку після виділення зважували та перфузували розчином такого складу (ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 4,7, MgCl_2 – 1, CaCl_2 – 0,1, глюкоза – 5, HEPES – 10, EGTA – 1; pH 7,4. Охолоджену й відперфузовану печінку подрібнювали через прес і гомогенізували в гомогенізаторі Поттера-Евельгейма зі швидкістю 800 об./хв за 3 вертикальних ходи товчачика у співвідношенні 1 г тканини до 8 мл середовища гомогенізації. Середовище гомогенізації містило (ммоль/л): сахарозу – 250, HEPES – 10, EGTA – 1; pH 7,2. Гомогенат центрифугували 3 хв за прискорення 150 g та 5 хв за 300 g без зупинки центрифуги для осадження уламків клітин і ядер. Мітохондріальну фракцію отримували з надосадової рідини цен-

трифугуванням супернатанту впродовж 15 хв за 4500 g і температури 0–2 °С. Отриманий осад мітохондрій ресуспензували середовищем виділення у співвідношенні 1 г тканини до 0,1 мл середовища. Отриману суспензію мітохондрій використовували для подальших досліджень. Концентрацію мітохондріального білка вимірювали за методом Лоурі [27].

Для електронної мікроскопії суспензію мітохондрій промивали какодилатним буфером (0,2 моль) та фіксували 1,5 % розчином глутарового альдегіду (2 год) і 1 % розчином OsO₄ (2 год), виготовленими на какодилатному буфері. Після цього зразки переносили у 1,5 % водний розчин уранілацетату на 12 год. Фіксовані зразки промивали і зневоднювали за кімнатної температури у зростаючих концентраціях етанолу (в діапазоні від 70 до 100 %). Зневоднені зразки переносили в чисту епоксидну смолу, поміщали у капсули для полімеризації й витримували 24 год за температури 40 °С в термостаті й 48 год за температури 60 °С. Зрізи виготовляли за допомогою ультрамикротому УМТП-6М. Контрастували їх у 1,5 % розчині уранілацетату, виготовленому на 70 % етанолі. Ще раз контрастували зрізи у плюмбум (II) цитрат за Рейнольдсом [30], після чого переглядали і фотографували на трансмісійному електронному мікроскопі ПЕМ-100.

АТФ-азну активність суспензії мітохондрій, як показник відсутності залишків плазматичної мембрани та мембран ендоплазматичного ретикулу, визначали на основі змін вмісту неорганічного фосфату ($\Phi_{\text{н}}$) в середовищі інкубації мітохондрій методом УФ-детекції та методом Фіске-Суббароу [18]. Для цього суспензію мітохондрій розділяли на аліквоти й інкубували у відповідних середовищах упродовж 15 хв. З метою інгібування Ca²⁺-помпи плазматичної мембрани й ендоплазматичного ретикулу до середовища інкубації додавали еозин Y (20 мкмоль/л), для інгібування Na⁺-K⁺-помпи – оубаїн (10 мкмоль/л), для інгібування Ca²⁺-помпи ендоплазматичного ретикулу – тапсигаргін (1 мкмоль/л), для блокування дихального ланцюга – натрію азид (10 ммоль/л). АТФ-азну реакцію запускали додаванням до середовища АТФ (3 ммоль/л). Після інкубації суспензію мітохондрій центрифугували упродовж 5 хв за прискорення 1600 g і швидко відбирали проби для визначення концентрації. Концентрацію Ca²⁺ у середовищі моделювали, використовуючи Ca²⁺-ЕГТА-буфер (100 мкмоль/л ЕГТА). Різницю між вмістом $\Phi_{\text{н}}$ у середовищі з концентрацією Ca²⁺ 10⁻⁷ моль/л і у середовищі, котре містило 2 ммоль/л ЕГТА (безкальцієве), вважали показником Ca²⁺-чутливої АТФ-азної активності.

Швидкість споживання кисню реєстрували полярографічним методом за температури 26 °С. Для цього у полярографічну комірку, що містила розчин відповідного субстрату окиснення, вносили 100 мкл суспензії мітохондрій. Концентрація білка у комірці становила 5–7 мг/мл. Середовище для дихання містило (ммоль/л): сахарозу – 250, K₂HPO₄ – 2, ЕГТА – 0,1, CaCl₂ – 1, НЕРЕС – 10; рН 7,2. Як субстрати окиснення використовували сукцинат, піруват і α-кетоглутарат у концентраціях 5 ммоль/л. Дихання стимулювали додаванням 320 нмоль АДФ (кінцева концентрація у комірці 200 мкмоль/л). За полярограмами визначали швидкість дихання у станах S₄, S₃ і S₄^{АТФ} за Чансом і Вільямсом, отримані значення перераховували на мг білка [16].

Математично-статистичне опрацювання даних здійснювали з використанням пакету програм Microsoft Excel. Вірогідність різниці між статистичними групами визначали за Стьюдентом. За статистично достовірні приймали зміни з P<0,05.

Результати і їхнє обговорення

Дослідження ролі mRyRs у функціонуванні мітохондрій гепатоцитів проведено нами на суспензії ізольованих мітохондрій. На наведеній **електронно-мікроскопічній**

фотографії (рис. 1) видно значну кількість функціонально повноцінних, неушкоджених мітохондрій, які перебувають на різних стадіях розвитку (молоді, зрілі та старі). Суспензія містить незначну кількість мембран, які асоційовані з мітохондріями або утворюють замкнені везикули. У такій суспензії краще зберігаються функціональні властивості мітохондрій і краще проявляються фізіологічні ефекти [5]. Ця гіпотеза була підтверджена роботами А.М. Бабського на кафедрі фізіології людини і тварин ЛНУ ім. Івана Франка [2–4].

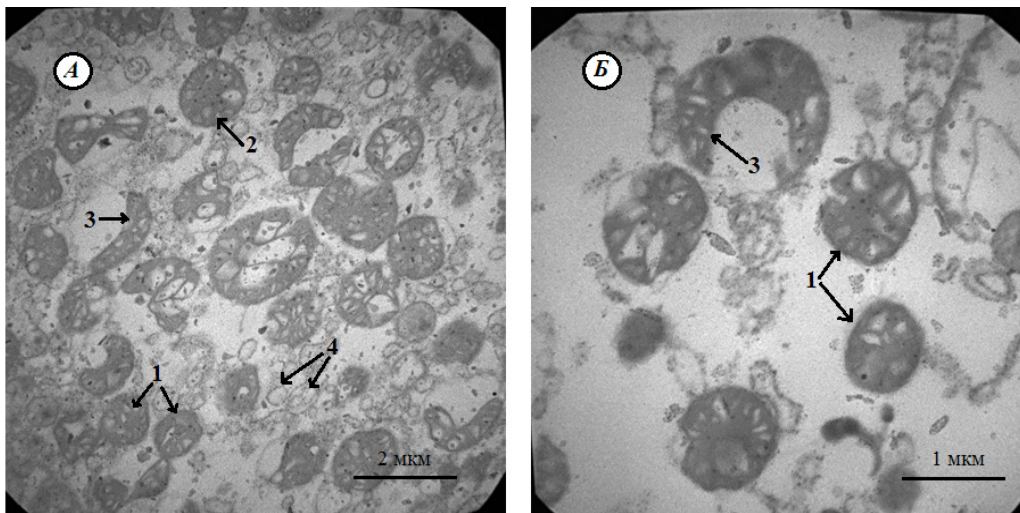


Рис. 1. Електронно-мікроскопічна фотографія суспензії мітохондрій гепатоцитів за збільшення $\times 4000$ (А) і $\times 10\,000$ (Б): 1 – молоді мітохондрії; 2 – зрілі мітохондрії; 3 – старі мітохондрії; 4 – везикули з немітохондріальних мембран

Для оцінки ролі немітохондріальних мембранних структур суспензії у депонуванні Ca^{2+} визначали **АТФ-азну активність** цієї суспензії. Встановлено, що вміст Φ_{H} у суспензії мітохондрій за дії інгібітора $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-АТФ-ази}$ плазматичної мембрани оубаїну [13], інгібітора $\text{Ca}^{2+}\text{-АТФ-ази}$ плазматичної мембрани й ендоплазматичного ретикулуму еозину Y [6, 11], а також інгібітора $\text{Ca}^{2+}\text{-АТФ-ази}$ ендоплазматичного ретикулуму тапсигаргіну [34] суттєво не змінювався і був у межах від 0,058 до 0,080 мкмоль Φ_{H} / (мг білка \times 15 хв). Це свідчить, що досліджувана суспензія містить незначну кількість немітохондріальних мембран, а їхній внесок у депонування Ca^{2+} , порівняно з мітохондріями, є несуттєвим, тому зміни, отримані за дії ріанодину, можна пов'язувати саме з мітохондріальними ріанодинчутливими Ca^{2+} -каналами.

Для визначення ролі mRuRs у процесах мітохондріального дихання отриману суспензію мітохондрій преінкубували з ріанодином у концентрації 0,05 мкмоль/л за температури 2–4 °C упродовж 5 або 10 хв. Після цього мітохондрії вносили у полярографічну комірку та реєстрували швидкість споживання кисню. Паралельно з преінкубацією мітохондрій з ріанодином, в інших серіях ріанодин у концентрації 0,1 мкмоль/л вносили безпосередньо у полярографічну комірку до мітохондрій.

Після 5 хв преінкубації суспензії мітохондрій з ріанодином за **окиснення сукцинату** відбувається зниження споживання кисню тільки у стані $S_4^{\text{АТФ}}$ – на 22,8 % (рис. 2, А). На відміну від цього, після преінкубації 10 хв спостерігали зниження сукцинатстимульованого дихання у трьох станах – $S_4^{\text{АТФ}}$ (на 44,3 %), S_4 (на 41,2 %) та S_3 (на 38,8 %).

Унаслідок безпосереднього внесення ріанодину до мітохондрій у полярографічну комірку з концентрацією Ca^{2+} у середовищі 0,1 і 1 мкмоль/л за окиснення сукцинату швидкість дихання теж зменшилася у трьох станах (рис. 2, B). За концентрації Ca^{2+} 0,1 мкмоль/л це ріанодиніндуковане зменшення становило у стані S_4 13,4 %, у стані S_3 – 13,7 %, а за концентрації 1 мкмоль/л – 9,59 і 15,3 % відповідно. А ось коли концентрації Ca^{2+} у полярографічній комірці не задавали (умовно 0 ммоль/л), суттєвих змін у диханні мітохондрій за окиснення сукцинату під впливом ріанодину не було.

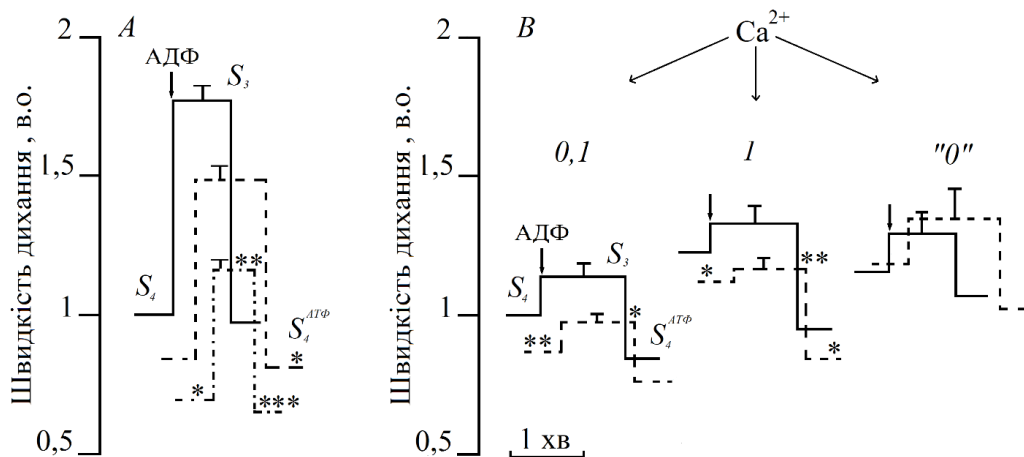


Рис. 2. Дихання суспензії мітохондрій за окиснення сукцинату: А – преінкубація мітохондрій з ріанодином у концентрації 0,05 мкмоль/л (— контроль, - - - 5 хв, - · - 10 хв; $[\text{Ca}^{2+}]$ – 0,1 мкмоль/л); Б – вплив внесення ріанодину (0,1 мкмоль/л) у полярографічну комірку на дихання суспензії мітохондрій у середовищі з різною концентрацією Ca^{2+} (— контроль, - - - дослід); стан S_4 – у комірку з екзогенним субстратам вносили 100 мкл суспензії мітохондрій; стан S_3 – для стимуляції окисного фосфорилування додавали екзогенний АДФ; після вичерпування екзогенного АДФ встановлювався рівноважний стан $S_4^{\text{АТФ}}$; [сукцинат] = 5 мкмоль/л, [АДФ] = 200 мкмоль/л; за одиницю взято швидкість дихання у контролі в стані S_4 ; * – $P \leq 0,05$, ** – $P \leq 0,01$, *** – $P \leq 0,001$, $n=4$

Слід зазначити, що саме по собі споживання кисню мітохондріями у станах S_4 і S_3 за окиснення сукцинату зростає внаслідок підвищення концентрації Ca^{2+} у середовищі від 0,1 до 1 мкмоль/л ($P = 0,009$ і $0,003$ відповідно). Крім того, в середовищі з 0,1 мкмоль/л Ca^{2+} дихальний контроль за Ларді (відношення швидкостей у станах S_3 і S_4) становив 1,15, а в середовищі з 1 мкмоль/л – зменшився до 1,08 (на 5,93 %, $P=0,048$; див. таблицю). Дихальний контроль за Чансом ($S_3/S_4^{\text{АТФ}}$) становив 1,38, коли концентрація була 0,1 мкмоль/л, і 1,40 за концентрації Ca^{2+} у середовищі 1 мкмоль/л. Назагал, такі низькі дихальні контролю, які спостерігаються, є свідченням роз'єднання дихання й окисного фосфорилування – у першу чергу внаслідок високої швидкості дихання у стані S_4 чи $S_4^{\text{АТФ}}$. Збільшення концентрації Ca^{2+} у середовищі 1 мкмоль/л супроводжується підвищення ступеня роз'єднання дихання й окисного фосфорилування у стані S_4 , але не $S_4^{\text{АТФ}}$. Подібну закономірність – збільшення швидкості дихання у стані S_4 і відсутність змін у стані S_3 внаслідок збільшення позамітохондріальної концентрації Ca^{2+} від 0,1 до 1 мкмоль/л – зареєстровано за окиснення сукцинату і на пермеабілізованих гепатоцитах щурів [9].

Зміни дихальних контролів за Ларді та за Чансом унаслідок додавання ріанодину в полярографічну комірку у концентрації 0,1 мкмоль/л ($M \pm m$)

Субстрат окиснення	Контроль		Дослід	
	дихальний контроль за Ларді	дихальний контроль за Чансом	дихальний контроль за Ларді	дихальний контроль за Чансом
[Ca ²⁺] = 0,1 мкмоль/л				
Сукцинат	1,15±0,02	1,38±0,07	1,15±0,03	1,30±0,06*
Піруват	1,30±0,03	1,58±0,02	1,14±0,07	1,17±0,06*
α-Кетоглутарат	1,42±0,06	1,51±0,03	1,30±0,08	2,04±0,14*
[Ca ²⁺] = 1 мкмоль/л				
Сукцинат	1,08±0,02 [#]	1,40±0,06	1,01±0,02	1,34±0,07
Піруват	1,26±0,04	1,57±0,08	1,33±0,13	1,67±0,14 [#]
α-Кетоглутарат	1,24±0,05 [#]	1,78±0,09 [#]	0,92±0,03* ^{##}	1,84±0,05

Примітка: * – зміни щодо контролю є статистично достовірними з $P < 0,05$; [#] – статистично достовірні на різниці між відповідними показниками за концентрації Ca²⁺ 0,1 і 1 мкмоль/л з $P < 0,05$, ^{##} – з $P < 0,01$; n=4

Унаслідок додавання ріанодину в комірку за 0,1 мкмоль/л Ca²⁺ дихальний контроль за Ларді не змінився, а дихальний контроль за Чансом – незначно зменшився (лише на 5,85 %, $P = 0,015$; див. таблицю). Коли концентрація Ca²⁺ у середовищі була 1 мкмоль/л, дихальний контроль ні за Ларді, ні за Чансом статистично достовірно не змінився під впливом ріанодину. З цього можна зробити висновок, що за високої концентрації Ca²⁺ ступінь спряженості дихання й окисного фосфорилування внаслідок додавання ріанодину в комірку не змінюється.

Сукцинатдегідрогеназа не є Ca²⁺-залежним ферментом [28]. Але у цих дослідженнях ми не використовували інгібітори комплексу I дихального ланцюга. Тому залежність інтенсивності сукцинатстимульованого дихання ізольованих мітохондрій від концентрації Ca²⁺ у середовищі спричинена, мабуть, підтоком ендогенних субстратів Ca²⁺-залежних дегідрогеназ. Цікаво, що за цих умов ріанодин знижує швидкість дихання мітохондрій як у серії з преінкубацією, так і за безпосереднього внесення у полярографічну комірку. Мембранний потенціал мітохондрій унаслідок дії ріанодину в концентраціях 0,05–1 мкмоль/л за окиснення сукцинату практично не змінювався [26]. Трохи складнішою є залежність вмісту Ca²⁺ у матриці мітохондрій від концентрації ріанодину: коли його концентрація становить 0,05 мкмоль/л і як субстрат окиснення використовується сукцинат, вміст акумульованого Ca²⁺ зменшується, а за вищих концентрацій – змін немає [26]. Такий ефект ріанодину може бути спричинений лише інгібуванням mRyRs – зменшенням надходжень Ca²⁺ у матрикс мітохондрій і, відтак, пригніченням Ca²⁺-залежних дегідрогеназ. Але спричинене ріанодином зниження швидкості дихання за окиснення сукцинату є незначним, тому суттєво не змінюється ні акумуляція Ca²⁺ у матриці мітохондрій, ні їхній мембранний потенціал.

За окиснення пірувату преінкубація мітохондрій з ріанодином упродовж 5 хв зумовлювала зниження споживання кисню у станах S₄ та S₃ на 27,9 і 32,7 % відповідно (рис. 3, А). Після преінкубації упродовж 10 хв спостерігали зменшення споживання кисню мітохондріями у трьох станах – S₄ (на 40,8 %), S₃ (на 44,9 %) та S₄^{ATФ} (на 41,4 %).

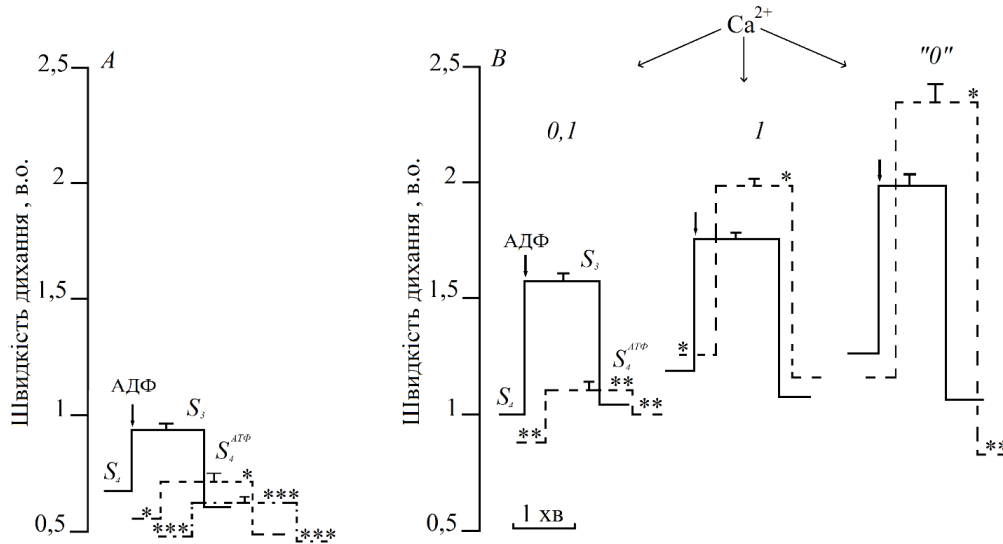


Рис. 3. Дихання суспензії мітохондрій за окиснення пірувату: А – преінкубація мітохондрій з ріанодиноу у концентрації 0,05 мкмоль/л (— контроль, - - - 5 хв, - · - 10 хв, $[Ca^{2+}] = 0,1$ мкмоль/л; за одиницю взято швидкість у стані S_4 за окиснення сукцинату); Б – вплив внесення ріанодину (0,1 мкмоль/л) у полярографічну комірку на дихання суспензії мітохондрій у середовищі з різною концентрацією Ca^{2+} (— контроль, - - - дослід; за одиницю взято швидкість у стані S_4 за окиснення пірувату); [піруват] = 5 мкмоль/л, [АДФ] = 200 мкмоль/л; * – $P \leq 0,05$, ** – $P \leq 0,01$, *** – $P \leq 0,001$, $n=4$

Унаслідок безпосереднього внесення ріанодину (0,1 мкмоль/л) в полярографічну комірку з концентрацією Ca^{2+} в середовищі 0,1 мкмоль/л швидкість споживання кисню мітохондріями знижувалась у станах S_2 , S_3 та S_4^{ATP} на 22,2, 32,1 та 8,2 % відповідно (рис. 3, Б). Але за концентрації Ca^{2+} 1 мкмоль/л у середовищі під впливом ріанодину спостерігали не зниження, а підвищення швидкості дихання у станах S_4 та S_3 – на 12,2 і 17,2 % відповідно. Коли концентрацію Ca^{2+} у середовищі не задавали, споживання кисню мітохондріями під впливом ріанодину у стані S_3 зросло на 20,0 %, а у стані S_4^{ATP} – знизилось на 24,8 %.

На відміну від дихального контролю за Ларді, дихальний контроль за Чансом зменшився внаслідок додавання ріанодину в комірку на 25,6 % ($P=0,014$; див. таблицю), коли концентрація у середовищі становила 0,1 мкмоль/л Ca^{2+} . Таке виражене зниження дихального контролю за Чансом свідчить, що mRyRs є одним із механізмів, які забезпечують спряженість процесів дихання й окисного фосфорилування за фізіологічної концентрації Ca^{2+} .

За концентрації Ca^{2+} 1 мкмоль/л дихальні контролю під впливом ріанодину достовірно не змінювалися (див. таблицю), тобто за цих умов ріанодин не змінює ступінь спряженості дихання й окисного фосфорилування.

Раніше нами встановлено, що за концентрації Ca^{2+} в середовищі 0,1 мкмоль/л мембранний потенціал мітохондрій зменшився внаслідок дії ріанодину (0,01 мкмоль/л; у інших концентраціях ріанодину зменшення не досягнуло першого ступеня достовірності) [26]. Ще суттєвіше знизився вміст акумульованого в матриксі мітохондрій Ca^{2+} за дії ріанодину в усіх концентраціях [26]. Тому з досить високою ймовірністю можемо стверджувати, що за 0,1 мкмоль/л Ca^{2+} ріанодин у концентрації 0,05 і 0,01 мкмоль/л інгібує mRyRs, що спричиняє

зменшення надходження Ca^{2+} у матрикс мітохондрій, пригнічення піруватдегідрогеназного комплексу, зниження швидкості дихання і мембранного потенціалу мітохондрій. Причому зниження мембранного потенціалу не спричиняє за цих умов компенсаторного підвищення швидкості дихання. Лише за 1 мкмоль/л Ca^{2+} і 0,1 мкмоль/л ріанодину швидкість дихання зростає. Нам важко пояснити цей феномен. Цілком можливо, що ріанодин має різний ефект на mRyRs за різних концентрацій цитозольного Ca^{2+} . Або зниження мембранного потенціалу мітохондрій є настільки виражене, що включаються інші, не Ca^{2+} -залежні, адаптаційні механізми, спрямовані на інтенсифікацію мітохондріального дихання.

Дентон [17] дослідив залежність активності піруватдегідрогеназного та α -кетоглутаратдегідрогеназного комплексів мітохондрій серця від позамітохондріальної концентрації Ca^{2+} . Він встановив, що активність піруватдегідрогеназного комплексу зростала за збільшення концентрації Ca^{2+} від 0,01 до 0,1 мкмоль/л, а за вищої концентрації – навіть трохи зменшилася [17]. Ці дані корелюють із результатами дослідження дихання пермеабілізованих гепатоцитів за окиснення суміші малату, глутамату і пірувату [9]. Авторами встановлено, що АДФ-стимульоване дихання пермеабілізованих гепатоцитів інтенсифікувалося за збільшення концентрації Ca^{2+} у середовищі до 0,1 мкмоль/л. Коли ж концентрація Ca^{2+} становила 1 мкмоль/л, АДФ-стимульоване дихання, навпаки, трохи сповільнилося [9].

У зв'язку з цим ми припускаємо, що стимулюючий ефект ріанодину за концентрації Ca^{2+} 1 мкмоль/л зумовлений обмеженням надходження цих катіонів у матрикс мітохондрій і усуненням їхнього негативного ефекту.

Цікаво, що чутливість α -кетоглутаратдегідрогеназного комплексу до Ca^{2+} є, мабуть, трохи вищою, ніж чутливість піруватдегідрогеназного комплексу. Так, у своїй роботі Дентон [17] наводить дані, що активність α -кетоглутаратдегідрогеназного комплексу зростає зі збільшенням концентрації Ca^{2+} вже від 0,001 мкмоль/л (хоча до тих самих 0,1 мкмоль/л, що й активність піруватдегідрогеназного комплексу). За **окиснення α -кетоглутарату** статистично достовірних змін швидкості дихання після преінкубації з ріанодином у концентрації 0,05 мкмоль/л нами не зареєстровано (рис. 4, А). Але внаслідок додавання ріанодину (0,1 мкмоль/л) до полярографічної комірки швидкість дихання мітохондрій у різних станах змінювалася, а напрям цих змін залежав від концентрації Ca^{2+} у середовищі. Якщо у середовищі концентрація Ca^{2+} становила 0,1 мкмоль/л, то ріанодин спричиняв збільшення швидкості дихання мітохондрій у стані S_4 на 25,7 %, а у стані S_3 – на 16,3 % (рис. 4, Б). Дихальний контроль за Чансом у контролі становив 1,51, а за дії ріанодину збільшився (!) на 34,8 % ($P=0,030$; див. таблицю).

Такі зміни швидкостей дихання і дихального контролю за Чансом дають змогу припустити, що коли субстратом окиснення є α -кетоглутарат, то ріанодин, обмежуючи акумуляцію Ca^{2+} у матриксі, усуває його негативний ефект на процеси дихання. Очевидно, за окиснення лише α -кетоглутарату процеси дихання є менш стійкими, ніж за окиснення, наприклад, пірувату, і негативний ефект Ca^{2+} проявляється вже за концентрації 0,1 мкмоль/л. Тому, мабуть, достовірних змін мембранного потенціалу мітохондрій і вмісту в матриксі Ca^{2+} за цієї концентрації позамітохондріального Ca^{2+} не зареєстровано [26].

Коли у контролі збільшили концентрацію Ca^{2+} до 1 мкмоль/л, швидкість дихання мітохондрій зросла у стані S_4 на 30,6 % ($P=0,002$), а у стані S_3 – на 16,3 % ($P=0,044$). Тому дихальний контроль за Ларді зменшився, а за Чансом – збільшився.

Під впливом ріанодину швидкість дихання мітохондрій за 1 мкмоль/л Ca^{2+} зросла у стані S_4 – на 19,2 %, а у стані $S_4^{\text{АДФ}}$ – знизилася на 14,6 %. Але найсуттєвішим є те, що за цих умов немає стимулюючого ефекту АДФ на швидкість дихання. У безкальцієвому середовищі споживання кисню мітохондріями внаслідок дії ріанодину зменшувалося у стані S_3 на 12,9 %, а у стані $S_4^{\text{АДФ}}$ – на 14,2 % (рис. 4, Б).

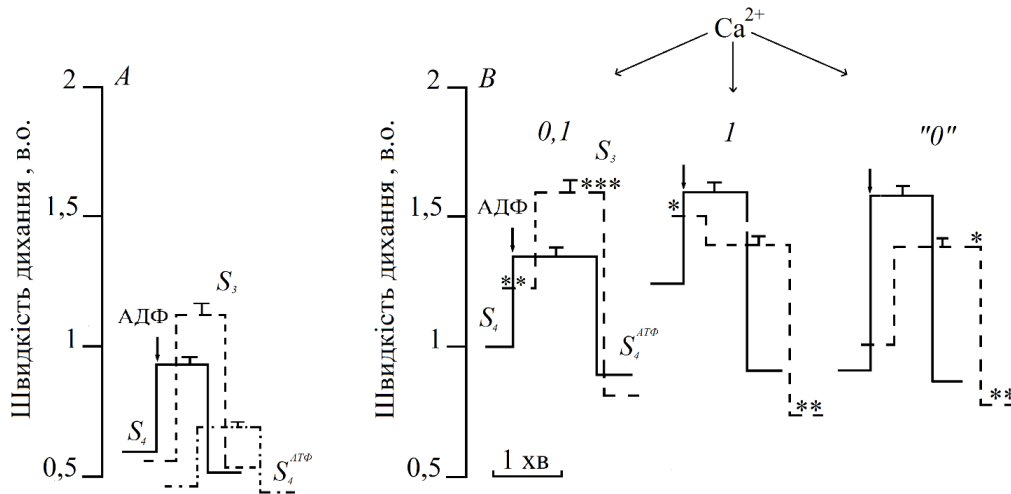


Рис. 4. Дихання суспензії мітохондрій за окиснення α -кетоглутарату: А – преінкубація мітохондрій з ріанодином у концентрації 0,05 мкмоль/л (— контроль, - - - 5 хв, - · - 10 хв, $[\text{Ca}^{2+}] = 0,1$ мкмоль/л; за одиницю взято швидкість у стані S_4 за окиснення сукцинату); Б – вплив внесення ріанодину (0,1 мкмоль/л) у полярографічну комірку на дихання суспензії мітохондрій у середовищі з різною концентрацією Ca^{2+} (— контроль, - - - дослід; за одиницю взято швидкість у стані S_4 за окиснення α -кетоглутарату); $[\alpha\text{-кетоглутарат}] = 5$ мкмоль/л, $[\text{АДФ}] = 200$ мкМ; * – $P \leq 0,05$, ** – $P \leq 0,01$, *** – $P \leq 0,001$, $n=4$

Інгібування ріанодином mRyRs може модулювати процеси дихання мітохондрій опосередковано через (1) зміну їхнього мембранного потенціалу і (2) зміну активності Ca^{2+} -залежних дегідрогеназ та, відтак, активності дихального ланцюга. У свою чергу, між мембранним потенціалом і диханням мітохондрій наявні двобічні зв'язки – зменшення мембранного потенціалу інтенсифікує процеси дихання, що, у свою чергу веде до підвищення мембранного потенціалу і сповільнення дихання. Система через наявність великої кількості прямих і зворотних зв'язків є складною, тому за різних умов (різної концентрації Ca^{2+} , використання різних субстратів окиснення, вихідного значення мембранного потенціалу мітохондрій тощо) ефекти ріанодину є різними.

Дихання ізольованих мітохондрій печінки у контролі інтенсифікується внаслідок підвищення концентрації у середовищі Ca^{2+} від 0,1 до 1 мкмоль/л за використання усіх трьох субстратів окиснення. У разі окиснення пірувату й α -кетоглутарату механізм цього підвищення є зрозумілий, оскільки підвищення концентрації Ca^{2+} у матриці мітохондрій активує піруват- і α -кетоглутаратдегідрогеназні комплекси [17]. За використання сукцинату як субстрату окиснення інтенсифікація дихання внаслідок збільшення концентрації Ca^{2+} від 0,1 до 1 мкмоль/л (див. рис. 2, Б) спричинена, мабуть, залученням до окиснення ендогенних субстратів Ca^{2+} -залежних дегідрогеназ.

Тут варто згадати, що рівень мембранного потенціалу мітохондрій печінки найвищий, коли субстратом окиснення є сукцинат [26]. Оскільки рушійна сила транспорту катіонів Ca^{2+} залежить як від їхньої концентрації у середовищі, так і від мембранного потенціалу мітохондрій, то швидкість акумуляції (як і концентрація [26]) Ca^{2+} у матриксі мітохондрій за окиснення сукцинату є найвищою. За таких умов система стає дуже чутливою до ріанодину. Тому інтенсивність дихання знижується за дії ріанодину навіть за переважаючого окиснення сукцинату, але не настільки, щоб змінився мембранний потенціал мітохондрій.

Зниження мембранного потенціалу мітохондрій печінки та вмісту в них Ca^{2+} внаслідок дії ріанодину у широкому діапазоні концентрацій (від 0,05 до 1 мкмоль/л) зареєстровано лише за окиснення пірувату [26]. І оскільки ріанодин (0,05–0,1 мкмоль/л) спричиняє значне пригнічення процесів дихання за концентрації Ca^{2+} 0,1 мкмоль/л (див. рис. 3), ми можемо стверджувати, що mRyRs є важливою ланкою зв'язку між мембранним потенціалом мітохондрій і їхнім диханням. Вилучення цієї ланки спричиняє зниження ступеня цього зв'язку та переведення енергетичного рівня мітохондрій на нижчий рівень.

На жаль, немає даних про те, як змінюються під впливом ріанодину мембранний потенціал мітохондрій печінки та вміст Ca^{2+} у матриксі мітохондрій за 1 мкмоль/л Ca^{2+} в середовищі. Тому ми не знаємо, що спричиняє ріанодиніндуковану інтенсифікацію дихання за цих умов. Ми можемо лише припустити, що ріанодиніндуковане зниження мембранного потенціалу мітохондрій за 1 мкмоль/л Ca^{2+} у середовищі й окиснення пірувату настільки виражене, що запускаються інші, не спряженні з Ca^{2+} -сигналізацією, регуляторні зв'язки, спрямовані на інтенсифікацію дихання і відновлення мембранного потенціалу. Цілком можливо, що це відбувається на тлі обмеження надходження Ca^{2+} в матрикс мітохондрій і усунення їхнього негативного ефекту.

Вихідне значення мембранного потенціалу мітохондрій печінки за окиснення α -кетоглутарату є нижчим, ніж за окиснення сукцинату і пірувату [26]. Але концентрація Ca^{2+} у матриксі мітохондрій за окиснення α -кетоглутарату є трохи вищою, ніж за окиснення пірувату [26]. Тому рушійна сила транспорту катіонів Ca^{2+} теж є, очевидно, найнижчою. Достовірних змін мембранного потенціалу мітохондрій унаслідок дії ріанодину за окиснення α -кетоглутарату не зареєстровано, хоча спостерігається виражена тенденція до зниження [26]. Дихання ж мітохондрій унаслідок додавання ріанодину в полярографічну комірку, коли концентрація Ca^{2+} становить 0,1 мкмоль/л, інтенсифікується (див. рис. 4, Б). І ця інтенсифікація, зважаючи на трохи вищу чутливість α -кетоглутаратдегідрогеназного комплексу до Ca^{2+} [17], нагадує таку ж інтенсифікацію за окиснення пірувату і концентрації Ca^{2+} 1 мкмоль/л (див. рис. 3, Б). В її основі справді може лежати усунення негативного впливу катіонів Ca^{2+} у надмірній кількості на процеси дихання внаслідок інгібування mRyRs.

Отримані дані дають змогу стверджувати, що у мітохондріях гепатоцитів mRyRs є важливою ланкою регуляторного зв'язку між значенням мембранного потенціалу мітохондрій та інтенсивністю їхнього дихання за низьких (фізіологічних) значень позамітохондріальної концентрації Ca^{2+} . Коли піруват є основним субстратом окиснення, mRyRs забезпечують надходження у матрикс мітохондрій Ca^{2+} , активацію піруватдегідрогеназного комплексу й інтенсифікацію дихання, що запобігає зменшенню мембранного потенціалу мітохондрій. Якщо ж переважає окиснення α -кетоглутарату, то надходження Ca^{2+} за допомогою mRyRs, навіть за фізіологічної їхньої концентрації, призводить до пригнічення процесів дихання. За вищих концентрацій Ca^{2+} їхня акумуляція системою mRyRs негативно впливає на дихання за окиснення як пірувату, так і α -кетоглутарату.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Бабіч Л. Г., Шликов С. Г., Костерін С. О.* Транспортування іонів Са в мітохондріях гладеньких м'язів // Укр. біохім. журнал. 2014. Т. 86. Вип. 6. С. 18–30.
2. *Бабський А. М.* Влияние адреналина на окислительное фосфорилирование и обмен ионов кальция в митохондриях печени и слизистой оболочки тонкого кишечника крысы: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.13. Пущино, 1985. 20 с.
3. *Бабський А. М., Кондрашова М. Н., Шостаковская И. В.* Действие и последствие адреналина на дыхание митохондрий // Физиол. журнал. 1985. Вып. 31. С. 301–306.
4. *Бабський А. М., Стефанків Ю. С., Кондрашова М. Н.* Субстратно-гормональная система янтарная кислота – катехоламины. Новые данные // Митохондрии в патологии. Пущино: ОНТИ, 2001. С. 14–21.
5. *Захарченко М. В., Кондрашова М. Н., Хундерякова Н. В.* Важность сохранения биофизической организации изолированных митохондрий для выявления физиологической регуляции их функций // Биофизика. 2011. Вип. 56. С. 840–847.
6. *Костерин С. А., Браткова Н. Ф., Бабич Л. Г.* и др. Влияние ингибиторов энергозависимых Ca^{2+} -транспортирующих систем на кальциевые насосы гладкомышечной клетки // Укр. біохім. журнал. 1996. Т. 68. Вип. 6. С. 50–61.
7. *Кравенська Є. В.* Неспецифічна проникність внутрішньої мембрани мітохондрій та її модифікація катіонами металів: автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.13. Львів, 2010. 20 с.
8. *Манько В. В.* Системи транспортування Ca^{2+} у секреторних клітинах екзокринних залоз: монографія. Львів: ЛНУ Івана Франка, 2011. 271 с.
9. *Мерлавський В. М., Іккерт О. В., Манько В. В.* Вплив Ca^{2+} на процеси дихання гепатоцитів за умов стрептозотоциніндукованого цукрового діабету // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2015. Вип. 70. С. 294–304.
10. *Наливайко Н. В., Вовканич Л. С., Дубицький Л. О.* Порівняльний аналіз механізмів взаємодії катіонів двовалентних металів з $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ і $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -обмінниками мітохондрій печінки // Вісн. Харк. нац. ун-ту. Біофіз. вісн. 2006. Вип. 17. С. 48–53.
11. *Слинченко Н. Н., Браткова Н. Ф., Костерин С. А.* и др. Влияние эозина Y на каталитическую и функциональную активность Mg^{2+} , АТФ-зависимого кальциевого насоса плазматической мембраны гладкомышечных клеток // Биохимия. 1998. Т. 63. Вып. 6. С. 812–819.
12. *Altschaf B. A., Beutner G., Sharma V. K.* et al. The mitochondrial ryanodine receptor in rat heart: A pharmaco-kinetic profile // Biochim. Biophys. Acta. 2007. Vol. 1768. N 7. P. 1784–1795.
13. *Aperia A., Akkuratov E. E., Fontana J. M., Brismar H.* Na^+/K^+ -ATPase, a new class of plasma membrane receptors // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2016. Vol. 310. N. 7. P. 491–495.
14. *Beutner G., Sharma V. K., Lin L.* et al. Type 1 ryanodine receptor in cardiac mitochondria: transducer of excitation-metabolism coupling // Biochim. Biophys. Acta. 2005. Vol. 1717. N 1. P. 1–10.
15. *Beutner G., Sharma V., Giovannucci D.* et al. Identification of a ryanodine receptor in rat heart mitochondria // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276. N 24. P. 21482–21488.
16. *Chance B., Williams G.* Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. The steady state // J. Biol. Chem. 1955. Vol. 217. P. 409–427.
17. *Denton R. M.* Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions // Biochim. Biophys. Acta. 2009. Vol. 1787. N 11. P. 1309–1316.
18. *Fiske C. H., SubbaRow Y.* The colorimetric determination of phosphorus // J. Biol. Chem. 1925. N 66. P. 375–400.

19. *Gunter T. E., Pfeiffer D. R.* Mechanisms by which mitochondria transport calcium // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 1990. Vol. 258. N 5. P. 755–786.
20. *Gunter T. E., Sheu S. S.* Characteristics and possible functions of mitochondrial Ca^{2+} transport mechanisms // *Biochim. Biophys. Acta.* 2009. Vol. 1787. N 11. P. 1291–1308.
21. *Gunter T. E., Sheu S. S.* Characteristics and possible functions of mitochondrial Ca^{2+} transport mechanisms // *Biochim. Biophys. Acta.* 2009. Vol. 1787. P. 1291–1308.
22. *Gunter T. E., Yule D. I., Gunter K. K.* et al. Calcium and mitochondria // *FEBS Letters.* 2004. Vol. 567. N 1. P. 96–102.
23. *Hoppe U. C.* Mitochondrial calcium channels // *FEBS Lett.* 2010. Vol. 584. N 10. P. 1975–1981.
24. *Jakob R., Beutner G., Sharma V.* et al. Molecular and functional identification of a mitochondrial ryanodine receptor in neurons // *Neuroscience Lett.* 2014. Vol. 575. P. 7–12.
25. *Jonson D., Lardy H.* *Methods in Enzymology.* New York. 1967. Vol. 10. P. 94–102.
26. *Kupynyak N. I., Ikkert O. V., Shlykov S. G.* et al. Mitochondrial ryanodine-sensitive Ca^{2+} channels of rat liver // *Cell Biochem. Funct.* 2017. Vol. 35. N 1. P. 42–49.
27. *Lowry O., Rosebrough N., Farr A.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* 1951. Vol. 193, N 1. P. 265–275.
28. *Panov A. V., Scaduto R. C.* Influence of calcium on NADH and succinate oxidation by rat heart submitochondrial particles // *Arch. Biochem. Biophys.* 1995. Vol. 316 N 2. P. 815–820.
29. *Pierebon N., Renard-Rooney D. C., Gaspers L. D.* Ryanodine receptors in liver // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 45. P. 34086–34095.
30. *Reynolds E. S.* The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy // *J. Cell Biol.* 1963. Vol. 17. P. 208–212.
31. *Rizzuto R., Bastianutto C., Brini M.* et al. Mitochondrial Ca^{2+} homeostasis in intact cells // *J. Cell Biol.* 1994. Vol. 126. P. 1183–1194.
32. *Rizzuto R., Marchi S., Bonora M.* et al. Ca^{2+} transfer from the ER to mitochondria: when, how and why // *Biochim. Biophys. Acta.* 2009. Vol. 1787. N 11. P. 1342–1351.
33. *Sparagna G. C., Gunter K.K., Sheu S.S., Gunter T.E.* Mitochondrial calcium uptake from physiological-type pulses of calcium. A description of the rapid uptake mode // *J. Biol. Chem.* 1995. Vol. 270. N 46. P. 27510–27515.
34. *Thastrup O., Cullen P. J., Dröbak B. K.* et al. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990. Vol. 87. P. 2466–2470.
35. *Xu Z., Zhang D., He X.* et al. Transport of calcium ions into mitochondria // *Curr Genomics.* 2016. Vol. 17. N 3. P. 215–219.

Стаття: надійшла до редакції 18.09.17

доопрацьована 28.09.17

прийнята до друку 04.10.17

**THE ROLE OF RYANODINE-SENSITIVE Ca^{2+} CHANNELS IN REGULATION
RESPIRATION MITOCHONDRIA OF THE LIVER OF RATS**

N. Kupyntyak^{1,2}, O. Ikkert¹, V. Manko¹

¹*Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskyyi St., Lviv 79005, Ukraine*

²*Danylo Halytsky Lviv National Medical University
69, Pekarska St., Lviv 79000, Ukraine*

e-mail: nadiya.kupyntyak@gmail.com

The role of mRyRs in regulation of rats hepatocytes mitochondrial respiration has been investigated at different submitochondrial concentrations of Ca^{2+} and by oxidation of succinate, pyruvate and α -ketoglutarate. Isolated mitochondria were obtained by differential centrifugation method. The intactness of the received mitochondria was determined by electron microscopy method. As an indicator of the absence of plasma membrane residues and endoplasmic reticulum membranes, the ATPase activity of the mitochondria suspension has been defined based on changes in the content of inorganic phosphate in the medium after the incubation of mitochondria with eosin Y, oubain and tapsigargin. The rate of respiration has been determined by polarographic method with Clark's electrode using. To identify the role of mRyRs in mitochondrial respiration regulation, the mitochondria suspension was preincubated with ryanodine at a concentration of 0.05 $\mu\text{mol/l}$ or ryanodine was introduced at a concentration of 0.1 $\mu\text{mol/l}$ directly into a polarographic chamber. Decreasing of mitochondrial oxygen consumption has been specified after the preincubation of the mitochondria suspension with ryanodine for 5 and 10 minutes by the succinate oxidation. Due to the direct application of ryanodine to mitochondria in a polarographic chamber with a Ca^{2+} concentration in the medium of 0.1 and 1 $\mu\text{mol/l}$ by succinate oxidation, the rate of oxygen consumption decreased in the states S_4 , S_3 and S_4^{ATP} . The preincubation of mitochondria with ryanodine by pyruvate oxidation, caused a decreasing of oxygen consumption, as after the direct addition of ryanodine to a polarographic chamber with a concentration of Ca^{2+} in a medium of 0.1 $\mu\text{mol/l}$. At the concentration of Ca^{2+} in the medium of 1 $\mu\text{mol/l}$ increasing of oxygen consumption has been detected under the influence of ryanodine in the states S_4 , S_3 by 12.2 and 17.2 % respectively. The mitochondrial oxygen consumption by the α -ketoglutarate oxidation after the addition of ryanodine to a polarographic chamber with a concentration of Ca^{2+} 0.1 $\mu\text{mol/l}$ in the medium has increased in the state S_4 and S_3 , while in the respiratory medium with a concentration of Ca^{2+} 1 $\mu\text{mol/l}$ has increased in the state S_4 by 19.1 % and decreased by 14.6 % in state S_4^{ATP} . Data analysis suggests that mRyRs in the hepatocytes mitochondria is an important link in the adaptive regulatory bond between the value of membrane potential of mitochondria and the intensity of their respiration at low values of the non-mitochondrial Ca^{2+} concentration and pyruvate oxidation. If the oxidation of α -ketoglutarate predominates, or the sub-mitochondrial concentration of Ca^{2+} is high, its mRyRs yields inhibition of respiration.

Keywords: ryanodine, mRyRs, mitochondrial respiration, oxidation substrates, hepatocytes

ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН

УДК 581.522.5+630*18

**ВПЛИВ ВИКИДІВ КОКСОХІМІЧНОГО ВИРОБНИЦТВА
НА ДИНАМІКУ ВМІСТУ РОЗЧИННИХ ВУГЛЕВОДІВ
У ОДНОРІЧНИХ ПАГОНАХ ДЕРЕВНИХ РОСЛИН**

Т. Юсипіва

*Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара
просп. Гагаріна, 72, Дніпро 49010, Україна
e-mail: JusyryivaTatjana@i.ua*

Досліджено дію полікомпонентного забруднення середовища (NO_x , CO , SO_2 , H_2S , NH_3 , феноли, завислі частки) на динаміку розчинних вуглеводів у однорічних пагонах *Salix alba* L. та *Robinia pseudoacacia* L. за умов Придніпровського регіону. З'ясовано, що за умов хронічного впливу на рослини промислових викидів коксохімічного виробництва динаміка вмісту розчинних вуглеводів у однорічних пагонах досліджених об'єктів не відрізняється від контрольних рослин. Виявлено, що техногенні умови зростання спричиняють кількісні зміни у накопиченні суми цукрів у пагонах. Показано, що у обох деревних порід за дії полікомпонентного забруднення середовища концентрація моносахаридів і сахарози значно зменшується, але більшою мірою – у *S. alba*. Запропоновано використовувати показники вуглеводного обміну як інформативні тест-параметри у моніторингових дослідженнях полікомпонентного забруднення середовища NO_x , CO , SO_2 , H_2S , NH_3 , фенолами і завислими частками (тест-об'єкт *S. alba*).

Ключові слова: викиди коксохімічного виробництва, сума цукрів, відновлювальні цукри, сахароза, однорічні пагони, *Salix alba* L., *Robinia pseudoacacia* L.

Зелені зони міст надійно захищають їх від забруднення повітря, тому і мають назву «легені міста». Під час вегетаційного сезону рослинність збагачує повітря киснем і поглинає вуглекислий газ. Над найбільшими зеленими масивами в межах міста влітку формуються низхідні течії повітря, які транспортують пил із атмосфери та осаджують його на кронах дерев і чагарників [20]. Однак останніми роками в містах України відбувається скорочення площ парків, скверів, лісів рекреаційного значення та ін. [10, 16, 18], внаслідок чого забезпеченість населення міст зеленими насадженнями загального користування знижується. Крім того, деревні рослини страждають від антропогенних факторів середовища.

Значну негативну дію на рослинність лісів і парків має також автотранспорт. Для збереження рослин від подібних стресів необхідно включати в асортимент озеленення види, стійкі до екстремальних умов міського середовища [15], оскільки за відносно високими кількісними характеристиками озеленення часто втрачаються його якість і естетика. Для оцінювання стану деревних рослин у техногенних умовах зростання необхідна рання діагностика порушень їхньої життєдіяльності, інформацію для якої можуть дати фізіолого-біохімічні дослідження [12, 20].

Важлива роль у метаболізмі рослин належить вуглеводному обміну. Вуглеводи – продукти фотосинтетичного запасання енергії та подальших ферментативних перетворень [13, 19]. Ці сполуки чутливі до несприятливих чинників довкілля: посухи, високих і низьких

температур та ін., властивих степовому Придніпров'ю [9]. Однією з головних функцій розчинних вуглеводів, які нагромаджуються під час стресів, є їхня антиденатураційна дія на білково-ліпідні компоненти клітини [11, 12].

Морозо- та посухостійкість дерев також значною мірою залежать від динаміки розчинних вуглеводів у тканинах пагонів. Порушення фотосинтетичної й дихальної функцій рослини, що зростає в умовах забрудненої атмосфери, незмінно позначається на кількісному вмісті та співвідношенні різних форм вуглеводів [4, 7]. Тому показник обміну цукрів є хорошим індикатором забруднення місцевості [3]. Проте особливості динаміки моно- й олігосахаридів в однорічних пагонах деревних порід у степовому Придніпров'ї практично не досліджені як в умовно чистих зонах, так і на забруднених територіях.

Мета нашої роботи – проаналізувати вплив промислового забруднення викидами коксохімічного виробництва на динаміку вмісту розчинних вуглеводів у однорічних пагонах деревних рослин в умовах Придніпровського регіону.

Матеріали та методи

Збір матеріалу проводили у період з вересня 2011 р. по березень 2012 р. на двох пробних ділянках. Забруднена зона розміщена у лісовому фітоценозі, що прилягає до ПАТ «Свраз Дніпровський металургійний завод» (ВАТ «Дніпрококс») м. Дніпра. Частка основних забруднювальних речовин у загальному обсязі викидів підприємства у 2011 р. становила: NO_x – 39,5, CO – 30,6, SO_2 – 13,6, тверді речовини – 7,9 %, решта – інші сполуки (H_2S , NH_3 , феноли) [8]. Контрольна (умовно чиста) зона розташована на території Ботанічного саду Дніпровського національного університету ім. Олеся Гончара, де концентрації забруднювачів не перевищували гранично допустимих концентрацій [22]. Лісорослинні умови, характеристики деревостану, структура та склад насаджень у моніторинговій точці й у контрольній зоні були подібними.

Об'єктами дослідження стали аборигенний вид деревних рослин верба біла *Salix alba* L. (родина *Salicaceae* Lindl.) та деревний інтродуцент робінія псевдоакація *Robinia pseudoacacia* L. (родина *Fabaceae* Lindl.). Обидві деревні породи широко застосовуються в озелененні міст і є відносно стійкими до урбанізованого середовища [6, 14].

На кожній із моніторингових ділянок однорічні пагони відбирали з кількох модельних дерев одного вікового стану з гілок середнього ярусу південно-східного боку крони п'ятого порядку галуження. Вміст розчинних вуглеводів визначали за методикою Х.Г. Починка [21] на різних стадіях онтогенезу пагонів: фізіологічного спокою, вимушеного спокою, виходу зі спокою та підготовки до відновлення вегетації. Повторність дослідів була трикратною. Результати дослідження обробляли за допомогою багатофункціонального пакету прикладних програм «STATGRAFICS». Розраховували середню арифметичну похибку. Для порівняння біохімічних показників контрольних і дослідних варіантів використовували Student's t-test ($p \leq 0,05$).

Результати і їхнє обговорення

Як видно з рис. 1–2, серед двох досліджених нами деревних порід в умовах чистої зони вміст суми цукрів у однорічних пагонах рослин протягом вересня–січня вищий у виду *R. pseudoacacia*, ніж у *S. alba*. Починаючи з лютого, концентрація розчинних вуглеводів у пагонах останнього виду зростає і в березні сягає рівня цих сполук у пагонах *R. pseudoacacia*.

У контрольних рослин обох видів вміст суми моно- й олігосахаридів наприкінці вегетації та на початку фази фізіологічного спокою рослин (вересень–листопад) поступово знижується, а потім збільшується до січня місяця. Протягом стадії вимушеного спокою сума цукрів зростає і сягає максимального значення у березні, під час виходу рослин зі спокою та

підготовки до відновлення вегетації. Така динаміка рівня розчинних вуглеводів збігається з фізіологічними реакціями рослин: у найхолодніші періоди року відбувається гідроліз крохмалю з утворенням із нього фракцій моно- й олігосахаридів. Справді, за літературними даними, розщеплення крохмалю здійснюється або до відновлювальних цукрів, або до сахарози [2], які сприяють підвищенню кріопротекторних властивостей цитоплазми.

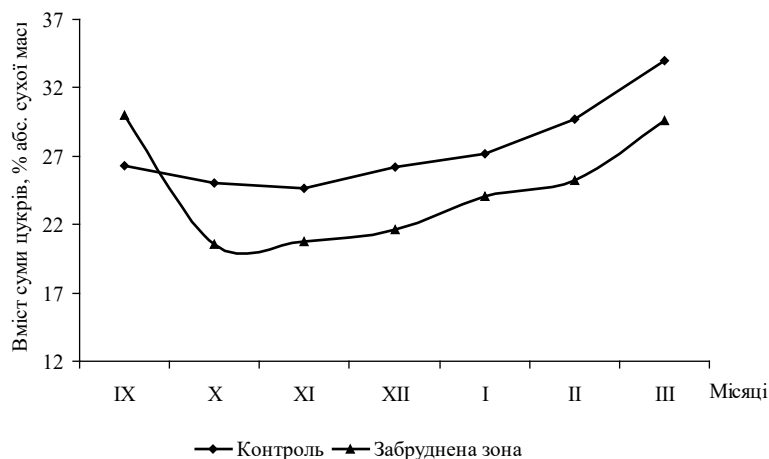


Рис. 1. Вміст суми цукрів у однорічних пагонах *Robinia pseudoacacia* за дії викидів коксохімічного виробництва, % абсолютно сухої маси

За техногенних умов зростання динаміка суми цукрів не відрізняється від контрольних рослин. За дії забруднювачів змінюється лише вміст розчинних вуглеводів, зменшуючись в обох об'єктах дослідження, але більшою мірою – у *S. alba*. Так, за умов техногенезу концентрація розчинних вуглеводів в однорічних пагонах *R. pseudoacacia* у вересні перевищує контрольне значення на 14,1 %, у жовтні знижується на 17,9 %, а потім залишається приблизно на однаковому рівні протягом усього періоду досліджень і становить 82,1–88,5 % до контролю залежно від дати відбору проб (рис. 1).

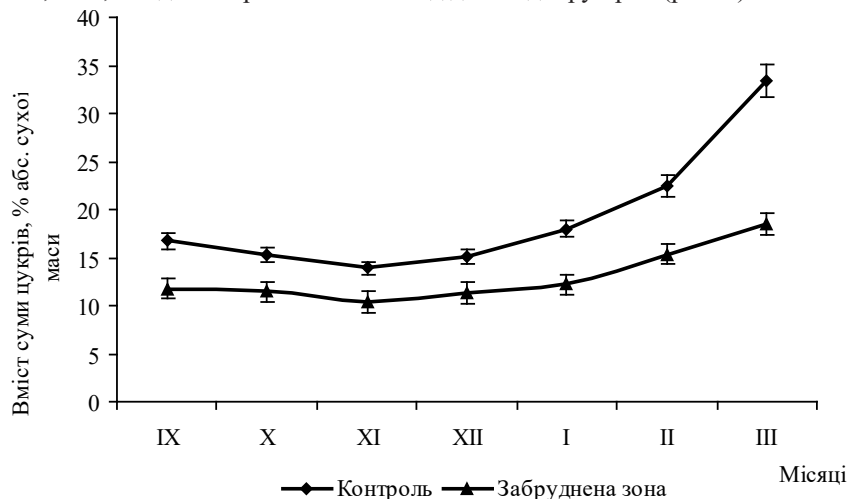


Рис. 2. Вміст суми цукрів у однорічних пагонах *Salix alba* за дії викидів коксохімічного виробництва, % абсолютно сухої маси

У пагонах *S. alba* величини сумарного вмісту цукрів упродовж усіх досліджених фенофаз розвитку пагонів значно нижчі від контрольних порівняно з видом *R. pseudoacacia* (рис. 2). Найсуттєвішою різниця у значеннях цього показника в рослин умовно чистої та забрудненої зон є наприкінці зимового періоду і навесні. Так, у березні вміст розчинних вуглеводів у однорічних пагонах рослин *S. alba*, які наражаються на хронічну дію комплексу забруднювальних речовин NO_x , CO , SO_2 , H_2S , NH_3 , фенолів і завислих часток, майже удвічі менший, ніж у рослин Ботанічного саду ДНУ (на 44,5 %). Таке значне зниження суми цукрів за умов техногенезу може негативно впливати на зимостійкість однорічних пагонів рослин, що може спричинити зниження їхньої стійкості до інших несприятливих факторів довкілля, у тому числі й до дії промислових фітотоксикантів.

Слід зазначити, що в літературі трапляються роботи з вивчення впливу аерогенного забруднення довкілля на вміст розчинних вуглеводів у стеблах декоративних деревних і чагарникових рослин на різних стадіях онтогенезу [1, 5, 24]. Так, В.П. Бессонова, О.В. Дубова (1995) відзначають менший рівень накопичення всіх форм розчинних цукрів (окрім фруктози) в однорічних пагонах троянд в умовах техногенних емісій металургійного виробництва м. Запоріжжя. Авторами показано: що вищий ступінь забруднення середовища, то значніше відхилення від норми [1].

В.С. Більчук, Л.В. Шупрановою (2005) за умов хронічного впливу на рослини роду *Acer* L. забруднювальних речовин ВАТ «Дніпрококс» м. Дніпропетровська виявлено зменшення сумарного вмісту цукрів порівняно з контролем, що автори пов'язують із меншою концентрацією крохмалю в тканинах кленів і затримкою його гідролізу в осінньо-зимовий період [5]. Т.І. Юсупівою, Ю.В. Коваль (2011) показано суттєве зниження вмісту розчинних цукрів у пагонах рослин *Tilia europaea* L. і *T. platyphyllos* Scop., які зростають на території зеленої зони навколо коксохімічного заводу м. Дніпра, порівняно з контрольними рослинами на всіх досліджених фенофазах розвитку пагонів [24].

Сахароза – одна із найважливіших сполук рослинної клітини. Цей вуглевод не лише накопичується у тканинах пагона протягом стадії закінчення вегетації та переходу рослин у стан фізіологічного спокою, але й утворюється в пагонах у результаті гідролізу крохмалю в холодну пору року. Сахароза, з одного боку, є транспортною формою вуглеводів, важливим субстратом дихання клітин, з іншого – забезпечує кріопротекторні властивості цитоплазми [12, 17].

Аналіз табл. 1 свідчить, що за умов росту в чистій зоні верба біла характеризується менш значним накопиченням сахарози у тканинах однорічних пагонів, ніж робінія псевдоакація. Слід також відзначити, що динаміка запасання дисахариду в пагонах протягом осінньо-зимового періоду в умовах Ботанічного саду ДНУ для *R. pseudoacacia* та *S. alba* відрізняється. Так, у *R. pseudoacacia* вміст сахарози в тканинах у жовтні трохи знижується порівняно з вересневим значенням цього показника, а потім, на початку фази фізіологічного спокою рослин, поступово починає зростати, особливо на стадії вимушеного спокою, і сягає максимального значення у березні.

У пагонах *S. alba* має місце більш значне зниження концентрації дисахариду (на 14,8 %) протягом осені (фаза глибокого спокою), а взимку, під час фази вимушеного спокою, спостерігається стрімке підвищення рівня вуглеводу, яке може бути пов'язане з інтенсивним гідролізом крохмалю у тканинах. При цьому вже у січні кількість дисахариду зростає на 6,9 % порівняно з вересневим значенням показника, в лютому – на 32,8 %, у березні – майже удвічі – на 98,3 %.

За умов хронічної дії на рослини полікомпонентного забруднення сполуками NO_x , CO , SO_2 , H_2S , NH_3 , фенолами й завислими частками динаміка накопичення сахарози в од-

норічних пагонах *R. pseudoacacia* та *S. alba* загалом повторює динаміку концентрації цього вуглеводу в стеблах рослин із умовно чистої зони (табл. 1). Відмінністю є суттєвіше, порівняно з контролем, підвищення вмісту дисахариду в пагонах робінії псевдоакації протягом січня–березня. Темпи зростання концентрації сахарози в пагонах *S. alba* із забрудненої зони наприкінці періоду досліджень відстають від контрольних екземплярів верби білої.

Таблиця 1

Вплив викидів коксохімічного виробництва на динаміку вмісту сахарози в однорічних пагонах деревних рослин (% абсолютно сухої маси; $M \pm m$; $n=3$)

Місяць відбору проб	Контроль	Величина показника щодо вересневого значення, %	Забруднена зона	Величина показника щодо вересневого значення, %	% від контролю
<i>Robinia pseudoacacia</i>					
Вересень	11,27±0,01		9,24±0,04		82,0
Жовтень	10,74±0,02	95,3	8,77±0,06	94,9	81,7
Листопад	11,00±0,04	97,6	9,02±0,07	97,6	82,0
Грудень	11,77±0,01	104,4	10,07±0,01	109,0	85,6
Січень	12,09±0,02	107,3	11,43±0,01	123,7	94,5
Лютий	13,42±0,01	119,1	12,01±0,02	130,0	89,5
Березень	15,24±0,02	135,2	14,12±0,03	152,8	92,7
<i>Salix alba</i>					
Вересень	7,43±0,08		4,54±0,04		61,1
Жовтень	7,02±0,03	94,5	4,43±0,05	97,6	63,1
Листопад	6,33±0,02	85,2	3,92±0,09	86,3	61,9
Грудень	6,91±0,01	93,0	4,24±0,01	93,4	61,4
Січень	7,94±0,09	106,9	4,97±0,02	109,5	62,6
Лютий	9,87±0,05	132,8	6,03±0,04	132,8	61,1
Березень	14,73±0,06	198,3	7,37±0,07	162,3	50,0

В умовах дії на рослини інгредієнтів промислових викидів ПАТ «Євраз Дніпровський металургійний завод» концентрація сахарози в пагонах обох досліджених видів дерев зменшується порівняно з контрольними рослинами (табл. 1). Вміст дисахариду у *R. pseudoacacia* знижується на 5,5–18,3 % щодо контрольних величин залежно від дати відбору проб (найбільшою мірою у фазі фізіологічного спокою пагонів).

Протягом усього періоду досліджень концентрація сахарози суттєвіше зменшується у пагонах *S. alba*: на 36,9–50,0 % порівняно з контрольними рослинами (табл. 1). Зважаючи на важливу роль сахарози у підтриманні належного рівня дихання клітин, а також участь цього вуглеводу в механізмах стійкості протопласту до дії негативних температур (а березень 2012 року відзначався значними низькими температурами), таке падіння кількості дисахариду в стеблах дослідних рослин, порівняно з контролем, на нашу думку, може негативно позначитися на газо- та морозостійкості пагонів *S. alba* в умовах проммайданчика.

За дії техногенного забруднення відзначається менший рівень накопичення дисахариду у тканинах обох видів дерев, що може бути пов'язане з меншим вмістом в пагонах крохмалю або (та) з гальмуванням його гідролізу під впливом промислових емісій. Як вже зазначалося вище, причиною такого явища деякі автори вважають зниження активності гідролітичних ферментів в умовах антропогенного тиску [2].

На зниження вмісту олігосахаридів у тканинах однорічних пагонів видів роду *Acer*, що зростають у зеленій зоні навколо коксохімічного заводу, вказують В.С. Більчук, Л.В. Шупранова (2005). Автори виявили зменшення концентрації сахарози, порівняно з контролем, яке корелює зі зниженим вмістом крохмалю в корі й деревині кленів [5].

Відновлювальні цукри (глюкоза та фруктоза) – основні субстрати гліколізу та пентозо-фосфатного шляху розщеплення вуглеводів. Моносахариди є важливими кріопротекторними сполуками клітини, оскільки під час морозного періоду року зв'язують воду, чим запобігають її кристалізації в цитоплазмі. Деякі автори відзначають також захисну роль моноцукрів у стійкості рослин до негативної дії промислових викидів [7, 23].

Аналіз табл. 2 свідчить про те, що вивчені нами види деревних порід мають вищий вміст відновлювальних цукрів, ніж сахарози у тканинах однорічних пагонів. Також слід відзначити, що за умов чистої зони в динаміці моносахаридів у пагонах верби білої та робінії псевдоакації можна простежити подібні зміни концентрацій, як і для сахарози.

Таблиця 2

Вплив викидів коксохімічного виробництва на динаміку вмісту відновлювальних цукрів у однорічних пагонах деревних рослин (% абсолютно сухої маси; $M \pm m$; $n=3$)

Місяць відбору проб	Контроль	Величина показника щодо вересневого значення, %	Забруднена зона	Величина показника щодо вересневого значення, %	% від контролю
<i>Robinia pseudoacacia</i>					
Вересень	14,81±0,08		12,72±0,04		85,9
Жовтень	14,07±0,02	95,0	11,94±0,06	93,8	84,9
Листопад	13,57±0,02	91,6	10,79±0,03	84,8	79,5
Грудень	14,32±0,04	96,7	11,57±0,07	91,0	80,8
Січень	15,02±0,03	101,4	12,24±0,01	96,2	81,5
Лютий	16,27±0,08	109,9	13,14±0,03	103,3	80,8
Березень	18,31±0,03	123,6	15,37±0,01	120,8	83,9
<i>Salix alba</i>					
Вересень	9,27±0,02		7,15±0,06		77,1
Жовтень	8,33±0,02	94,5	6,02±0,02	97,6	72,3
Листопад	7,47±0,03	80,6	6,49±0,03	90,8	86,9
Грудень	8,11±0,02	87,5	6,97±0,02	93,4	85,9
Січень	10,06±0,05	108,5	7,22±0,04	97,5	71,8
Лютий	12,57±0,09	135,6	9,30±0,02	130,1	74,0
Березень	18,47±0,04	199,3	11,16±0,07	156,1	60,4

На території промайданчика спостерігається така ж динаміка вмісту відновлювальних цукрів у пагонах, як і у рослин Ботанічного саду ДНУ (табл. 2). Однак у умовах техногенезу у тканинах стебла *R. pseudoacacia* та *S. alba* має місце суттєве зниження сумарного вмісту глюкози і фруктози, порівняно з рослинами умовно чистої зони. У пагонах *R. pseudoacacia* відмінності між вмістом відновлювальних цукрів у контрольних і дослідних рослин трохи більші, ніж вміст дисахариду (14,4–30,5 % залежно від дати відбору проб). Слід відзначити, що на початку фази фізіологічного спокою рослин у тканинах пагонів цього виду, порівняно з контролем, менше знижувався вміст моноцукрів, а в інші фази – вміст сахарози (табл. 1–2).

Що стосується *S. alba*, то вміст моносахаридів у рослин промислової зони знижується щодо контрольного меншою мірою, ніж вміст сахарози, що можна пояснити показаним нами істотнішим зменшенням у пагонах цього виду суми цукрів (рис. 1). Подібно, як виявлено в динаміці сахарози, у пагонах рослин цього виду має місце істотніше зниження вмісту суми глюкози і фруктози у березні, під час виходу рослин із фази вимушеного спокою та переходу їх до фази відновлення вегетації. Так, концентрація моносахаридів у пагонах верби білої протягом усього періоду досліджень коливається в межах 71,8–86,9 %, а в березні становить 60,4 % від контролю, а вміст сахарози у ці ж терміни становить 61,1–63,1 та 50,0 % відповідно.

На зміни в динаміці вмісту відновлювальних цукрів у однорічних пагонах *Rosa canina* L. та сортових троянд під дією викидів металургійного виробництва вказують В. П. Бессонова й О. В. Дубова (1995). Вони відзначають зниження накопичення глюкози та зростання фруктози у пагонах дослідних рослин порівняно з контролем. Вчені також підкреслюють, що ступінь пригнічення накопичення редуруючих цукрів корелює з рівнем забруднення середовища: що вищий ступінь забруднення середовища, то значніше відхилення від норми [1].

Отже, дослідження впливу полікомпонентного забруднення довкілля токсичними газами, органічними сполуками і завислими частками на динаміку вмісту розчинних вуглеводів в однорічних пагонах *R. pseudoacacia* та *S. alba* показало, що інгредієнти промислових викидів спричиняють зниження вмісту відновлювальних цукрів, сахарози й суми цукрів у тканинах стебла, причому найзначніше – у рослин верби білої. Висока чутливість показників вуглеводного обміну до забруднювальних речовин коксохімічного виробництва дає можливість використовувати їх у моніторингових дослідженнях як тест-параметри забруднення навколишнього середовища токсичними газами NO_x , CO , SO_2 , H_2S , NH_3 , фенолами і завислими частками (тест-об'єкт *S. alba*).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Бессонова В. П., Дубова О. В. Зміни вмісту вуглеводів у пагонах троянд в умовах забруднення навколишнього середовища // Укр. ботан. журнал. 1995. Т. 52. № 1. С. 97–103.
2. Бессонова В. П., Юсупіва Т. І. Вплив SO_2 і важких металів на метаболізм неструктурних вуглеводів в коренях сіянів деревних рослин // Укр. ботан. журнал. 1998. Т. 55. № 4. С. 389–397.
3. Бессонова В. П. Оцінка функціонального стану деревних рослин урбанофітоценозу за змінами вуглеводного обміну // Рослини та урбанізація: матеріали II Міжнар. наук.-практ. конф. Дніпропетровськ, 2011. С. 48–52.
4. Бессонова В. П., Юсупіва Т. І. Динаміка неструктурних вуглеводів у листках самосіву деревних рослин в умовах промислових емісій SO_2 та NO_2 // Питання біоіндикації та екології. Запоріжжя: ЗДУ, 2006. Вип. 11. № 2. С. 70–77.
5. Більчук В. С., Шупранова Л. В. Особливості накопичення неструктурних вуглеводів у пагонах різних видів роду *Acer* в умовах коксохімічного виробництва // Вісн. Дніпропетр. ун-ту. Біологія. Екологія. 2005. Вип. 2. Т. 4. С. 19–24.
6. Волошин П. Л. Акація біла в культурах на Правобережній частині Центрального степу // Лісовий журнал. 1994. № 5. С. 21.
7. Грицай З. В., Юсупіва Т. І. Вплив промислових викидів коксохімічного підприємства на вміст вуглеводів та жирів у листках деревних рослин // Питання біоіндикації та екології. 2004. Вип. 9. № 2. С. 97–107.
8. Екологічний паспорт Дніпропетровської області (2011 р.) // <http://www.menr.gov.ua>
9. Зайцева І. О., Долгова Л. Г. Фізіолого-біохімічні основи інтродукції деревних рослин у степовому Придніпров'ї. Дніпропетровськ: Вид-во ДНУ, 2010. 388 с.
10. Іванченко О. С., Бессонова В. П. Аналіз дендрофлори Молодіжного парку м. Дніпропетровськ // Біологія та екологія. 2015. Т. 1. № 1. С. 20–31.
11. Колупаєв Ю. Є. Стресові реакції рослин (молекулярно-клітинний рівень). Х., 2001. 173 с.
12. Косаківська І. В. Фізіолого-біохімічні основи адаптації рослин до стресів. К.: Сталь, 2003. 192 с.

13. *Кретович В. Л.* Биохимия растений. М.: Высшая школа, 1980. 445 с.
14. *Кулагин А. Ю.* Ивы: техногенез и проблемы оптимизации нарушенных ландшафтов. Уфа: Гилем, 1998. 193 с.
15. *Кучерявий В. П.* Озеленення населених місць. Львів: Світ, 2008. 455 с.
16. Місто Дніпропетровськ: внесення змін до генерального плану розвитку міста. К., 2015. 62 с.
17. *Мусієнко М. М.* Екологія рослин: підручник. К.: Либідь, 2006. 432 с.
18. *Назарук М., Жук Ю.* Зелені зони малих та середніх міст Львівської області: сучасний стан та проблеми функціонування // Фізична географія та геоморфологія. 2013. Вип. 1(69). С. 54–62.
19. *Ніколайчук В. І., Белчгазі В. Й.* Фізіологія і біохімія рослин. Ужгород: Вид-во Ужгород. ун-ту, 2005. 192 с.
20. *Поляков А. К., Малюгин И. Е., Тарабрин В. П., Королев В. В.* Древесные насаждения в оптимизации техногенной и рекреационной среды. К.: Наук. думка, 1992. 171 с.
21. *Починок Х. Н.* Визначення глюкози, фруктози та сахарози в рослинах з однієї наважки / Цит. за: *Бессонова В. П.* Методи фітоіндикації в оцінці екологічного стану довкілля: навч. посіб. з великого практикуму. Ч. І. Запоріжжя: ЗДУ, 2001. 196 с.
22. Экологический паспорт города Днепропетровска / общ. ред. В.А. Павлов; Управление по экологии Днепропетровского горсовета. Днепропетровск: УкО ИМА-пресс, 2000. 111 с.
23. *Чернікова О. В.* Вплив промислового забруднення на вміст цукрів у листках рослин роду *Spiraea* L. // Наук. вісн. Чернівець. ун-ту. Сер. біол. 2008. Вип. 416. С. 65–68.
24. *Юсупіва Т. І., Коваль Ю. П.* Співвідношення різних форм неструктурних вуглеводів у пагонах лип (*Tilia* L.) в умовах техногенезу // Ключові вприси в сьвременната наука: Матеріали за 8-а Междунар. науч. практ. конф. 2012. Т. 28. Биологии. Селско стопанство. София: «Бял ГРАД-БГ» ООД, 2012. С. 3–7.

Стаття: надійшла до редакції 02.02.17

доопрацьована 25.04.17

прийнята до друку 11.05.17

THE INFLUENCE OF COCK AND BY-PRODUCT INDUSTRIAL ENTERPRISE EMISSIONS ON THE DYNAMICS OF SOLUBLE CARBOHYDRATE CONTENT IN ANNUAL WOODY PLANTS SHOOTS

T. Iusypiva

*Oles' Honchar Dnipro National University
72, Gagarin Ave., Dnipro 49010, Ukraine
e-mail: JusypivaTatjana@i.ua*

The paper studies the multicomponent environment pollution (NO_x , CO, SO_2 , H_2S , NH_3 , phenol, solids) on the dynamics of soluble carbons in in annual shoots of woody plants in Prydniprovyia region. The research objects were selected in the period from September 2011 to March 2012 for two test areas: contaminated area, which is located in the forest area around JSC "Evraz Dnipro Metallurgical Plant", the city of Dnipro and reference, or relatively clean area, located at the Botanical Garden of Oles' Honchar Dnipro National University, where concentrations of pollutants do not exceed the maximum permissible levels.

The objects of study were a native species of woody plants of white willow *Salix alba* L. (family *Salicaceae* Lindl.) and a woody invasive species of *Robinia pseudoacacia* L. (family *Fabaceae* Lindl.). The content of soluble carbohydrates was measured in various stages of ontogeny of the shoots: physiological dormancy, induced dormancy, exiting from the state of dormancy and preparing to vegetation. The effect of integrated pollution NO_x , CO , SO_2 , H_2S , NH_3 , phenols and suspended particles on the dynamics of soluble carbohydrate content in annual shoots of *R. pseudoacacia* and *S. alba* during autumn-winter period in Dnipro region was examined. The research found, that when exposed to chronic effects industrial emissions of coke production on plants *R. pseudoacacia* and *S. alba*, the dynamics of soluble carbohydrate content in annual shoots of investigated objects is similar to the reference values. It was ascertained, that technology-related conditions only cause quantitative changes in the level of accumulation of sugar amount in the studied shoots. The findings prove, that concentration of mono- and disaccharides decreases significantly in both species in conditions of multicomponent pollution, but more quantitative changes are more significant in the shoots of *S. alba*. The paper suggests that indicators of carbohydrate metabolism used as informative test parameters in monitoring studies of pollution SO_2 , NO_x , H_2S , NH_3 , phenols and suspended particles (test object *S. alba*). The research findings can be applied to monitoring studies and technogenic territories planting.

Keywords: industrial emissions, coke and by-product industrial enterprise, sugar amount, monosaccharides, sucrose, one-year sprouts, *Salix alba* L., *Robinia pseudoacacia* L.

ПРОДУКТИВНІСТЬ КОЛОСУ ТА ЕФЕКТИВНІСТЬ УТВОРЕННЯ Й ВІДПЛИВУ АСИМІЛЯТІВ З ЛИСТКІВ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ ЗА БІОЛОГІЗОВАНИХ СИСТЕМ УДОБРЕННЯ

О. Дубицький, О. Качмар*, А. Дубицька, М. Щерба

*Інститут сільського господарства Карпатського регіону НААН України
вул. Грушевського, 5, с. Оброшине, Львівська обл. 81115, Україна
e-mail: oksanaostrowska@ukr.net*

За допомогою двовимірного кореляційного аналізу вивчено взаємозалежності між середньою інтенсивністю нетто й істинного фотосинтезу, їхніми співвідношеннями, а також показниками експорту асимілятів з верхніх листків (фази онтогенезу колосіння – молочна стиглість), і продуктивністю колоса озимої пшениці серед біологізованих систем удобрення (БСУ). Встановлено, що застосування БСУ призводить до узгодженого зростання зернової продуктивності, середньої інтенсивності нетто й істинного фотосинтезу у верхніх листках рослин, відносно мінеральної системи удобрення. Збільшення вмісту сухої речовини у колосі озимої пшениці за БСУ супроводжується зростанням ефективності використання й інтенсивності відпливу асимілятів із верхніх донорних листків, порівняно з мінеральною системою удобрення. Результати досліджень засвідчили важливу роль процесів надходження й відпливу асимілятів із верхніх листків озимої пшениці протягом періоду дозрівання зерна у формуванні продуктивності колосу за дії БСУ.

Ключові слова: *Triticum aestivum* L., біологізовані системи удобрення, інтенсивність нетто й істинного фотосинтезу, показники експорту асимілятів, вміст сухої речовини у колосі

Згідно з існуючими уявленнями, проблему оптимізації продукційного процесу сільськогосподарських рослин доцільно розглядати як тісну взаємодію фотосинтетичного апарату і процесів росту в донорно-акцепторній системі [2, 7, 10]. З'ясовано, що центральну роль у регуляції донорно-акцепторних відносин (ДАВ) в організмі рослин (зокрема, пшениці) відіграє акцептор. Такий контроль здійснюється, як правило, за допомогою негативних зворотних зв'язків, спрямованих від акцептора (колос) до донора (листки) й альтернативного акцептора (стебло) [2, 3, 10, 15, 16]. Разом з тим, аналіз джерел літератури свідчить про те, що ДАВ у сільськогосподарських рослинах не обмежуються лише домінуванням акцептора, але формуються і реалізуються за активної участі різних органів, у тому числі донорних листків. При цьому діяльність донорів регулюється як на рівні всієї рослини за участю координуючих функцій акцептора, так і, принаймні частково, на рівні самих донорів [2, 10, 13, 14, 16]. Очевидно, що у дослідженнях закономірностей продукційного процесу в рослинах озимої пшениці за дії біологізованих систем удобрення (БСУ) доцільно враховувати ймовірну ієрархію взаємозалежностей між кінцевою продуктивністю та інтенсивністю й ефективністю утворення і відпливу асимілятів із верхніх донорних листків зазначених рослин. Серед елементів у структурі таких взаємозв'язків доречно розглядати інтенсивність нетто, істинного фотосинтезу, донорну активність верхніх листків пшениці, ефективність використання продуктів фотосинтезу на формування зернової продуктивності й на утворення асиміляційної системи донорів. Системний аналіз взаємозалежностей між переліченими елементами продукційного процесу у зернових культур за БСУ до цього часу не здійснено.

Дослідження проводили на озимій пшениці (*Triticum aestivum* L.) сорту Миронівська 65, яку вирощували на сірому лісовому ґрунті після гороху посівного (*Pisum sativum* L.) в умовах стаціонарного досліду із вивчення продуктивності різних типів короткочасних сівозмін Інституту сільського господарства Карпатського регіону НААН. Зміст дослідних варіантів наведений у табл. 1, закладку варіантів здійснювали за Доспеховим [1].

Таблиця 1

Зміст варіантів польового стаціонарного досліду

№ варіанта	Зміст варіанта	№ варіанта	Зміст варіанта
1	Контроль	8	$N_{60}P_{90}K_{90} + П.П. + ГФ$
2	$N_{60}P_{90}K_{90}$	10	$N_{60}P_{90}K_{90} + ЕБ$
4	$N_{60}P_{90}K_{90} + П.П.$	12	$N_{60}P_{90}K_{90} + ЕБ + КМ$
6	$N_{60}P_{90}K_{90} + П.П. + КМ$	14	$N_{60}P_{90}K_{90} + ЕБ + ГФ$

Примітка. П.П. – пташиний послід, ЕБ – органо-мінеральне біодобриво екобіом, КМ – комплексний регулятор росту кропмакс, ГФ – листкове мікродобриво гідроферт

Площа дослідної мікроділянки – 1 м²; повторність ділянок шестиразова; розташування ділянок системне. Пташиний послід і екобіом вносили у рекомендованій дозі (2 т/га) під культивування посівів озимої пшениці. Обробку рослин кропмаксом і гідрофертом проводили двічі за вегетацію (початок фаз трубкування та колосіння; однократна доза – 0,5 л/га, 4 кг/га, відповідно). Фази онтогенезу визначали за Майсурином [5]. Відбір верхніх листків (прапорцевий, передпрапорцевий) проводили у фазах колосіння, молочної стиглості загальноприйнятими методами [9] у трьох біологічних повторностях. Визначали кількість продуктивних пагонів, площу верхніх листків [1], загальний вміст абсолютно сухої речовини у листках і зерні [8], загальний вміст неструктурних вуглеводів (НСВ) у листках пшениці [6].

Для розрахунку інтенсивності нетто й істинного фотосинтезу використано рівняння Дж. Г. М. Торнлі [11]:

$$P_n^A = \mu_G^A \cdot (1 + r^A) \cdot W_G^A; \quad P_g^A = \mu_G^A \cdot ((1/Y_G) + r^A) \cdot W_G^A,$$

де P_n^A , P_g^A – миттєві величини інтенсивності нетто й істинного фотосинтезу, μ_G^A , r^A , W_G^A – миттєві величини відносної швидкості росту (за вмістом структурної речовини), співвідношення запас / структура, вмісту структурної речовини з розрахунку на площу листків, відповідно, у рослині, її органі; $Y_G = 0,5$ – коефіцієнт, що відображає ефективність використання субстрату у фотосинтезі для утворення структурної речовини.

Середня величина відносної швидкості росту (відносна швидкість фізіологічного старіння) верхніх листків озимої пшениці з розрахунку на одиницю площі за період $\Delta t = t_{MC} - t_K$ колосіння – молочна стиглість $\langle \mu_{G(BL-K-MC)}^A \rangle$, у першому наближенні матиме такий вигляд [11, 12]:

$$\langle \mu_{G(BL-K-MC)}^A \rangle = - \left[\frac{(W_{G(BL-MC)}^A - W_{G(BL-K)}^A)}{(S_{BL-MC} - S_{BL-K})} \right] \cdot \left[\frac{(\ln S_{BL-MC} - \ln S_{BL-K})}{\Delta t} \right],$$

де $W_{G(BL-K)}^A$, $W_{G(BL-MC)}^A$, S_{BL-K} , S_{BL-MC} – вміст структурної речовини на одиницю площі верхніх листків і площа зазначених листків, відповідно (г/дм², дм²; колосіння, молочна стиглість).

Після введення $\langle \mu_{G(BL-K-MC)}^A \rangle$, $W_{G(BL)}^A$, $r_{(BL)}^A$ у рівняння для P_n^A , P_g^A , усереднення між колосінням, молочною стиглістю, множення на коефіцієнт перерахунку у CO₂ – Mw(CO₂) / Mw(CH₂O) = 1,47, отримано формули для середніх величин інтенсивності нетто й істинного фотосинтезу у верхніх листках:

$$\langle P_{n(BL-K-MC)}^A \rangle = -1,47 \cdot \langle \mu_{(BL-K-MC)}^A \rangle \cdot \left[0,5 \cdot \left((1 + r_{(BL-K)}^A) \cdot W_{G(BL-K)}^A + (1 + r_{(BL-MC)}^A) \cdot W_{G(BL-MC)}^A \right) \right],$$

$$\langle P_{g(BL-K-MC)}^A \rangle = -1,47 \cdot \langle \mu_{(BL-K-MC)}^A \rangle \cdot \left[0,5 \cdot \left((1/Y_G) + r_{(BL-K)}^A \right) \cdot W_{G(BL-K)}^A + \left((1/Y_G) + r_{(BL-MC)}^A \right) \cdot W_{G(BL-MC)}^A \right].$$

Тут $\langle P_{n(BL-K-MC)}^A \rangle$ – середня інтенсивність нетто й істинного фотосинтезу верхніх листків, г CO₂ / (дм² • добу), колосіння – молочна стиглість; $r_{(BL-K)}^A = M_{НСВ(BL-K)}^A / W_{G(BL-K)}^A$, $r_{(BL-MC)}^A = M_{НСВ(BL-MC)}^A / W_{G(BL-MC)}^A$ – співвідношення запасна / структурна суха речовини у верхніх листках ($M_{НСВ(BL)}^A$, $W_{G(BL)}^A = W_{t(BL)}^A - M_{НСВ(BL)}^A$ – вміст НСВ, г / дм² та структурної речовини, г / дм²; $W_{t(BL)}^A$ – вміст сухої речовини, г / дм²); колосіння, молочна стиглість.

Співвідношення нетто / істинний фотосинтез, яке характеризує ефективність функціонування фотосинтетичного апарату, розраховували за рівнянням [11]:

$$\langle \Theta \rangle_{(BL-K-MC)} = \langle P_{n(BL-K-MC)}^A \rangle / \langle P_{g(BL-K-MC)}^A \rangle.$$

Ефективність використання НСВ, ремобілізованих із верхніх листків озимої пшениці упродовж колосіння – молочної стиглості, у формування зернової продуктивності визначали згідно з [3]:

$$K_{pzНСВ} = (A_{НСВ(K)} - A_{НСВ(MC)}) / m_3,$$

де $K_{pzНСВ}$ – коефіцієнт, що відображає внесок НСВ, накопичених у верхніх листках рослин упродовж колосіння – молочної стиглості у формування зернової продуктивності, мкг НСВ / г сухої речовини колоса; $A_{НСВ(K)}$, $A_{НСВ(MC)}$ – загальний вміст НСВ у верхніх листках пшениці у фазі колосіння, молочної стиглості, відповідно (мкг / г сухої речовини); m_3 – середня маса сухої речовини зерен у колосі (повна стиглість; г / г повітряно сухої речовини).

Середню активність донора – верхніх листків озимої пшениці характеризували середньо відносною швидкістю росту зазначених органів, поділеною на ефективність конверсії асимілятів, узятою з протилежним знаком [11, 12]:

$$\langle AD_{(BL-K-MC)} \rangle = - (1/Y) \cdot (\ln W_{t(BL-MC)} - \ln W_{t(BL-K)}) / \Delta t;$$

$\langle AD_{(BL-K-MC)} \rangle$ – середня донорна активність верхніх листків (доба⁻¹; колосіння – молочна стиглість), виражена через зміну вмісту загальної сухої речовини W_t (г / г сирої речовини) у зазначених органах; Δt – тривалість облікового періоду, днів; Y – ефективність конверсії асимілятів, г сухої речовини / г вуглеводів; $Y = Mw(C) / Mw(CH_2O) = 12 / 30 = 0,4$.

Для розрахунку середньої ефективності використання сухої речовини для утворення асиміляційної поверхні верхніх листків, застосовано таке рівняння [12]:

$$\langle F_{(BL-K-MC)} \rangle = \frac{(S_{(BL-MC)} - S_{(BL-K)}) \cdot (\ln W_{t(BL-MC)} - \ln W_{t(BL-K)})}{(W_{t(BL-MC)} - W_{t(BL-K)}) \cdot (\ln S_{(BL-MC)} - \ln S_{(BL-K)})}$$

де $\langle F_{(BL-K-MC)} \rangle$ – середня ефективність використання сухої речовини для утворення асиміляційної поверхні верхніх листків, дм² / г (інші позначення див. попередні рівняння).

Величини середньої інтенсивності нетто, істинного фотосинтезу та їхнього співвідношення на 1 м² посіву позначені $\langle P_n(vлП) \rangle$, $\langle P_g(vлП) \rangle$ (г CO₂ / (м² посіву • добу)), $\langle \Theta(vлП) \rangle$. Величини середньої донорної активності верхніх листків і середньої ефективності використання сухої речовини для утворення асиміляційної поверхні на 1 м² посіву позначені відповідно $\langle Ad(vлП) \rangle$, доба⁻¹ • м⁻² посіву, $\langle F(vлП) \rangle$ м² верхніх листків / г сухої речовини верхніх листків посіву. Статистичний аналіз результатів досліджень, обчислення коефіцієнтів кореляції проводили згідно з [4] та за допомогою комп'ютерної програми Excel 11.0.6560.0.

За результатами досліджень встановлено, що у контролі, варіант 1 (вар. 1), середня інтенсивність нетто й істинного фотосинтезу у верхніх листках озимої пшениці протягом фаз онтогенезу колосіння – молочна стиглість становила $\langle P_n(vлП) \rangle = 9,17 \pm 1,51$ і $\langle P_g(vлП) \rangle = 17,24 \pm 2,84$ г CO₂ / (м² посіву • добу) (табл. 2). За базової мінеральної системи удобрення

(вар. 2) відмічено зниження зазначених показників у 6,22–6,32 разу, до рівня $1,48 \pm 0,98$ і $2,73 \pm 1,83$ г CO_2 / (м² посіву • добу), відповідно. БСУ у вар. 4, 8–14 спричинили односпрямоване зростання (P_n (влП)) та (P_g (влП)) у 1,63–16,30 разу, порівняно з вар. 2. При цьому найбільші величини середньої інтенсивності нетто й істинного фотосинтезу у верхніх листках рослин відмічено за дії екобіом + кропмакс на мінеральному фоні (вар. 12) – $23,97 \pm 3,33$, $44,43 \pm 6,23$ г CO_2 / (м² посіву • добу), відповідно. Найменший рівень зазначених показників має місце за умов пташиного посліду + кропмакс і екобіому + гідроферт на мінеральному фоні (вар. 6, 14) – $2,50 \pm 1,41$ – $17,09 \pm 8,57$ г CO_2 / (м² посіву • добу). Разом з тим, різниця між (P_n (влП)), (P_g (влП)) у вар. 2 і вар. 6, 14 була недостовірною (табл. 2).

Таблиця 2

Середня інтенсивність нетто, істинного фотосинтезу (г CO_2 / (м² посіву • добу)) та їхнього співвідношення у верхніх листках озимої пшениці упродовж фаз онтогенезу колосіння – молочна стиглість залежно від БСУ ($M \pm m$, $n=6$)

№ вар.	Середня інтенсивність фотосинтезу		Нетто / істинний фотосинтез, $\langle \Theta \rangle$ (влП)
	нетто, $\langle P_n \rangle$ (влП)	істинного, $\langle P_g \rangle$ (влП)	
1	9,17±1,51	17,24±2,84	0,532±0,002
2	1,48±0,98 ¹	2,73±1,83 ¹	0,536±0,002 ¹
4	12,61±2,21 ^{1*,2}	23,77±4,16 ^{1,2}	0,531±0,002 ²
6	9,09±4,56	17,09±8,57	0,532±0,002 ²
8	12,88±2,79 ²	24,06±5,23 ²	0,535±0,001 ^{1*}
10	17,12±3,02 ^{1,2}	31,41±5,51 ^{1,2}	0,544±0,001 ^{1,2}
12	23,97±3,33 ^{1,2}	44,43±6,23 ^{1,2}	0,540±0,002 ^{1,2}
14	2,50±1,41 ¹	4,45±2,50 ¹	0,567±0,001 ^{1,2}

Примітка. Індекси ^{1,2} – достовірність різниці щодо варіантів 1, 2, відповідно – $P < 0,050$; ^{1*} – достовірність різниці щодо варіанта 1 – $p = 0,956 - 0,967$. Зміст варіантів 1–14 див. табл. 1

Ймовірно, що закономірності змін (P_n (влП)), (P_g (влП)) за дії БСУ зумовлені принаймні двома факторами: 1) інтенсивністю нетто й істинного фотосинтезу з розрахунку на середній верхній листок ($\langle p^A_{n(ВЛ-К-МС)} \rangle$, $\langle p^A_{g(ВЛ-К-МС)} \rangle$); 2) середнім листковим індексом, а отже, тривалістю життя цих листків (колосіння – молочна стиглість). Такі припущення узгоджуються з положеннями відомої теорії надходження/ відпливу асимілятів [12, 14].

Співвідношення середньої інтенсивності нетто й істинного фотосинтезу у верхніх листках озимої пшениці протягом колосіння – молочної стиглості незначно змінювалось у всіх досліджених варіантах (табл. 2). На контролі величина $\langle \Theta \rangle$ (влП) = $\langle P_n \rangle$ (влП) / $\langle P_g \rangle$ (влП) становила $0,532 \pm 0,002$, тоді як за базової мінеральної системи удобрення (вар. 2) – $0,536 \pm 0,002$. У вар. 4–8 відмічено зменшення зазначеного показника щодо вар. 2, до рівня $0,531 \pm 0,002$ – $0,535 \pm 0,001$, а у вар. 10–14 – збільшення до $0,544 \pm 0,001$ – $0,567 \pm 0,001$. Серед варіантів найбільшу величину $\langle \Theta \rangle$ (влП) виявлено у варіанті екобіом + гідроферт, найменшу – у варіанті з пташиним послідом (вар. 14, 4, відповідно; див. табл. 2).

Загалом, отримані величини $\langle \Theta \rangle$ (влП) узгоджуються з наявними в науковій літературі уявленнями стосовно співвідношень інтенсивності нетто й істинного фотосинтезу в листках рослин протягом періоду формування акцептора асимілятів [11].

На наступному етапі досліджень вивчали закономірності експорту асимілятів із верхніх листків озимої пшениці протягом колосіння – молочної стиглості за дії БСУ. Встановлено, що у контролі, вар. 1, ефективність використання НСВ, ремобілізованих із верхніх листків озимої пшениці упродовж облікового періоду, у формування зернової продуктивності, становила $K_{pНСВ} = -0,006 \pm 0,001$ мг НСВ/ (г сухої речовини колоса • м² посіву) (табл. 3). У вар. 2 відмічено зростання зазначеного показника до величини $-0,004 \pm 0,001$ мг НСВ / (г сухої речовини колоса • м² посіву). За БСУ у вар. 4, 8–14 $K_{pНСВ}$ збільшилася щодо

вар. 2 до рівня $-0,003 \pm 0,001 - 0,023 \pm 0,003$ мг НСВ / (г сухої речовини колоса • м² посіву). Найменша величина K_{pHCB} має місце у вар. 6, тоді як найбільша – у вар. 14: $K_{pHCB} = -0,016 \pm 0,002 - 0,023 \pm 0,003$ мг НСВ / (г сухої речовини колоса • м² посіву) (табл. 3). Негативні величини K_{pHCB} у фазах колосіння – молочної стиглості принаймні частково можуть бути зумовлені переважанням інтенсивності синтезу НСВ над швидкістю відпливу асимілятів до акцептора.

Таблиця 3

Показники експорту асимілятів із верхніх листків озимої пшениці за дії БСУ (колосіння – молочна стиглість; $M \pm m, n=6$)

№ вар.	K_{pHCB} , мг НСВ/ (г сухої речовини колоса • м ² посіву)	$\langle \text{Ад(влП)} \rangle$, доба ⁻¹ • м ⁻² посіву	$\langle \text{F(влП)} \rangle$, м ² листків / г сухої речовини листків посіву
1	-0,006±0,001	8,36±1,84	8,68±0,44
2	-0,004±0,001 ¹	20,66±2,19 ¹	9,01±0,50
4	-0,003±0,001 ¹	21,67±2,50 ¹	10,00±0,59 ^{1,2}
6	-0,016±0,002 ^{1,2}	4,18±2,24 ^{1,2}	9,30±0,20
8	-0,001±0,001 ^{1,2}	16,06±2,90 ^{1,2}	10,02±0,22 ^{1,2*}
10	0,001±0,000 ^{1,2}	24,68±1,67 ^{1,2}	9,91±0,51 ^{1,2}
12	-0,001±0,000 ^{1,2}	42,41±1,59 ^{1,2}	10,75±0,20 ^{1,2}
14	0,023±0,003 ^{1,2}	29,74±1,53 ^{1,2}	9,30±0,50 ^{1,2}

Примітка. Індекси ^{1, 2} – достовірність різниці щодо варіантів 1, 2, відповідно – $P < 0,050$; ^{2*} – достовірність різниці щодо варіанта 2 – $p = 0,972$. Зміст варіантів 1–14 див. табл. 1

Середня донорна активність верхніх листків озимої пшениці упродовж колосіння – молочної стиглості – $\langle \text{Ад(влП)} \rangle$ у всіх варіантах характеризується переважно такою самою спрямованістю, як і K_{pHCB} (див. табл. 3). У вар. 1, 2 $\langle \text{Ад(влП)} \rangle = 8,36 \pm 1,84 - 20,66 \pm 2,19$ доба⁻¹ • м⁻² посіву; за БСУ у вар. 4, 10–14, зазначений показник збільшився на 4,9–105,3 %, тоді як у вар. 6, 8 – зменшився на 22,3–79,8 % щодо вар. 2.

Серед досліджених варіантів відмічено незначні зміни середньої ефективності використання сухої речовини для утворення асиміляційної поверхні верхніх листків (див. табл. 3). Справді, на контролі та серед дослідних варіантів діапазон $\langle \text{F(влП)} \rangle$ становить $8,68 \pm 0,44 - 10,75 \pm 0,20$ м² листків / г сухої речовини листків посіву.

Таким чином, за мінеральної системи удобрення (вар. 2) має місце одночасне збільшення K_{pHCB} , $\langle \text{Ад(влП)} \rangle$, $\langle \text{F(влП)} \rangle$, порівняно з контролем (вар. 1). БСУ у вар. 4, 8–14 зумовили синхронне зростання, тоді як біологізовані технології у вар. 6 – зниження K_{pHCB} і $\langle \text{Ад(влП)} \rangle$ щодо вар. 2. Поряд із тим, за вивчених БСУ (вар. 4–14) не виявлено значних змін $\langle \text{F(влП)} \rangle$, за зіставлення з вар. 2.

Взаємозалежності між кінцевою продуктивністю озимої пшениці й інтенсивністю та ефективністю утворення і відпливу асимілятів із верхніх листків зазначених рослин охарактеризовані кількісно за допомогою двовимірного кореляційного аналізу. Як результативну ознаку X обрано середній вміст сухої речовини зерен у колосі з розрахунку на 1 м² посіву (фаза повної стиглості, m_{I3} ; табл. 4). Факторіальні ознаки надходження асимілятів: $\langle \text{Pn(влП)} \rangle - Y1$, $\langle \text{Pg(влП)} \rangle - Z1$, $\langle \text{Θ(влП)} \rangle - U1$. Факторіальні ознаки відпливу асимілятів: $K_{pHCB} - Y2$, $\langle \text{Ад(влП)} \rangle - Z2$, $\langle \text{F(влП)} \rangle - U2$. Масиви даних результативної, факторіальних ознак формували з даних пар варіантів: 1) вар. 1 (“0-доза” удобрення) – вар. 2 (“доза 1” мінерального удобрення); 2) вар. 2 (“0-доза” БСУ) – вар. 2n (“доза 1” БСУ).

Встановлено, що за зіставлення вар. 1–2 немає кореляції між m_{I3} та $\langle \text{Pn(влП)} \rangle$, $\langle \text{Pg(влП)} \rangle$ (табл. 5). У парах варіантів 2–4...2–12 відмічено прямо пропорційні співвідношення між переліченими показниками – $r_{xly1} = r_{xly2} = 0,81 - 0,91$; $P < 0,02 - 0,10$. За зіставлення вар. 2–14 коефіцієнти кореляції між m_{I3} та $\langle \text{Pn(влП)} \rangle$, $\langle \text{Pg(влП)} \rangle$ характеризуються низьким рівнем значимості ($r_{xly1} = r_{xly2} = 0,60 - 0,61$; $p = 0,872 - 0,879$).

Таблиця 4

Вміст сухої речовини в колосі озимої пшениці залежно від БСУ (г/ м² посіву; $M \pm m$, $n=6$)

№ вар.	Вміст сухої речовини	№ вар.	Вміст сухої речовини
1	368,30±24,77	8	667,60±40,57 ^{1,2}
2	577,12±44,75 ¹	10	718,25±30,82 ^{1,2}
4	654,18±40,95 ^{1,2}	12	776,14±21,69 ^{1,2}
6	687,76±46,66 ^{1,2}	14	742,83±27,41 ^{1,2}

Примітка. Індекси ^{1, 2} – достовірність різниці щодо варіантів 1, 2 відповідно – $P < 0,050$. Вміст варіантів 1–14 див. табл. 1

Таблиця 5

Двовимірна кореляційна залежність між вмістом сухої речовини у зерні озимої пшениці (г/ м² посіву) та середньою інтенсивністю нетто, істинного фотосинтезу (г СО₂/ (м² посіву • добу)), їхнім співвідношенням у верхніх листках рослин за дії БСУ

Пари варіантів, які зіставляються	$r_{x_1y_1}$	$r_{x_1z_1}$	$r_{x_1u_1}$
1–2	0,01; $p=0,016$	0,01; $p=0,008$	0,76; $P < 0,10$
2–4	0,82; $P < 0,05$	0,82; $P < 0,05$	0,48; $p=0,729$
2–6	0,85; $P < 0,05$	0,85; $P < 0,05$	0,45; $p=0,692$
2–8	0,81; $P < 0,10$	0,81; $P < 0,10$	0,63; $p=0,897$
2–10	0,89; $P < 0,02$	0,89; $P < 0,02$	0,90; $P < 0,02$
2–12	0,91; $P < 0,02$	0,91; $P < 0,02$	0,75; $P < 0,10$
2–14	0,61; $p=0,879$	0,60; $p=0,872$	0,81; $P < 0,10$

Примітка. $r_{x_1y_1}$, $r_{x_1z_1}$, $r_{x_1u_1}$ – коефіцієнти двовимірної кореляції між змінними $x_1 - m_{I_3}$, $y_1 - \langle \Theta(\text{влП}) \rangle$, $z_1 - \langle P_g(\text{влП}) \rangle$, $u_1 - \langle \Theta(\text{влП}) \rangle = \langle P_n(\text{влП}) \rangle / \langle P_g(\text{влП}) \rangle$; p – достовірність коефіцієнта кореляції; $P < 0,02$ – $P < 0,10$ – достовірність коефіцієнта кореляції за рівнів значимості 0,02–0,10. Вміст варіантів 1–14 див. табл. 1

У парі вар. 1–2 виявлено позитивні взаємозалежності між m_{I_3} і $\langle \Theta(\text{влП}) \rangle$: $r_{x_1u_1} = 0,76$; $P < 0,10$. Подібні закономірності мають місце за зіставлення вар. 2–10, 2–12, 2–14: $r_{x_1u_1} = 0,75 - 0,90$; $P < 0,02 - 0,10$. Поряд із тим, за порівняння вар. 2–4, 2–6, 2–8 немає кореляції між зазначеними показниками: $r_{x_1u_1} = 0,45 - 0,63$; $p = 0,692 - 0,897$ (табл. 5).

За зіставлення вар. 1–2 відмічено позитивну кореляцію між m_{I_3} та K_{pHCB} , $\langle \text{Ад}(\text{влП}) \rangle$: $r_{x_1y_2}$, $r_{x_1z_2} = 0,80 - 0,93$; $P < 0,01 - 0,10$ (табл. 6). У парах вар. 2–4, 2–8...2–14 зазначені показники також поєднані прямо пропорційними співвідношеннями: $r_{x_1y_2}$, $r_{x_1z_2} = 0,55 - 0,91$; $p = 0,810$; $P < 0,02 - 0,10$. За зіставлення вар. 2–6 – $r_{x_1y_2}$, $r_{x_1z_2} = -0,03 - -0,01$; $p = 0,024 - 0,048$. Прямо пропорційні співвідношення між m_{I_3} і $\langle F(\text{влП}) \rangle$ мають місце за порівняння вар. 1–2, а також вар. 2–4...2–14: $r_{x_1u_2} = 0,63 - 0,93$; $p = 0,899 - 0,909$, $P < 0,01 - 0,10$. (табл. 6).

Результати двовимірного кореляційного аналізу засвідчили, що підвищення кінцевої продуктивності озимої пшениці (m_{I_3}) за базової мінеральної системи удобрення щодо контролю (вар. 2 проти вар. 1) принаймні до певної міри зумовлене підвищенням співвідношення $\langle \Theta(\text{влП}) \rangle = \langle P_n(\text{влП}) \rangle / \langle P_g(\text{влП}) \rangle$ і не пов'язане зі змінами $\langle P_n(\text{влП}) \rangle$, $\langle P_g(\text{влП}) \rangle$ (колосіння – молочна стиглість). Збільшення вмісту сухої речовини у колосі озимої пшениці за БСУ у вар. 4–12, порівняно з вар. 2, значною мірою спричинене односпрямованим підвищенням $\langle P_n(\text{влП}) \rangle$, $\langle P_g(\text{влП}) \rangle$. При цьому продуктивність колосу рослин у вар. 10, 12, очевидно, істотно залежить від $\langle \Theta(\text{влП}) \rangle$. У вар. 14 лише останній серед перелічених показників може претендувати на роль фактора, який забезпечує підвищення m_{I_3} , щодо вар. 2.

Збільшення вмісту сухої речовини у колосі озимої пшениці за всіх досліджених систем удобрення, порівняно з контролем, супроводжується відповідними змінами показників ефективності використання й інтенсивності впливу асимілятів із верхніх

листіків рослин – K_{pHCB} , $\langle \text{Ад(влП)} \rangle$, $\langle \text{F(влП)} \rangle$ (колосіння – молочна стиглість). Тим не менше, збільшення $m_{тб}$ у вар. 6, щодо вар. 2, відбувається побіжно зі зростанням лише $\langle \text{F(влП)} \rangle$.

Таблиця 6

Коефіцієнти двовимірної кореляції між зерною продуктивністю озимої пшениці та показниками експорту асимілятів з верхніх листків рослин за БСУ

Пари варіантів, які зіставляються	$r_{x_1y_2}$	$r_{x_1z_2}$	$r_{x_1u_2}$
1 – 2	0,80; P<0,10	0,93; P<0,01	0,63; p=0,899
2 – 4	0,88; P<0,02	0,81; P<0,05	0,91; P<0,02
2 – 6	-0,03; p=0,048	-0,01; p=0,024	0,76; P<0,10
2 – 8	0,86; P<0,05	0,55; p=0,810	0,84; P<0,05
2 – 10	0,83; P<0,05	0,85; P<0,05	0,86; P<0,05
2 – 12	0,78; P<0,10	0,91; P<0,02	0,93; P<0,01
2 – 14	0,81; P<0,05	0,91; P<0,02	0,64; p=0,909

Примітка. $r_{x_1y_2}$, $r_{x_1z_2}$, $r_{x_1u_2}$ – коефіцієнти двовимірної кореляції між змінними $x_1 - m_{тб}$, $y_2 - K_{pHCB}$, $z_2 - \langle \text{Ад(влП)} \rangle$, $u_2 - \langle \text{F(влП)} \rangle$; p – достовірність коефіцієнта кореляції; P<0,01 – P<0,10 – достовірність коефіцієнта кореляції за рівнів значимості 0,01–0,10. Зміст варіантів 1–14 див. табл. 1

Таким чином, вивчення взаємозалежностей між кінцевою продуктивністю колоса озимої пшениці й інтенсивністю, ефективністю надходження / відпливу асимілятів з верхніх листків упродовж фаз онтогенезу колосіння – молочна стиглість, є важливим для розуміння закономірностей продукційного процесу в зазначених рослинах за дії БСУ. На увагу заслуговує встановлений факт тісних прямо пропорційних взаємозалежностей між приростами інтенсивності нетто, істинного фотосинтезу у верхніх листках і вмісту сухої речовини в колосі озимої пшениці у варіантах із застосуванням БСУ, порівняно з базовою мінеральною системою удобрення. У значно меншій кількості дослідних варіантів відмічено позитивні взаємозалежності між кінцевою продуктивністю колоса та співвідношенням нетто / істинний фотосинтез. За переважної більшості застосованих БСУ збільшення вмісту сухої речовини у колосі спричинене зростанням ефективності використання неструктурних вуглеводів, ремобілізованих із верхніх листків озимої пшениці та середньої донорної активності зазначених листків упродовж колосіння – молочної стиглості. За вивчених БСУ мають місце чітко виражені позитивні взаємозалежності між кінцевою продуктивністю колоса та середньою ефективністю утворення асиміляційної поверхні верхніх листків.

Отримані результати у перспективі можуть бути використані для створення часткових математичних моделей продукційного процесу в озимій пшениці за дії БСУ.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). М.: Агропромиздат, 1985. 351 с.
2. Кириций Д. А. Роль акцепторов ассимилятов в регуляции фотосинтеза и распределения углерода в растении // Физиология и биохимия культ. растений. 2003. Т. 35. № 5. С. 382–391.
3. Крупа Н. М., Кірізі́й Д. А. Депонувальна функція стебла як складова продукційного процесу озимої пшениці // Физиология и биохимия культ. растений. 2011. Т. 43. № 4. С. 324–331.
4. Лакін Г. Ф. Биометрия. М.: Высш. школа, 1990. 352 с.
5. Майсура́н Н. А. Практикум по растениеводству. М.: Колос, 1970. 446 с.
6. Методы биохимического исследования растений / [Ермаков А. И., Арасимович В. В., Смирнова-Иконникова М. И. и др.]; под ред. А. И. Ермакова. [2-е изд., перераб. и доп.].

- Л.: Агропромиздат. Ленингр. отд-ние, 1972. 430 с.
7. Моргун В. В., Прядкина Г. А. Эффективность фотосинтеза и перспективы повышения продуктивности озимой пшеницы // Физиология растений и генетика. 2014. Т. 46. № 4. С. 279–301.
 8. Петербургский А. В. Практикум по агрономической химии. М.: Колос, 1968. 496 с.
 9. Сирота Ф. Н. Основи аналітичної хімії та сільськогосподарський аналіз. К.: Вища школа, 1970. 222 с.
 10. Стасик О. О., Кірізій Д. А. Регуляторні зв'язки і лімітувальні чинники в системі фотосинтез – продукційний процес та перспективи їх оптимізації // Физиология и биохимия культ. растений. 2011. Т. 43. № 3. С. 226–238.
 11. Торнли Дж. Г. М. Математические модели в физиологии растений / пер. с англ. Д.М. Гродзинского. К.: Наук. думка, 1982. 312 с.
 12. Фотосинтез и биопродуктивность: методы определения / [пер. с англ. Н. Л. Гудскова, Н. В. Обручевой, К. С. Спекторова, С. С. Чайновой]; под ред. А.Т. Мокроносова. М.: Агропромиздат, 1989. 460 с.
 13. Bennett E. Roberts J. A., Wagstaff C. Manipulating resource allocation in plants // J. Exp. Bot. 2012. Vol. 63. N 9. P. 3391–3400.
 14. Hikosaka K. Leaf canopy as a dynamic system: ecophysiology and optimality in leaf turnover // Ann. Bot. 2005. Vol. 95. N 3. P. 521–533.
 15. Foulkes M. J., Slafer G. A., Davies W. J. et al. Raising yield potential of wheat. III. Optimizing partitioning to grain while maintaining lodging resistance // J. Exp. Bot. 2011. Vol. 62. N 2. P. 469–486.
 16. Slewinski T. L. Non-structural carbohydrate partitioning in grass stems: a target to increase yield stability, stress tolerance, and biofuel production // J. Exp. Bot. 2012. Vol. 63. N 13. P. 4647–4670.

Стаття: надійшла до редакції 29.12.16

доопрацьована 30.05.17

прийнята до друку 02.06.17

EAR PRODUCTIVITY, EFFICIENCY OF ASSIMILATES FORMATION AND EXPORT FROM WINTER WHEAT LEAVES UPON CONDITIONS OF BIOLOGICAL FERTILIZER SYSTEMS

A. Dubitsky, O. Kachmar, A. Dubitska, M. Shcherba

*Institute of Agriculture of Carpathian Region, NAAS of Ukraine
5, Hrushevskiy St., v. Obroshyne, Lviv District 81115, Ukraine
e-mail: oksanaostrowska@ukr.net*

With the help of the two-dimensional correlation analysis, there has been studied the relationships between the average intensity of the net and gross photosynthesis, their ratios, as well as the indicators of the export efficiency of assimilates from the upper leaves (the phases of ontogenesis earing – milk ripeness), and productivity of winter wheat ears (dry matter content in the ear; full maturity) among the biological fertilizer systems (BFS). It has been established, that the application of the BFS leads to the consistent increase in grain productivity, average intensity of the net and gross photosynthesis into the plants upper leaves, compared with mineral fertilizer system. The increase in dry matter content into the

ear of winter wheat under the influence of the BFS has been accompanied with the increase in the efficiency of use and intensity of outflow of assimilates from the upper donor leaves, in comparison with the mineral fertilizer system. The results of research show an important role of processes of inflow and outflow of assimilates from the upper leaves of winter wheat during the period of grain maturation in the formation of ear productivity under the BFS.

Keywords: *Triticum aestivum* L., winter wheat, biological systems of fertilizers, net and gross photosynthesis, dry matter content, correlation analysis

**ОПТИМІЗАЦІЯ АЛЕЛОПАТИЧНОГО ТА МІКРОБІОЛОГІЧНОГО СТАНУ
ПРИКОРЕНЕВОГО СЕРЕДОВИЩА РОСЛИН *CITRUS LIMON* (L.) BURM.
ЗА УМОВ ОРАНЖЕРЕЙНОЇ КУЛЬТУРИ**

Н. Павлюченко*, Н. Елланська, О. Юношева, В. Доброскок, С. Крупа

*Національний ботанічний сад імені М.М. Гришка НАН України
вул. Тімірязєвська, 1, Київ 01014, Україна
e-mail: npavliuch@gmail.com*

Досліджено вплив кремнієвмісної суміші на алелопатичні та мікробіологічні характеристики прикореневого середовища рослин лимону (*Citrus limon* (L.) Burm.) з метою збереження генофонду цінних інтродуцентів. Кремнієвмісну суміш вносили у ґрунт під багаторічні насадження *Citrus limon* сорту Genua колекції цитрусових рослин Національного ботанічного саду ім. М.М. Гришка НАН України за умов оранжерейної культури. Виявлено позитивний вплив кремнієвмісної суміші на ґрунтову мікробіоту лимонарію. Застосування кремнієвмісної суміші призводило до зростання кількості досліджуваних еколого-трофічних груп мікроорганізмів, крім мікроміцетів, у ґрунті під рослинами *Citrus limon* в усі терміни спостережень. Інтенсифікація трансформації органічної речовини сприяла зменшенню темпів акумуляції рухливих форм фенольних сполук, що виконують алелопатичну функцію та можуть знижувати продуктивність рослин, у прикореневого середовища *Citrus limon*. Використання кремнієвмісної суміші оптимізувало окисно-відновний режим і алелопатичний стан прикореневого ґрунту багаторічних насаджень *Citrus limon*. Ефективність застосування кремнієвмісної суміші, загалом, підвищувалася зі збільшенням терміну після її внесення.

Ключові слова: *Citrus limon* (L.) Burm., фенольні алелохімікати, мікроміцети, бактерії, кремнієвмісна суміш

Останнім часом гостро постає проблема зниження врожайності багаторічних цитрусових насаджень і зростає ризик їхньої масової загибелі у провідних країнах-постачальниках даної продукції, що у більшості випадків пов'язують із ураженням збудниками інфекційних захворювань і шкідниками [10, 19]. Однак однією з причин цього може бути алелопатична складова, оскільки у цитрусових садах вже давно спостерігали явище ґрунтовтоми, головним чинником якого вважають фітотоксини корневих решток [16]. Основними ознаками ґрунтовтоми є погіршення росту і порушення фізіолого-біохімічних процесів рослинного організму, що характерно за беззмінного вирощування низки плодкових культур, таких як яблуна, абрикоса, персик, виноград та ін. [11, 13, 18, 22]. Алелопатична ґрунтовтома притаманна перш за все одновидовим штучним фітоценозам тривалої експлуатації.

Як відомо, у замкнутих штучних екосистемах (насамперед за оранжерейних умов) вплив алелопатичного фактора на функціонування останньої посилюється внаслідок акумуляції рослинних екзометаболітів і продуктів деструкції в обмеженому просторі [2]. При цьому вагомою ланкою, що визначає характер його прояву, є ґрунтова мікробіота. Адаптивна ризосфера – зона активної комунікації рослин і мікроорганізмів, яка відбувається за допомогою обміну метаболітами [15, 17]. Фізіологічно активні речовини (фенольні сполуки, гормони, амінокислоти, вуглеводи та ін.), що накопичуються у ризосфері рослин, впливають, у свою чергу, на розвиток і функціональну активність ґрунтових мікроорганізмів.

Ґрунтова мікробіота бере участь у формуванні та регулюванні практично усіх корисних властивостей ґрунту.

З огляду на це, особливої актуальності набуває впровадження безпечних надійних заходів оздоровлення прилеглого ґрунту цитрусових культур і їхнє збереження в інтродукційних осередках, таких як ботанічні сади з оранжерейними комплексами.

Численні дослідження підтверджують ефективність застосування природних кремнієвмісних мінералів для покращення фізико-хімічних властивостей ґрунту, підвищення його родючості, подолання наслідків ґрунтової та зростання стійкості інтродукованих рослин до несприятливих факторів довкілля за умов монокультури [5, 8, 9].

Мета нашого дослідження – проаналізувати вплив кремнієвмісної суміші на алелопатичні та мікробіологічні характеристики прикореневого середовища багаторічних насаджень лимону (*Citrus limon* (L.) Burm.) за умов оранжерейної культури для збереження цінних інтродуцентів.

Матеріали та методи

Кремнієвмісну суміш (перегній і анальцим – 10:1) у дозі 50 г/м² вносили у прикореневий ґрунт багаторічних насаджень лимону (*Citrus limon* (L.) Burm.) сорту Генуа колекції цитрусових рослин Національного ботанічного саду ім. М.М. Гришка НАН України, закладеної у 50-ті рр. ХХ ст. [10] за умов оранжерейної культури.

Зразки ґрунту аналізували через 1, 3 та 5 місяців після застосування зазначеної суміші. Контроль – ґрунт лимонарію без додавання суміші.

Виділення мікроорганізмів зі свіжовідібраних зразків ґрунту здійснювали методом посіву ґрунтових суспензій у відповідних розведеннях на селективні агаризовані живильні середовища за загальноприйнятими у ґрунтовій мікробіології методиками [6, 14]. Спрямованість мікробіологічних процесів визначали за К. Андреюк зі співавт. [1] і методикою, описаною В. Мухом [12].

Коефіцієнт мінералізації-іммобілізації розраховували за формулою:

$K_m-i = C_{КАА} / C_{МПА}$, де $C_{КАА}$, $C_{МПА}$ – кількість мікроорганізмів, що виростили на, відповідно, крохмаль-аміачному (КАА) та м'ясопептонному (МПА) агарах.

Показник мікробіологічної трансформації органічної речовини ґрунту розраховували за співвідношенням сумарної кількості мікроорганізмів на МПА і КАА та показника мінералізації.

Чисельність бактерій роду *Azotobacter* визначали методом аплікації на поверхню агаризованого середовища Ешбі [7].

Ідентифікацію ґрунтових мікроміцетів проводили за [20].

Фенольні речовини виділяли з ґрунту методом іонного обміну (десорбції), використовуючи іонообмінник КУ-2-8 (Н⁺) як модель кореневої системи з розчинювальною і поглинальною здатністю щодо рухливих органічних сполук [3]. Контакт ґрунту зі смолою відбувався у плоскодонній колбі з притертою пробкою в нейтральному середовищі (етилловий спирт) за співвідношення ґрунт:смола:спирт – 1:1:2. Вміст колби добре перемішували і залишали для контакту на 48 год. Після цього елюати відокремлювали шляхом центрифугування при 6 тис. об./хв протягом 20 хв. Після видалення надосадової рідини вміст центрифужних пробірок змивали етиловим спиртом і продовжували елюювання протягом 18 год. У подальшому екстракцію проводили у такій же послідовності двократно водним ацетоном (2:1 по об'єму). Отримані елюати концентрували на водяній бані або ротаційному випарнику. Сухі залишки спиртових елюатів розчиняли в 5 мл 96 %-ного, а

водно-ацетонових – в 10 мл 48 %-ного етанолу. В отриманих спиртових розчинах двох елюатів (спиртовий і водно-ацетоновий) проводили визначення суми фенольних речовин з реактивом Фоліна-Чокальте спектрофотометрично на довжині хвилі 730 нм.

Визначали окисно-відновний потенціал (ОВП) ґрунту [3]. Для цього ґрунтову пасту (ґрунт і дистильована вода – 1:1) добре перемішували й аналізували за допомогою іоніміра И-160 (Гомельський завод вимірювальних приладів, Білорусь).

Алелопатичний аналіз ґрунту здійснювали методом прямого біотестування [4]. Наважку ґрунту 50 г (середня проба) вміщували у ступку та зволожували водою приблизно до 75 % від повної вологості, що відповідало пастоподібному стану ґрунту, ретельно розтирали його товчачиком. Потім суспензію переносили у чашку Петрі. Під час струшування чашки на поверхні ґрунту утворювалося легке водне дзеркало, на яке накладали фільтр, що точно відповідав діаметру чашки. На фільтр розклали проростки крес-салату (*Lepidium sativum* L.) (15 штук). Чашки Петрі без кришок вміщували у загальну кювету, в яку для зволоження наливали трохи води, накривали її склом і ставили у термостат при 26 °С. Через добу вимірювали довжину коренів у досліді та контролі. Головним критерієм відтворення результатів є використання для аналізу свіжовідібраного ґрунту.

Статистичну обробку даних здійснено за допомогою пакету програм *Microsoft Excel*.

Результати і їхнє обговорення

Біохімічний стан ґрунту під рослинами *Citrus limon* оцінювали за значеннями окисно-відновного потенціалу (ОВП). ОВП ґрунту зростав через 3 та 5 місяців після застосування кремнієвмісної суміші відповідно в 1,2 та 1,4 разу порівняно з контролем, що свідчить про сповільнення темпів акумуляції лабільних органічних сполук під дослідними рослинами лимону (рис. 1). Треба відмітити, що у контролі переважали інтенсивно відновні процеси. За внесення кремнієвмісної суміші характер окисно-відновного процесу змінювався до помірно відновного, що є більш сприятливим для перебігу гуміфікації, поживного режиму, росту й розвитку рослин.

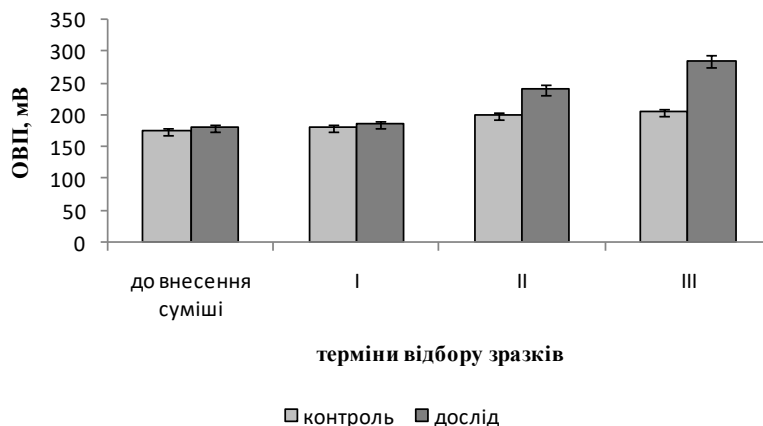


Рис. 1. Окисно-відновний потенціал ґрунту під рослинами *Citrus limon* (L.) Burm. при внесенні кремнієвмісної суміші, мВ. Терміни відбору зразків: I – 1 місяць після внесення кремнієвмісної суміші; II – 3 місяці; III – 5 місяців

Фенольні речовини вважають одним із найважливіших класів алелохімікатів завдяки їхній надзвичайній розповсюженості та широкому спектру дії, що охоплює як фізіолого-біохімічні процеси рослин, так і функціонування певних груп мікроорганізмів [21]. Окрім того, виявлено саме фенольну природу фітотоксинів, які вивільняються у ґрунт при

трансформації корневих залишків рослин лимону [16]. У зв'язку з цим досліджено динаміку акумуляції фенольних сполук у прикореновому середовищі *Citrus limon* за використання кремнієвмісної суміші.

Встановлено зниження вмісту фенольних речовин через 3 та 5 місяців після її внесення відповідно в 1,3 і 1,8 разу порівняно з контролем (рис. 2). Необхідно зазначити, що концентрація фенолів у контролі поступово збільшувалася протягом експерименту. Така тенденція, очевидно, є результатом як особливостей продукування екзометаболітів культурою лимону, так і їхнього мікробіологічного перетворення.

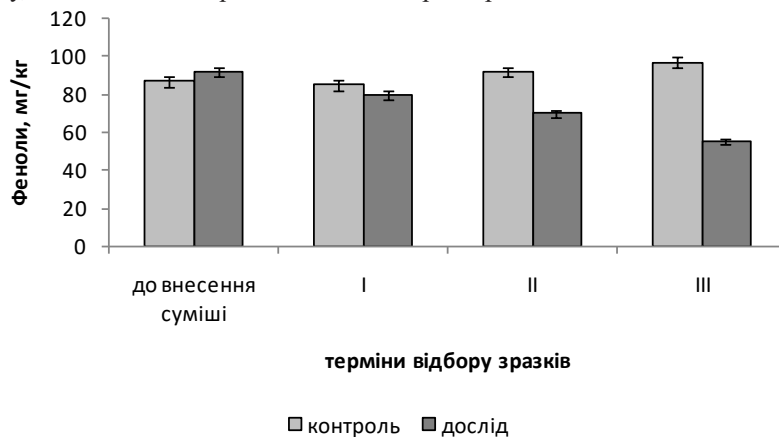


Рис. 2. Вміст фенольних речовин у ґрунті під рослинами *Citrus limon* (L.) Burm. при застосуванні кремнієвмісної суміші. Терміни відбору зразків див. рис.1

Протягом вегетаційного періоду рослин проводився мікробіологічний моніторинг ґрунту під дослідними об'єктами. Отримані дані показали, що внесення кремнієвмісної суміші призводить до зростання кількості досліджуваних еколого-трофічних груп мікроорганізмів, крім мікроміцетів, у ґрунті під рослинами *Citrus limon* (рис. 3, А, Б, В) в усі терміни спостережень.

Вплив суміші на збільшення чисельності актиноміцетів та іммобілізаторів мінерального нітрогену був помітний уже за місяць, тоді як амоніфікатори відреагували на її внесення лише за 3 місяці. З часом вплив кремнієвмісної суміші на активність мікроорганізмів послаблюється, але їхня кількість у досліді все ж більша за контроль.

Чисельність мікроміцетів у контрольних зразках була доволі високою протягом усього періоду спостережень, що може бути однією з причин посиленої акумуляції фенольних речовин, яка спостерігалася нами, оскільки саме ця група мікроорганізмів вважається причетною до їхнього синтезу (рис. 3, Г). За внесення кремнієвмісної суміші кількість мікроміцетів зменшилась (особливо через 3 місяці), що може розглядатись як позитивна її дія. При цьому видовий склад ґрунтових грибів був доволі обмеженим і не дуже різнився між контролем та дослідом. Переважали представники роду *Fusarium*, *Gliocladium* та *Penicillium*. Найбільше темнопігментованих видів трапляється у досліді, що свідчить про інтенсивність процесів гумусоутворення у ґрунті.

Мінералізація рослинних решток сприяє вивільненню водорозчинних органічних сполук і біосинтезу фізіологічно активних речовин, у тому числі й фенолів. Мінералізаційні процеси у досліді відбувалися повільно, на що вказують дані показника коефіцієнта мінералізації-іммобілізації (рис. 3, Д) (за винятком I терміну спостережень, де виявлено значну чисельність мікроорганізмів, що споживають мінеральний нітроген). При цьому

трансформація органічної речовини у ґрунті, яка завершується гуміфікацією, найбільш інтенсивно відбувалася за 3 місяці впливу кремнієвмісної суміші (рис. 3, Е).

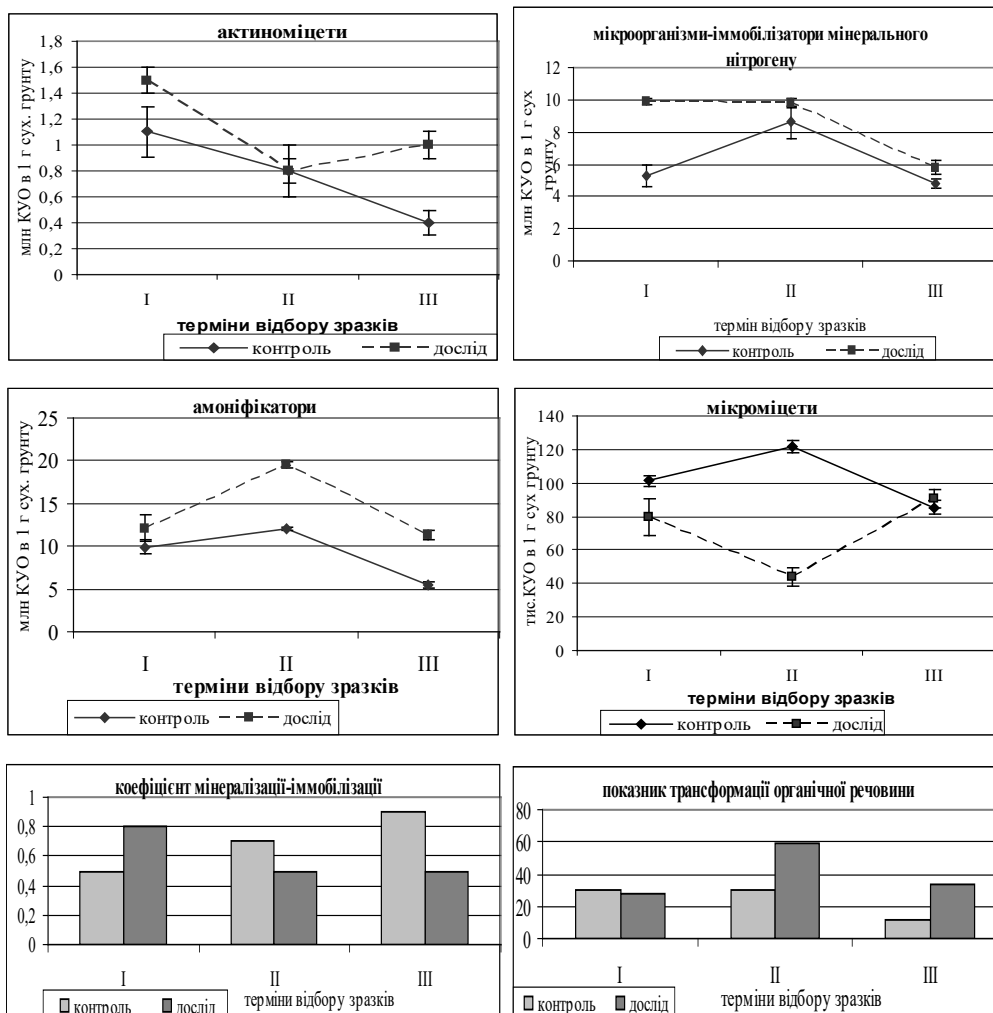


Рис. 3. Чисельність мікроорганізмів основних еколого-трофічних груп та спрямованість мікробіологічних процесів у ґрунті під рослинами *Citrus limon* (L.) Burm. за дії кремнієвмісної суміші. Терміни відбору зразків див. рис. 1

У наших дослідках спостерігався інтенсивний розвиток вільноживучих азотофіксувальних мікроорганізмів, що може свідчити про відсутність надмірного вмісту сполук, які пригнічують процес азотофіксації. Відмінностей між варіантами дослідку нами не відмічено.

Аналіз алелопатичної активності прикореневого ґрунту показав ріст-стимулювальну дію на рослини-акцептори у відповідь на внесення зазначеної суміші на рівні 11 % (через 3 місяці) та 40 % (через 5 місяців) порівняно з контролем, що, очевидно, є наслідком зниження вмісту фітотоксичних речовин фенольної природи, поліпшення окисно-відновного режиму та характеристик мікробних угруповань (рис. 4).

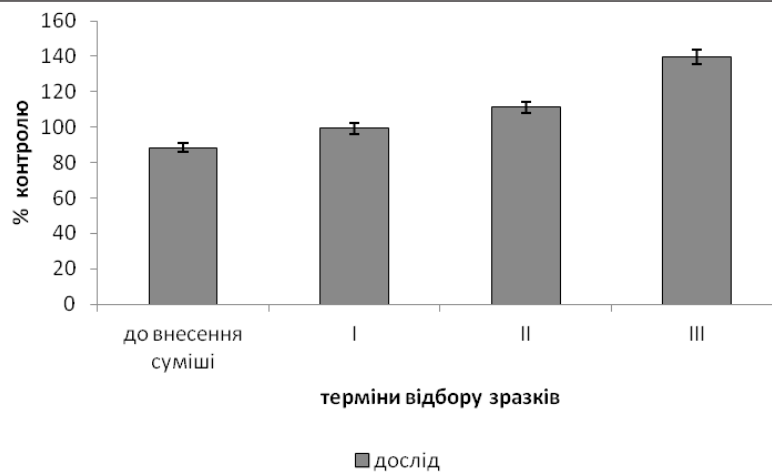


Рис. 4. Алелопатична активність ґрунту під рослинами *Citrus limon* (L.) Burm. за дії кремнієвмісної суміші, приріст коренів *Lepidium sativum* L. (% контролю). Терміни відбору зразків див. рис. 1

Отже, виявлено позитивний вплив внесення кремнієвмісної суміші на ґрунтову мікробіоту лимонарію. Інтенсифікація трансформації органічної речовини сприяла зменшенню темпів акумуляції рухливих форм фенольних сполук, що виконують алелопатичну функцію та можуть знижувати продуктивність рослин, у прикореновому середовищі *Citrus limon*. В цілому, застосування кремнієвмісної суміші оптимізувало окисно-відновний режим і алелопатичний стан прикоренового ґрунту багаторічних насаджень *Citrus limon* за умов оранжерейної культури, що є важливим для збереження генофонду цінних інтродукованих плодкових рослин з огляду на дію несприятливих факторів довкілля у межах природних ареалів. Ефективність використання кремнієвмісної суміші, загалом, підвищувалася зі збільшенням терміну після її внесення.

Автори висловлюють щиру вдячність кураторові колекції цитрусових рослин НБС НАН України І. В. Кикавському за сприяння у проведенні даних досліджень.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Андреюк Е. И., Валагурова Е. В., Мальцева Н. Н. Инструментальные методы в почвенной микробиологии. К.: Наук. думка, 1982. 220 с.
2. Гродзинский А. М., Головка Э. А., Безменов А. Я. и др. Взаимодействие летучих выделений в замкнутой экосистеме. К.: Наук. думка, 1992. 128 с.
3. Гродзинский А. М., Горобец С. А., Крупа Л. И. Руководство по применению биохимических методов в аллелопатических исследованиях почв. К., 1988. 18 с.
4. Гродзинский А. М., Кострома Е. Ю., Шроль Т. С., Хохлова И. Г. Прямые методы биотестирования почвы и метаболитов микроорганизмов // Аллелопатия и продуктивность растений. К.: Наук. думка, 1990. С. 121–124.
5. Довгалоук Н., Заценко Н., Павлюченко Н., Горб В. Проблемы многолетнего экспонирования *Syringa* L. в условиях монокультуры в Национальном ботаническом саду им. Н.Н. Гришко НАН Украины // Formation of Urban Green Areas. 2016. Vol. 1. N 13. P. 84–89.
6. Елланська Н. Е., Левчик Н. Я., Юношева О. П. Мікробні угруповання прикоренового ґрунту представників роду *Vitex* L. // Gruntoznavstvo. Soil science. Ґрунтознавство. 2013. Т. 14. № 1–2 (22). С. 61–69.

7. Звягинцев Д. Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии: учеб. пособ. М.: Изд-во МГУ, 1991. 223 с.
8. Козлов А. В., Куликова А. Х., Яшин Е. А. Роль и значение кремния и кремнийсодержащих веществ в агроэкосистемах // Вестн. Мининск. ун-та. 2015. № 2. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://vestnik.mininuniver.ru/reader/search/rol-i-znachenie-kremniya-i-kremniysoderzhashchikh/>.
9. Кудренко І. К., Левон В. Ф., Заїменко Н. В., Мороз П. А. Використання анальциму для зниження вмісту фенольних речовин у ґрунті під плодовими рослинами // Інтродукція рослин. 2011. № 3. С. 93–97.
10. Кулян Р. В., Самарина Л. С., Рахмангулов Р. С. и др. Генетические ресурсы цитрусовых культур в России, Украине и Беларуси: хранение и использование // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017. DOI 10.18699/VJ17.21-0 [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://vavilov.elpub.ru/jour/article/download/945/907>.
11. Мороз П. А. Екологічні аспекти алелопатичної післядії едифікаторів садових фітоценозів: автореф. дис. ... д-ра біол. наук: 03.00.16. Дніпропетровськ, 1995. 51 с.
12. Муха В. Д. Естественнo-антропогенная эволюция почв. М.: Колос, 2004. 271 с.
13. Осипова І. Ю. Алелопатичні особливості нових плодових культур: автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.12. К., 2000. 17 с.
14. Теннер Е. З., Шильникова В. К., Переверзева Г. И. Практикум по микробиологии. М.: Дрофа, 2004. 256 с.
15. Barea J. M., Pozo M. J., Azcon R. Microbial cooperation in the rhizosphere // J. Exp. Bot. 2005. Vol. 56. P. 1761–1778.
16. Bitters W. P. Citrus rootstocks: their characters and reactions. 1986. 230 p. [Electronic Resource]. Mode of Access: <http://www.citrusvariety.ucr.edu/links/documents/Bitters.pdf>.
17. Brensic A., Winans S. C. Detection and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2005. Vol. 69. P. 155–194.
18. Brinker A. M., Creasy L. L. Inhibitors as a possible basis for grape replant problem // J. Amer. Soc. Hort. Science. 1988. N 113. P. 304–309.
19. Cronje C., Le Roux H. F., Truter M. et al. Long-term effects of preplant soil solarisation on growth of replant citrus trees in South Africa // African Plant Protection. 2002. Vol. 8. N 1&2. P. 41–49.
20. Kirk P. M., Cannon P. F., Minter D. W., Stalpers J. A. Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi (10th ed.). Wallingford (UK): CABI, 2008. 771 p.
21. Li Z.-H., Wang Q., Ruan X. et al. Phenolics and plant allelopathy // Molekules. 2010. Vol. 15. P. 8933–8952.
22. Westphal A., Browne G. T., Schneider S. Evidence for biological nature of the grape replant problem in California // Plant and Soil. 2002. Vol. 242. N 2. P. 197–203.

Стаття: надійшла до редакції 30.05.17

доопрацьована 25.09.17

прийнята до друку 02.10.17

**OPTIMIZATION OF ALLELOPATHIC AND MICROBIOLOGICAL STATE
OF *CITRUS LIMON* (L.) BURM. PLANTS ROOT ENVIRONMENT
UNDER GREENHOUSE CONDITIONS**

N. Pavliuchenko, N. Ellanska, O. Yunosheva, V. Dobroskok, S. Krupa

*M. M. Gryshko National Botanical Gardens, NAS of Ukraine
1, Timiryazevska St., Kyiv 01014, Ukraine
e-mail: npavliuch@gmail.com*

To preserve gene pool of valuable introduced plants the effect siliceous mixture on allelopathic and microbiological characteristics of lemon (*Citrus limon* (L.) Burm.) root environment was studied. Siliceous mixture was added into soil under Genoa cultivar *Citrus limon* perennial plantations of citrus plants collection of the M.M. Gryshko National Botanical Gardens of NAS of Ukraine in greenhouse conditions. The positive effect of siliceous mixture on soil microbiota of lemon trees was found. Siliceous mixture application led to an increase in the number of investigated ecological trophic groups of microorganisms, except micromycetes, in the soil under *Citrus limon* plants in all terms of observation. Intensification of organic matter transformation contributed to the reduce the rate of the accumulation of phenolic allelochemicals mobile forms, which can decrease the productivity of plants, in the *Citrus limon* root environment. Using a siliceous mixture optimized redox and allelopathic state of soil under perennial *Citrus limon* plants. The efficiency of the siliceous mixture generally was raised with increasing time after its application.

Keywords: *Citrus limon* (L.) Burm., phenolic allelochemicals, micromycetes, bacteria, siliceous mixture

ЗМІСТ

БІОФІЗИКА

А. Міщенко, Г. Тарадіна

Роль структури саркомеру в синхронізації роботи поперечних містків: теоретичний аналіз східчастих змін довжини у просторово розподіленій стохастичній моделі 3

В. Мазур, Ю. Здвіжков, С. Мандзинець, М. Бура, О. Заїченко

Процеси перекисного окиснення ліпідів у зародках в'юна за дії похідного поліетиленгліколю 15

БІОХІМІЯ

Н. Шурко, Т. Даниш

Дослідження зв'язування фактора VIII зсідання крові з кремнеземними сорбентами різної пористості 23

БОТАНІКА

А. Криворучко, В. Бессонова

Показники анатомічної структури листків дуба червоного (*Quercus rubra* L.) в урботехногенних умовах 29

ГЕНЕТИКА

У. Sehin, В. Ostash

Study of *Streptomyces ghanaensis* ATCC14672 genes *SSFG_03627* and *SSFG_01411* encoding putative membrane proteins 38

О. Штапенко, А. Мадіч, С. Федорова

Ефективність ДНК інтеграції та виживаність зигот мишей за умов пронуклеарної мікроін'єкції 45

І. Боднар, С. Горбулінська, Л. Боднар

Доцільність використання вітамінних хіміопревентерів для корегування індукції хромосомних аберацій синтетичним харчовим ароматизатором «Карамель» 54

ЕКОЛОГІЯ

Ю. Кобів, В. Кобів

Вплив випалювання на популяції деяких лучних видів у високогір'ї Українських Карпат 61

М. Вінічук

Вплив одноразового внесення калійних добрив на інтенсивність міграції радіоцезію у лісових екосистемах 69

Т. Микітчак, В. Штупун

Вплив функціонування Явірської ГЕС на угруповання безхребетних гідробіонтів р. Стрий (Українські Карпати) 77

Н. Кияк, Л. Буньо

Механізми пристосування бріофітів до сольового стресу на території хвостосховища Стебницького гірничо-хімічного підприємства "Полімінерал" 87

М. Шерстюк

Морфологічна інтегрованість репрезентативних автохтонних раритетних хамефітів Українського Полісся 97

<i>О. М. Горєлов, О. О. Горєлов</i> Життєвість деревних рослин (визначення, критерії та оцінка)	105
<i>І. Зубцова</i> Віталітетна структура ценопопуляцій <i>Potentilla erecta</i> (L.) Raeusch. на заплавних луках Кролевецько-Глухівського геоботанічного району	112
<i>Н. Джура, І. Подан</i> Екологічні наслідки довготривалого нафтовидобутку на Старосамбірському родовищі Львівської області	120
<i>Ю. Присєдський</i> Ростові параметри деяких видів газонних трав за умов комплексного флуоридно-сульфітного забруднення ґрунту	128
<i>О. Дунаєвська</i> Морфологічні особливості селезінки пойкилотермних тварин	138

ЗООЛОГІЯ

<i>К. Nazaruk, R. Zhuravchak</i> Zooplankton of waters objects within the wetland of Rivnenskyi Nature Reserve	145
<i>Є. Стекленов, В. Смаголь</i> Відтворювальна здатність самок сайгака <i>Saiga tatarica</i> Linnaeus, 1766 асканійської популяції	150

МІКРОБІОЛОГІЯ

<i>Г. Ямборко, Л. Пилипенко, І. Пилипенко</i> Детекція ентеротоксигенних <i>Bacillus cereus</i> у рослинній сировині	158
<i>О. Тарабас, О. Мороз, С. Гнатуш, Г. Яворська, Г. Звір, М. Ковальчук</i> Еколого-трофічні групи мікроорганізмів води озера Яворівське	166

ФІЗІОЛОГІЯ ЛЮДИНИ І ТВАРИН

<i>С. Сисолятін</i> Вміст ліпідів у білих м'язах і зябрах коропа (<i>Cyprinus carpio</i> L.) за гіпоксигіперкапічного впливу	179
<i>Н. Шурко, Т. Даниш, В. Новак</i> Фактор VIII зсідання крові: будова молекули та застосування	184
<i>Н. І. Купиняк, О. В. Іккерт, В. В. Манько</i> Роль ріанодинчутливих Ca ²⁺ -каналів у регуляції дихання мітохондрій печінки щурів ...	193

ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН

<i>Т. Юсупіва</i> Вплив викидів коксохімічного виробництва на динаміку вмісту розчинних вуглеводів у однорічних пагонах деревних рослин	206
<i>О. Дубицький, О. Качмар, А. Дубицька, М. Щерба</i> Продуктивність колосу та ефективність утворення й відпливу асимілятів з листків озимої пшениці за біологізованих систем удобрення	215
<i>Н. Павлюченко, Н. Елланська, О. Юношева, В. Доброскок, С. Крупа</i> Оптимізація алелопатичного та мікробіологічного стану прикореневого середовища рослин <i>Citrus limon</i> (L.) Burm. за умов оранжерейної культури	224

CONTENS

BIOPHYSICS

- A. Mishchenko, G. Taradina*
The role of sarcomere structure in cross-bridges activity synchronization: teoretical analisys of stepwise length changes in spatially explicite stochastic model3
- V. Mazur, Y. Zdvizhkov, S. Mandzynets, M. Bura, O. Zaichenko*
Lipid peroxidation processes in the loach embryos under the influence of polyethylene glycol derivatives 15

BIOCHEMISTRY

- N. Shurko, T. Danysh*
Study of coagulation factor VIII sorption with silica sorbents of different pore size 23

BOTANY

- A. Kryvoruchko, V. Bessonova*
Parameters of anatomical structure of red oak (*Quercus rubra* L.) leaf in urbanized conditions 29

GENETICS

- Y. Sehin, B. Ostash*
Study of *Streptomyces ghanaensis* ATCC14672 genes *SSFG_03627* and *SSFG_01411* encoding putative membrane proteins38
- O. Shtapenko, A. Madich, S. Fyodorova*
Gene integration efficiency and zygotes surviving in mice at pronuclear microinjection 45
- I. Bodnar, S. Gorbulinska, L. Bodnar*
Expediency of use vitamin chemioprotectors for correction of chromosome aberration induced by food synthetic flavors “Caramel”54

ECOLOGY

- Y. Kobiv, V. Kobiv*
Impact of burning on populations of some grassland species in the high-mountain zone of the Ukrainian Carpathians 61
- M. Vinichuk*
Effect of single potassium fertilizers application on radiocaesium migration in forest ecosystems 69
- T. Mykitchak, V. Shtupun*
Influence of Yavirska hydroelectric power plant on the communities of invertebrate hydrobionts of the Stryi river (Ukrainian Carpathians) 77
- N. Kyyak, L. Bunio*
Mechanisms of adaptation of bryophytes to salt stress on the territory of tailing of Stebnyk Mining and Chemical Enterprise “Polimineral” 87
- M. Sherstiuk*
Morphological integrations of ecorepresentative autochthonous rare hamephits of Ukrainian Polissya 97
- A. M. Gorelov, A. A. Gorelov*
Vitality of woody plants (determination, criteria and estimation)105

<i>I. Zubtsova</i>	
Vitality structure of <i>Potentilla erecta</i> (L.) Raeusch. cenopopulations' in Krolevets-Hlukhiv geobotanical region	112
<i>N. Dzhura, I. Podan</i>	
Ecological consequences of extended oil production at Staryi Sambir petroleum deposit	120
<i>Yu. Prysedskyj</i>	
The growth parameters of some species of lawn grasses under conditions of complex fluoride and sulfite soil pollution	128
<i>O. Dunaievska</i>	
The morphological features of the spleen in poikilothermic animals	138

ZOOLOGY

<i>K. Nazaruk, R. Zhuravchak</i>	
Zooplankton of waters objects within the wetland of Rivnenskyi Nature Reserve	145
<i>Ye. Steklenev, V. Smagol</i>	
Reproductive ability of saiga females <i>Saiga tatarica</i> Linnaeus, 1766 of Askanian population	150

MICROBIOLOGY

<i>G. Yamborko, L. Pylypenko, I. Pylypenko</i>	
Detection of enterotoxygenic <i>Bacillus cereus</i> in vegetable raw materials	158
<i>O. Tarabas, O. Moroz, S. Hnatush, G. Yavorska, G. Zvir, M. Kovalchuk</i>	
Ecological trophic groups of microorganisms of Yavorivske lake water	166

HUMAN AND ANIMAL PHYSIOLOGY

<i>S. Sysolyatin</i>	
Content of lipids in white muscles and gills of carp (<i>Cyprinus carpio</i> L.) for hypoxia and hypercapnic	179
<i>N. Shurko, T. Danysh, V. Novak</i>	
The coagulation factor VIII: structure and application	184
<i>N. Kupynyak, O. Ikkert, V. Manko</i>	
The role of ryanodine-sensitive Ca ²⁺ channels in regulation respiration mitochondria of the liver of rats	193

PLANT PHYSIOLOGY

<i>T. Iusypiva</i>	
The influence of cock and by-product industrial enterprise emissions on the dynamics of soluble carbohydrate content in annual woody plants shoots	206
<i>A. Dubitsky, O. Kachmar, A. Dubitska, M. Shcherba</i>	
Ear productivity, efficiency of assimilates formation and export from winter wheat leaves upon conditions of biological fertilizer systems	215
<i>N. Pavliuchenko, N. Ellanska, O. Yunosheva, V. Dobroskok, S. Krupa</i>	
Optimization of allelopathic and microbiological state of <i>Citrus limon</i> (L.) Burm. plants root environment under greenhouse conditions	224