

ISSN 0206-5657

ВІСНИК
ЛЬВІВСЬКОГО
УНІВЕРСИТЕТУ

СЕРІЯ БІОЛОГІЧНА

Випуск 81

2019

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

Series Biology | **Серія біологічна**

Issue 81 | **Випуск 81**

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

2019

Друкується за ухвалою Вченої ради
Львівського національного університету
імені Івана Франка
Протокол №78/12 від 18 грудня 2019 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 *А. Бабський*; чл.-кор. НАН України, д-р біол. наук *М. Козловський* (Інститут екології Карпат НАН України); канд. біол. наук, доц. *З. Мамчур*; д-р біол. наук, проф. *Н. Сибірна*; д-р біол. наук, проф. *Д. Санагурський*; канд. біол. наук, проф. *С. Гнатуш*; д-р біол. наук, проф. *Л. Тасенкевич*; д-р біол. наук, проф. *О. Терек*; 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, доц. *В. Гончаренко*; канд. біол. наук *М. Ватаманюк*; канд. біол. наук *О. Ватаманюк*; д-р біол. наук, проф. *М. Долба*; 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, Hrushevskyi St.
Lviv 79005, Ukraine
tel. (032) 239-47-86

E-mail: biovisnyk@franko.lviv.ua

<http://publications.lnu.edu.ua/bulletins/index.php/biology/index>

<https://doi.org/10.30970/vbi.2019.81>

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. 12
Тираж 100 прим. Зам.

© Львівський національний університет
імені Івана Франка, 2019

**ВПЛИВ ЛАЗЕРНОГО ОПРОМІНЕННЯ НА КАТАЛАЗНУ АКТИВНІСТЬ
БАЗИДИОМЦЕТА *FLAMMULINA VELUTIPES* (CURT.: FR.) SING.**

К. Решетник, Д. Юськов

*Донецький національний університет імені Василя Стуса
вул. 600-річчя, 21, Вінниця 21021, Україна
e-mail: k.reshetnyk@donnu.edu.ua*

Досліджено вплив лазерного опромінення світлом видимого діапазону спектра на каталазну активність культурального фільтрату і гомогенату міцелію 5 штамів базидіомцета *Flammulina velutipes* (Curt.: Fr.) Sing. за їхнього поверхневого культивування на стандартному глюкозо-пептонному середовищі. Опромінення інокулюмом розміром близько 5×5 мм (завжди однієї щільності й віку) проводили перед посівом за допомогою світлодіодних лазерів: BRP–3010–5 (довжина хвилі 635 нм), BVP–3010–5 (довжина хвилі 405 нм) та BGP–3010–5 (довжина хвилі 532 нм). Потужність кожного лазера становила 100 мВт. Енергія опромінення у всіх варіантах досліджування становила 51,1 мДж/см². Інокулюмом слугували 10-денні міцеліальні культури штамів, культивовані на сусло-агарі. Для контрольного посіву використовували неопромінені міцелії. Каталазну активність у гомогенаті міцелію та культуральному фільтраті визначали спектрофотометрично. Встановлено, що лазерне опромінення червоним, синім і зеленим світлом упродовж 10 с викликає зростання каталазної активності культурального фільтрату й гомогенату міцелію майже усіх досліджуваних штамів. Для комплексного лазерного опромінення червоним і зеленим світлом не викликає вірогідних змін активності ферменту у вивчених штамів. Найбільшою реакцією у відповідь на опромінення синім світлом характеризувалися штами F–04 та F–vv гриба *F. velutipes*. Так, показник каталазної активності культурального фільтрату для штаму F–04 становив 780,41±15,46 мкат/л, а максимальне значення активності каталази міцелію для штаму F–vv гриба *F. velutipes* становило 1203,66±20,31 мкат/г. Інші вивчені штами мали менш суттєві зміни каталазної активності у відповідь на дію опромінення. Проведене нами дослідження дало змогу встановити загальні закономірності й індивідуальні особливості реакцій різних штамів *F. velutipes* на опромінення за допомогою світлодіодних лазерів і визначити ефективний режим фотоактивації, який дає можливість значно підвищити каталазну активність досліджуваного макроміцета.

Ключові слова: базидієві гриби, каталазна активність, лазерне опромінення

Каталаза є компонентом комплексного ензиматичного захисту живих організмів за умов оксидативного стресу [6]. Цей ензим використовується як компонент біосенсорів для кількісного визначення вмісту пероксиду водню й етанолу в біологічних об'єктах [4]. Препарати каталази використовують для наукових досліджень, у медицині як діагностичний реагент у харчовій, текстильній, шкіряній, електронній і хімічній галузях промисловості [3, 17]. Уперше виділено й досліджено властивості промислового препарату каталази з клітин печінки тварин, але такий препарат є дороговартісним. Розроблено методи виділення каталази з мікроміцетів родів *Penicillium* і *Aspergillus*. Однак цвілеві гриби синтезують мікотоксини, тому їхнє використання в біотехнології обмежене. Оскільки препарати ферменту каталази широко затребувані, доцільним є активний пошук його продуцентів серед різних груп організмів [1, 5, 7, 19, 21]. Одним із перспективних джерел цього ензиму

можуть стати базидієві гриби, які останнім часом використовують для його отримання. Відомий спосіб виділення каталази з макроміцетів *Pleurotus ostreatus*, *Schizophyllum commune*, *Fomes fomentarius*, *Daedalea quercina*, *Ganoderma lucidum*, *Laetiporus sulphureus*, *Flammulina velutipes*, *Fistulina hepatica*. Фермент, отриманий із цих грибів, використовують для одержання медичних препаратів широкого спектра дії [14–16, 18]. Вирощування кислотрофних грибів у даний час може стати перспективною економічною біотехнологією для переробки органічних відходів лігноцелюлози, що допоможе виробляти багаті на ензими продукти і сприятиме зменшенню забруднення навколишнього середовища [22]. Біосинтез і властивості каталаз грибного походження залишаються малодослідженими. Актуальною проблемою розвитку біотехнології є пошук продуцентів каталази серед різних груп організмів і розробка способів підвищення активності цього ферменту серед уже відомих його продуцентів. Відомо, що світло необхідне для росту й розвитку багатьох видів грибів. Досліджено вплив світла на такі фізіолого-біохімічні показники грибів як пігментування, біосинтетична активність [10]. Чутливість до червоного світла реалізується завдяки фітохрому – білковій молекулі, яка обумовлює морфогенетичні реакції різних організмів на світло. Чутливість до променів синьої ділянки спектра забезпечують фоторецептором на основі флавіну. Рецептори, які реагують на зелене світло, ще не досліджені [11]. Досліджено позитивний вплив УФ– і γ –опромінення на урожайність гриба *P. ostreatus*. Встановлено, що лазерне опромінення в дозах 45–230 мДж/см² стимулює проростання спор і ріст міцелію у *Hericium erinaceus* [24]. Відомий вплив низькоінтенсивного світла на лінійний ріст і накопичення біомаси різними видами макроміцетів (*Lentinus edodes*, *Hericium erinaceus*, *Ganoderma lucidum*, *Inonotus obliquus*, *Agaricus bisporus*) [9]. Аналіз робіт із вивчення механізмів фоторецепції у грибів дає змогу зробити висновок про можливість використання світла для регуляції морфогенезу та біологічної активності грибів, що стане основою для створення екологічно чистих технологій їхнього культивування. Крім того, лазерна фотоактивація міцелію є нешкідливим способом обробки, характеризується відсутністю утворення шкідливих метаболітів, які забруднюють навколишнє середовище. Для фотоактивації морфогенезу і біологічної активності макроміцетів використовують гелій–неонові й аргонові лазери, які є високовартісними, енергоємними та мають значні розміри, що суттєво ускладнює цей процес. Тому використання світлодіодних лазерів, які мають невелику вартість і потребують незначних енерговитрат у застосуванні є значно ефективнішим для інтенсифікації метаболізму грибів. Однак вплив світлодіодних лазерних систем на морфогенез і синтез макроміцетами ферментів досліджений недостатньо й потребує подальшого вивчення. Метою роботи було дослідити і порівняти вплив лазерного опромінення світлом видимого діапазону спектра на каталазну активність базидіоміцета *Flammulina velutipes*.

Матеріали та методи

Дослідження проводили на кафедрі фізіології та біохімії рослин Донецького національного університету імені Василя Стуса. Для дослідження було використано 5 штабів із колекції культур шапинкових грибів кафедри фізіології та біохімії рослин Донецького національного університету імені Василя Стуса, що належать до відділу *Basidiomycota*, порядку *Agaricales*: штами *Flammulina velutipes* (Curt.: Fr.) Sing. F–03, F–04, F–103, F–107, F–vv. Міцелій гриба культивували поверхнево в колбах Ерленмеєра на стандартному глюкозо–пептонному живильному середовищі (ГПС, рН 6,5±0,2), об'єм якого становив 50 мл. Температура культивування 27,5 °С. Тривалість ферментації 12 діб, що зумовлено максимумом каталазної активності саме в період експоненціального росту [25]. Матеріалами для дослідів слугували гомогенізований міцелій (МГ) і культуральний фільтрат (КФ). Для цьо-

го міцелій за 5 °С відділяли від культуральної рідини шляхом фільтрування, після чого фільтрат використовували для визначення КА. Міцелій додатково підсушували на фільтрувальному папері й охолоджували до +1 °С. Підготовлений міцелій гомогенізували в охолодженій ступці. КА визначали в міцелії (на одиницю маси, г) та у культуральному фільтраті (на одиницю об'єму, л) спектрофотометрично за О.В. Федотовим [14], ґрунтуючись на здатності пероксиду водню утворювати зі солями молібдену стійкий забарвлений комплекс. Інтенсивність забарвлення вимірювали на спектрофотометрі за довжини хвилі 410 нм проти нульової проби з дистильованою водою. За одиницю активності каталази приймали таку кількість ензиму, яка бере участь у перетворенні 1 мкмоль пероксиду водню за 1 с в заданих умовах [14]. Опромінення інокуому розміром близько 5×5 мм (завжди однієї щільності й віку) проводили перед посівом за допомогою світлодіодних лазерів: BRP-3010-5 з випромінюванням червоного спектра з довжиною хвилі 635 нм (виробник BOB LASER Co., Китай), BBP-3010-5 з випромінюванням синього спектра з довжиною хвилі 405 нм (виробник BOB LASER Co., Китай) та BGP-3010-5 з випромінюванням зеленого спектра з довжиною хвилі 532 нм (виробник BOB LASER Co., Китай). Потужність кожного лазера 100 мВт. Щільність енергії лазерного опромінення розраховували за І.О. Вакарчуком [2]. Енергія опромінення у всіх варіантах дослідження становила 51,1 мДж/см². Інокуюмом слугували 10-денні міцеліальні культури штамів на сусло-агарі. Для контрольованого посіву використовували неопромінений міцелій. Опромінення міцелію проводили за відповідною схемою (табл. 1).

Таблиця 1

Схема опромінення міцелію гриба *Flammulina velutipes*

Спектр опромінення	Варіанти опромінення						
	1(контроль)	2	3	4	5	6	7
	Тривалість опромінення, с						
Червоний	0	10	0	0	5	5	0
Синій	0	0	10	0	5	0	5
Зелений	0	0	0	10	0	5	5

Усі дослідження проводили у трикратній повторюваності. Для визначення вірогідності впливу лазерного опромінення на активність каталази застосовували метод дисперсійного аналізу. Порівняння середніх значень вели за методом Даннета [13]. Обробку проводили за допомогою пакета статистичних програм, створених на кафедрі фізіології рослин Донецького національного університету імені Василя Стуса [12].

Результати і їхнє обговорення

Результати дослідження свідчать про позитивний вплив лазерного опромінення різного спектра на каталазну активність культурального фільтрату і міцелію досліджуваних штамів базидіоміцета *F. velutipes*. Так, максимальне значення активності каталази культурального фільтрату для штаму F-03 гриба *F. velutipes* було встановлено в результаті опромінення синім світлом (варіант 3) – на 119,52 % більше порівняно з контролем. Випромінювання зеленого спектра вірогідно збільшило КА КФ на 73,35 % (варіант 4), а почергове опромінення синім і зеленим світлом – на 65,01 % (варіант 6) порівняно з контролем відповідно. Каталазна активність міцелію для даного штаму найбільше зросла в результаті впливу випромінювання також синього спектра на 72,92 % (варіант 3). Лазерне випромінювання червоного спектра та комплексне опромінення червоним і синім спектром збільшило КА МГ на 67,18 % (варіант 2) та на 32,70 % (варіант 5) відповідно (табл. 2). Зміни каталазної активності у культуральному фільтраті й міцелії за інших варіантів опромінення були невірогідними.

Таблиця 2

Вплив лазерного опромінення на каталазну активність культурального фільтрату і міцелію штаму F-03 гриба *Flammulina velutipes*

Варіант опромінення	Тривалість опромінення, с	Довжина хвилі, Нм	КА КФ мкат/л · 10 ³		КА МГ мкат/г · 10 ³	
			М±m	% до контролю	М±m	% до контролю
1.	Контроль (без опромінення)		354,62±19,24	100,00	589,42±20,76	100,00
2.	10	635	748,52±11,36	211,20	985,39±14,87*	167,18
3.	10	405	778,44±19,18*	219,52	1019,21±26,92*	172,92
4.	10	532	614,72±18,24*	173,35	819,46±19,25	139,03
5.	5+5	635+405	541,61±19,54	152,83	782,18±27,27*	132,70
6.	5+5	405+532	585,74±12,34*	165,01	799,24±15,23	135,60
7.	5+5	635+532	547,82±19,32	154,48	710,80±19,32	120,59

Примітки: КА – каталазна активність; КФ – культуральний фільтрат; МГ – гомогенат міцелію; М±m – середнє арифметичне значення ± похибка; * – P<0,05 порівняно з контролем

Результати впливу лазерного опромінення на каталазну активність культурального фільтрату й міцелію для штаму F-04 виявилися такими. Вірогідне збільшення КА культурального фільтрату на 115,84 % було зафіксовано у 3 варіанті опромінення (синій спектр). КА КФ 4 (зелений спектр) і 5 (червоний і синій спектри) варіантів опромінення вірогідно збільшилась на 77,75 % та на 50,97 % відповідно порівняно з контролем. За дії синього лазерного опромінення (варіант 2) КА міцелію зросла на 123,21 %, опромінення світлодіодним лазером, який випромінює зелене світло (варіант 3) підвищило КА на 110,73 %, а комплексне опромінення синім і зеленим світлом збільшило КА МГ на 74,18 % порівняно з таким самим показником у варіанті з неопромініним міцелієм відповідно (табл. 3).

Таблиця 3

Вплив лазерного опромінення на каталазну активність культурального фільтрату і міцелію штаму F-04 гриба *Flammulina velutipes*

Варіант опромінення	Тривалість опромінення, с	Довжина хвилі, нм	КА КФ мкат/л · 10 ³		КА МГ мкат/г · 10 ³	
			М±m	% до контролю	М±m	% до контролю
1.	Контроль (без опромінення)		361,16±17,04	100,00	450,88±18,88	100,00
2.	10	635	641,64±19,28	177,45	881,16±20,59	195,43
3.	10	405	780,41±15,46*	215,84	1006,39±16,73*	223,21
4.	10	532	642,71±11,22*	177,75	950,12±15,44*	210,73
5.	5+5	635+405	545,24±16,84*	150,97	798,68±20,23	177,14
6.	5+5	405+532	574,45±19,24	158,85	785,36±24,74*	174,18
7.	5+5	635+532	501,24±12,74	138,62	698,45±13,61	154,91

Примітки: КА – каталазна активність; КФ – культуральний фільтрат; МГ – гомогенат міцелію; М±m – середнє арифметичне значення ± похибка; * – P<0,05 порівняно з контролем

Для штаму F-103 гриба *F. velutipes* показники КА культурального фільтрату вірогідно зросли в результаті опромінення синім (варіант 3) і зеленим (варіант 4) світлом на 94,09 % та на 70,79 % відповідно порівняно з контрольним значенням. Опромінення синім (варіант 3) світлом збільшило показники КА міцелію на 87,28 %. Лазерне випромінювання зеленого спектра дії (варіант 4) збільшило КА міцелію на 64,66 %, а комплексне опромінення синім і зеленим світлом підвищило КА МГ на 42 % порівняно з контролем (табл. 4).

Результати для штаму F-107 базидіоміцета *F. velutipes* виявилися такими. Лазерне випромінювання червоного (варіант 2) і синього (варіант 3) спектра дії сприяло вірогідному збільшенню КА культурального фільтрату на 62,84 % та 77,56 % відповідно. Найменше вірогідне зростання КА КФ було встановлено в результаті дії лазерного випромінювання

червоного та синього спектра (варіант 5) – на 38,54 % відповідно порівняно з контролем. КА міцелію зросла також у результаті опромінення червоним (варіант 2) і синім світлом (варіант 3) на 58,78 % та 67,18 % відповідно. Комплексне лазерне випромінювання червоного та синього спектра дії (варіант 5) збільшило показник КА міцелію на 39,37 % (табл. 5).

Таблиця 4

Вплив лазерного опромінення на каталазну активність культурального фільтрату і міцелію штаму F-103 гриба *Flammulina velutipes*

Варіант опромінення	Тривалість опромінення, с	Довжина хвилі, нм	КА КФ мкат/л · 10 ³		КА МГ мкат/г · 10 ³	
			М±m	% до контролю	М±m	% до контролю
1.	Контроль (без опромінення)		385,25±14,16	100,00	526,69±16,19	100,00
2.	10	635	642,55±17,26	166,78	820,52±19,52	155,79
3.	10	405	747,72±11,26*	194,09	986,39±13,48*	187,28
4.	10	532	657,5±14,28*	170,79	867,25±16,92*	164,66
5.	5+5	635+405	54,34±19,36	140,33	687,82±21,11	130,59
6.	5+5	405+532	502,61±16,28	130,40	747,91±17,24*	142,00
7.	5+5	635+532	578,55±16,27	150,23	738,70±18,02	140,25

Примітки: КА – каталазна активність; КФ – культуральний фільтрат; МГ – гомогенат міцелію; М±m – середнє арифметичне значення ± похибка; * – P<0,05 порівняно з контролем

Таблиця 5

Вплив лазерного опромінення на каталазну активність культурального фільтрату і міцелію штаму F-107 гриба *Flammulina velutipes*

Варіант опромінення	Тривалість опромінення, с	Довжина хвилі, нм	КА КФ мкат/л · 10 ³		КА МГ мкат/г · 10 ³	
			М±m	% до контролю	М±m	% до контролю
1.	Контроль (без опромінення)		361,84±11,48	100,00	510,42±13,08	100,00
2.	10	635	589,15±11,22*	162,84	810,46±12,87*	158,78
3.	10	405	642,44±17,21*	177,56	853,34±19,72*	167,18
4.	10	532	665,51±11,24	183,94	870,92±14,20	170,63
5.	5+5	635+405	501,24±17,51*	138,54	711,36±19,68*	139,37
6.	5+5	405+532	578,45±13,74	159,86	749,97±15,91	146,93
7.	5+5	635+532	542,76±16,47	150,01	764,25±19,73	149,73

Примітки: КА – каталазна активність; КФ – культуральний фільтрат; МГ – гомогенат міцелію; М±m – середнє арифметичне значення ± похибка; * – P<0,05 порівняно з контролем

За дії лазерного опромінення червоним світлом (варіант 2) для штаму F-vv гриба *F. velutipes* показники КА культурального фільтрату зросли на 69,07 % порівняно з контролем. Опромінення у варіантах досліду 3 (синій спектр) і 4 (зелений спектр) збільшило показники КА фільтрату на 92,59 % і на 43,30 % відповідно. КА міцелію зросла в результаті опромінення червоним світлом (варіант 2) на 58,93 %. У варіанті 3 (синій спектр) показник КА міцелію збільшився на 114,90 %. Опромінення лазером, який випромінює зелене світло (варіант 4), збільшило КА міцелію на 45,36 %. У результаті комплексного опромінення (варіант 6) КА міцелію зросла на 48,52 % порівняно з контролем (табл. 6).

Згідно з одержаними результатами, можна зробити висновок про відмінність вивчених штамів у активності каталази КФ та МГ. Так, найвищий показник каталазної активності культурального фільтрату було зафіксовано для штаму F-vv, а максимальне значення КА гомогенату міцелію було встановлено для штаму F-03 гриба *F. velutipes*. Найнижчу КА КФ спостерігали у штаму F-03. Найнижче значення активності міцеліальної каталази було встановлено для штаму F-04. Це, найімовірніше, пояснюється індивідуальними характеристиками цих штамів (рис. 1).

Таблиця 6

Вплив лазерного опромінення на каталазну активність культурального фільтрату і міцелію штаму F-vv гриба *Flammulina velutipes*

Варіант опромінення	Тривалість опромінення, с	Довжина хвилі, Нм	КА КФ мкат/л · 10 ³		КА МГ мкат/г · 10 ³	
			М±m	% до контролю	М±m	% до контролю
1.	Контроль (без опромінення)		387,10±11,03	100,00	560,11±13,47	100,00
2.	10	635	654,51±15,26*	169,07	890,20±18,66*	158,93
3.	10	405	745,61±18,24*	192,59	1203,66±20,31*	214,90
4.	10	532	554,84±11,22*	143,30	814,16±13,74*	145,36
5.	5+5	635+405	542,64±14,27	140,16	764,25±15,36	136,45
6.	5+5	405+532	502,26±18,24	129,73	831,86±18,96*	148,52
7.	5+5	635+532	501,46±13,28	129,52	783,67±15,47	139,91

Примітки: КА – каталазна активність; КФ – культуральний фільтрат; МГ – гомогенат міцелію; М±m – середнє арифметичне значення ± похибка; * – P<0,05 порівняно з контролем

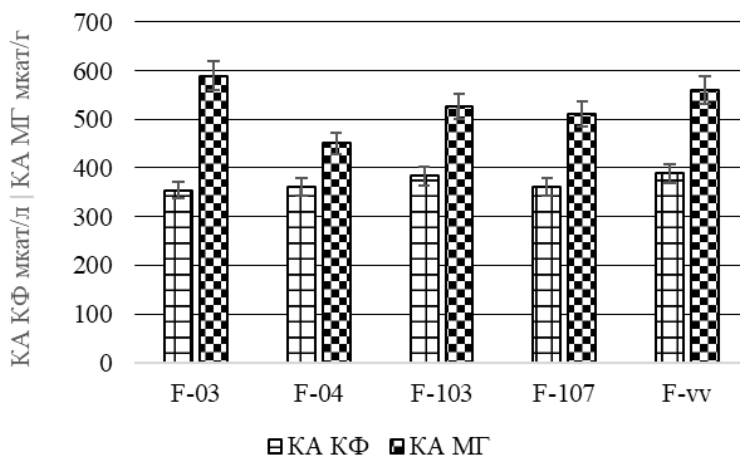


Рис. 1. Каталазна активність культурального фільтрату і міцелію штамів гриба *Flammulina velutipes*

Лазерне опромінення позитивно вплинуло на активність каталази культурального фільтрату і гомогенату міцелію. Зокрема, у культуральному фільтраті максимум каталазної активності було встановлено в результаті опромінення синім світлом штаму F-04 гриба *F. velutipes* – 780,41±15,46 мкат/л. Зростання активності каталази у гомогенаті міцелію було встановлено для штаму F-vv гриба *F. velutipes* також за дії лазерного опромінення синього спектра – з 560,11±13,47 мкат/г у контролі до 1203,66±20,31 мкат/г у досліді. Трохи гіршою була реакція у відповідь на дію опромінення синім світлом для штамів F-03, F-103, F-107 та F-vv гриба *F. velutipes* – активність каталази КФ вірогідно зросла на 77,56–119,52 %, а КА МГ за цього режиму опромінення вірогідно зросла для штамів F-03, F-103, F-107 та F-04 гриба *F. velutipes* від 67,18 до 123,21 % відповідно. Вірогідне зростання активності каталази КФ за дії лазерного опромінення червоного спектра було встановлено лише для штамів F-107 та F-vv на 62,84–69,07 % відповідно, а збільшення КА МГ лише для штамів F-03, F-107 та F-vv гриба *F. velutipes* – від 58,78 до 67,18 % відповідно. Опромінення зеленим світлом вірогідно збільшило показники КА КФ для штамів F-03, F-103, F-04 та F-vv гриба *F. velutipes* на 43,30–77,75 % відповідно, активність цього ферменту гомогенату міцелію зросла від 45,36 до 110,73% для штамів F-04, F-103 та F-vv гриба *F. velutipes*. Інші досліджені варіанти мали менш суттєві зміни каталазної функції у відповідь на опромінен-

ня, а дія комплексного опромінення червоним і зеленим світлом не викликає вірогідних змін активності ферменту у вивчених штамів. Згідно з даними Н.Л. Поєдинок, опромінення *I. obliquus* когерентним світлом як у синьому, так і у червоному діапазонах довжин хвиль також збільшувало активність позаклітинної каталази у 30 разів [23]. Ймовірно, це пояснюється тим, що лазерне опромінення стимулює посилене утворення АТФ, збільшуючи активність окисно-відновних ферментів, активізує метаболізм клітин і підвищує їхню функціональну активність. Результати наших досліджень із впливу лазерного опромінення на каталазну активність *F. velutipes* вписуються в сучасні уявлення про механізми фоторегуляції фізіолого-біохімічних і морфогенетичних процесів у живих організмах [20].

Отже, в результаті проведених досліджень було встановлено, що лазерне опромінення червоним, синім і зеленим світлом упродовж 10 с викликає зростання каталазної активності культурального фільтрату й гомогенату міцелію майже усіх досліджуваних штамів. Дія комплексного лазерного опромінення червоним і зеленим світлом не викликає вірогідних змін активності ферменту у вивчених штамів. Найбільшою реакцією у відповідь на опромінення синім світлом характеризувалися штами F-04 та F- $\nu\nu$ гриба *F. velutipes*. Інші вивчені штами мали менш суттєві зміни каталазної активності у відповідь на дію опромінення. Проведене нами дослідження дало змогу встановити загальні закономірності й індивідуальні особливості реакцій різних штамів *F. velutipes* на опромінення світлом різних ділянок видимого діапазону спектра і визначити ефективний режим лазерної фотоактивації, який дає можливість значно підвищити каталазну активність досліджуваного макроміцета.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Буценко Л. М., Пенчук Ю. М., Пирог Т. П. Технології мікробного синтезу лікарських засобів: навч. посіб. К.: НУХТ, 2010. 323 с.
2. Вакарчук І. О. Квантова механіка: підручник. 4-ге вид. Львів: ЛНУ імені Івана Франка, 2012. 872 с.
3. Волошко Т. С. Скринінг штамів базидіомицетів за активністю антиоксидантних оксидоредуктаз // Мікробіологія і біотехнологія. 2011. № 4 (16). С. 69–81.
4. Еремін А. Н. Кинетическая характеристика внеклеточных каталаз грибов *Penicillium ricescit* F-648 и их вариантов, адаптированных к пероксиду водорода // Прикл. биохим. микробиол. 2002. Т. 38. № 4. С. 374–380.
5. Лобанок А. Г. Биотехнология микробных энзимов // Наука и инновации. 2011. № 1 (95). С. 66–69.
6. Мирошниченко О. С. Биогенез, физиологическая роль и свойства каталазы // Биополимеры и клетка. 1992. Т. 8. № 6. С. 3–25.
7. Михайлова Р. В., Осока О. М., Лобанок А. Г. Образование внеклеточной каталазы видами рода *Penicillium* // Микол. фитопатология. 2001. Т. 35. Вып. 3. С. 43–46.
8. Пат. 8739 Україна, МПК C12N1/14(2006.01), A01G1/04(2006.01). Спосіб одержання ферментного препарату каталази штаму *Pleurotus ostreatus* P-208 / Федотов О.В., Волошко Т.С. (Україна); № u201310997; Заявл. 16.09. 2013; Опубл. 10.07.2014, Бюл. № 13. 5 с.
9. Поєдинок Н.Л. Использование искусственного света в биотехнологиях культивирования грибов // *Biotechnology Acta*. 2013. Vol. 6. N 6. P. 58–70.
10. Поєдинок Н.Л., Потёмкина Ж. В., Бухало А. С. и др. Использование лазерного излучения при культивировании некоторых видов съедобных базидиомицетов // Биотехнология. 2003. № 2. С. 59–64.

11. *Поєдинок Н. Л.* Енергоефективні системи штучного освітлення у технологіях вирощування їстівних та лікарських грибів // Наука та інновації. 2013. Т. 9. № 3. С. 46–59.
12. *Приседський Ю. Г.* Пакет програм для проведення статистичної обробки результатів біологічних експериментів. Донецьк: ДонНУ, 2005. 84 с.
13. *Приседський Ю. Г.* Статистична обробка результатів біологічних експериментів. Донецьк: Кассиопея, 1999. 210 с.
14. Пат. 39243А Україна, МПК 7С12N9/58. Спосіб визначення каталазної активності базидіоміцетів / Федотов О. В., Гавриленко Г. В. (Україна); № u2000116560; Заявл. 21.11.2000; Опубл. 15.06.2001, Бюл. № 5. 5 с.
15. *Стручкова И. В., Лазарева Е. С., Смирнов В. Ф.* Амилазная и оксидоредуктазная активность микодеструктора *Aspergillus terreus* при его росте на новых полимерных материалах // Вестн. Нижегородск. ун-та им. Н.И. Лобачевского. 2010. № 2 (2). С. 591–595.
16. *Федотов О. В.* Розробка способів отримання і аналіз ферментних препаратів пероксидаз та каталаз деяких видів базидіоміцетів // Біол. вісн. Мелітополь. держ. пед. ун-ту ім. Б. Хмельницького. 2013. № 1 (7). С. 113–127.
17. *Amorim A. M.* The application of catalase for the elimination of hydrogen peroxide residues after bleaching of cotton fabrics // Ann. Brasil. Acad. Sci. 2002. Vol. 74. N 3. P. 433–436.
18. *Fedotov O. V.* Wood-destroying fungi as bio-sources of ferments for medicinal and nutritional purposes // Plant and Microbial Enzymes: isolation, characterization and biotechnology applications. Tbilisi: Myza. 2009. P. 125–126.
19. *Fraaije M., Roubroeks H. P., Hagen W. R.* et al. Purification and characterization of an intracellular catalase-peroxidase from *Penicillium simplicissimum* // Eur. J. Biochem. 1996. Vol. 235. P. 192–198.
20. *Karu T. I.* Light coherence. Is this property important for photomedicine? [Електронний ресурс]. 2011. Режим доступу до журн.: <http://www.photobiology.info/Coherence.html>
21. *Kurakov A. V., Kupletskaya M. B., Skrynnikova E. V., Somova N. G.* Search for micromycetes producing extracellular catalase and study of conditions of catalase synthesis // Appl. Biochem. Microbiol. 2001. Vol. 37. N 1. P. 59–64.
22. *Obodai M., Cleland-Okine J., Vowotor K.* Comparative study on the growth and yield of pleurotus ostreatus mushroom on different lignocellulosic by – products // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2003. Vol. 30 (3). P. 146–149.
23. *Poyedinok N. L.* Effect of light wavelengths and coherence on growth, enzymes activity and melanin production of liquid cultured *Inonotus obliquus* (Ach.:Pers.) Pilát // Appl. Biochem. Biotechnol. 2015. Vol. 176. N 2. P. 333–343.
24. *Poyedinok N. J., Potemkina V., Buchalo A.* Stimulation with low-intensity laser light of basidiospore germination and growth of monocaryotic isolates in Medicinal Mashroom *Hericium erinaecus* (Bull.: Fr.) Pers. (*Aphylllophoromycetidae*) // Int. J. Med. Mushr. 2000. Vol. 2. N 4. P. 339–342.
25. *Voloshko T., Fedotov O.* Comparative characteristics of basidiomycetes – producers of catalase // Biotechnologia Acta. 2013. Vol. 6 (3). P. 89–94.

Стаття: надійшла до редакції 20.02.19

доопрацьована 06.06.19

прийнята до друку 14.06.19

**THE EFFECT OF LASER IRRADIATION ON BASIDIOMYCETE
FLAMMULINA VELUTIPES (CURT.: FR.) SING. CATALASE ACTIVITY**

K. Reshetnyk, D. Yuskov

*Vasyl Stus Donetsk National University
21, 600-richchia St., Vinnytsia 21021, Ukraine
e-mail: k.reshetnyk@donnu.edu.ua*

It has been studied the effect of laser irradiation of different spectrum on the catalase activity of the culture filtrate and the mycelium homogenate of 5 strains of basidiomycetes *Flammulina velutipes* (Curt.:fr.) Sing. at their surface cultivation on a standard glucose-peptone medium. The irradiation of the inoculum sized approximately 5x5 mm (always the same density and age) was carried out before the inoculation with the help of such LED lasers: BRP-3010-5 with red laser light (wavelength 635 nm), BBP-3010-5 with blue laser light (wavelength 405 nm) and BGP-3010-5 with green laser light (wavelength 532 nm). Each laser power was 100 MW. The irradiation energy at all the experiment variants was 51.1 MJ/m². The 10-day mycelial culture of the strains on wort-agar served as inoculum. The non-irradiated mycelium was used for the control inoculation. The catalase activity in the mycelium homogenate and the culture filtrate was defined spectrophotometrically. It was found out that the laser light of red, blue and green spectra for 10 s caused the increase of the catalase activity of the culture filtrate and the mycelium homogenate of all the strains under research. The effect of complex laser irradiation of red and green spectra does not cause probable changes of the ferment activity of the strains under research. The biggest reaction to blue laser light had the strains F-04 and F-vv of *F. velutipes*. Thus, the indicator of the catalase activity of the culture filtrate for the strain F-04 was 780.41±15.46 mcat/l, the maximum value of the catalase activity of mycelium for the strain F-vv of *F. velutipes* was 1203.66±20.31 mcat/g. The other strains under analysis showed less significant catalase activity change in response to irradiation. The research carried out allowed to determine the general consistent patterns and individual peculiarities of different strains of *F. velutipes* reactions to irradiation spectrum and to identify the sufficient laser photoactivation mode greatly increasing the catalase activity of studied macromycetes.

Keywords: basidiomycota, catalase activity, laser irradiation

АНТИОКСИДАНТНА СИСТЕМА ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ЗА УМОВ ГОСТРОГО ГЕПАТИТУ ПІД ЧАС КОРЕКЦІЇ КОМПЛЕКСАМИ АНТИОКСИДАНТІВ

Я. Діордіца

*Херсонський державний університет
вул. Університетська, 27, Херсон 73000, Україна
e-mail: diorditsa_yv@ukr.net*

Досліджено динаміку процесів перекисного окиснення ліпідів і стан ферментної ланки антиоксидантної системи печінки щурів за умов гострого токсичного гепатиту й під час корекції комплексами антиоксидантів «Тріовіт» + кверцетин і «Тріовіт» + кверцетин + α -ліпоева кислота. Дослідження проводили з використанням білих лабораторних щурів лінії Wistar, які поділені на чотири групи (по 6 у кожній): I група – контрольна; II, III та IV групи – щури, у яких експериментально моделювали гострий гепатит за допомогою одноразового внутрішньоочеревинного введення розчину гідразин сульфату в концентрації 100 мг/кг. Тваринам третьої та четвертої груп, окрім гідразин сульфату, вводили комплекси антиоксидантів протягом 5 діб: III групи – «Тріовіт» і кверцетин, а IV групи – «Тріовіт», кверцетин і ліпоеву кислоту. На 7 добу тварин усіх чотирьох груп виводили з експерименту під тіопенталовим наркозом за допомогою тотального кровопускання зі серця. У гомогенаті печінки визначали рівень малонового діальдегіду (МДА), дієнових кон'югатів (ДК), супероксиддисмутази (СОД), каталази.

Доведено, що внутрішньоочеревинне введення гідразину сульфату тваринам II групи спричиняє зростання концентрації продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) – ДК та МДА, на фоні зниження активності СОД і зростання активності каталази порівняно з контрольною групою. Під час корекції гепатиту комплексами антиоксидантів, що включають «Тріовіт» і кверцетин, а також «Тріовіт», кверцетин і α -ліпоеву кислоту, спостерігається вірогідне зниження рівня ДК і МДА та зростання активності СОД порівняно з тваринами, що не отримували корекції. Вірогідне зниження активності каталази спостерігається за використання комплексу «Тріовіт», кверцетин і ліпоева кислота. Корекція гепатиту за допомогою комбінації антиоксидантів, що включає «Тріовіт» і кверцетин, має більш виражений позитивний вплив на зниження інтенсивності процесів ПОЛ і збільшення активності СОД порівняно з комплексом антиоксидантів, що включає «Тріовіт», кверцетин і α -ліпоеву кислоту.

Пероральне введення комплексу антиоксидантів тваринам III та IV груп нормалізує процеси ПОЛ і активність ферментів антиоксидантного захисту в печінці щурів, що свідчить про потужні антиоксидантні властивості препаратів і доцільність їхнього використання у корекції гепатитів.

Ключові слова: гострий гепатит, дієнові кон'югати, малоновий діальдегід, каталаза, супероксиддисмутаза, комплекс антиоксидантів

У розвитку патологій печінки провідна роль належить процесам ПОЛ, що супроводжуються надмірним утворенням вільних радикалів і активних форм кисню [28]. Одним із основних субстратів для вільнорадикальних реакцій є ліпіди, у результаті окиснення яких утворюються продукти пероксидації – ДК та МДА. Ці речовини проявляють цитотоксичну та мутагенну дію, спричиняючи окиснення мембранних фосfolіпідів [25]. Продукти ПОЛ є маркерами ушкодження тканин, оскільки за їхнім вмістом можна судити про інтенсивність вільнорадикальних процесів у різних системах організму [1].

Для зменшення інтенсивності вільнорадикальних процесів у організмі діє антиоксидантна система, яка контролює і гальмує всі етапи реакцій утворення вільних радикалів [11]. За нормальних фізіологічних умов швидкість ПОЛ і активність антиоксидантної системи врівноважені. Проте за патологічних умов рівновага зсувається в бік активізації процесів ПОЛ, що є потенційною передумовою виникнення оксидативного стресу та відіграє провідну роль у розвитку патологій різної етіології [3, 15].

Ключовим ферментом антиоксидантного захисту організму є супероксиддисмутаза (СОД, КФ 1.15.1.1.), що забезпечує переривання ланцюгів кисневозалежних вільнорадикальних реакцій за допомогою дисмутації супероксидного аніон-радикалу ($O_2^{\cdot -}$) з утворенням гідроген пероксиду, який може бути попередником найбільш токсичного гідроксильного радикалу (ОН \cdot) і триплетного кисню [6]. Для знешкодження пероксиду гідрогену клітини використовують каталазу (КАТ, КФ 1.11.1.6). Цей фермент, у свою чергу, перетворює пероксид гідрогену на воду та молекулярний кисень [11, 18].

Негативний вплив продуктів ПОЛ на організм і систему антиоксидантного захисту, зокрема, може бути зменшений за рахунок уведення екзогенних антиоксидантів – хімічних речовин, що мають здатність зв'язувати вільні радикали, знижуючи інтенсивність процесів окиснення в організмі [2, 16]. Як гепатопротектори використовують антиоксиданти, що інгібують процеси ПОЛ, стабілізують мембрани гепатоцитів і прискорюють регенеративні процеси в печінці. Такий ефект виявляють вітаміни групи А, Е, С, флавоноїди, ліпоєва кислота і препарати, що містять селен.

Ліпоєва кислота – ендogenous тіол, що інактивує всі відомі вільні радикали. Вона є ідеальним антиоксидантом, оскільки легко проникає крізь клітинні мембрани та проявляє антиоксидантні властивості як у цитоплазмі, так і в мембранах. Антиоксидантні властивості ліпоєвої кислоти зумовлені наявністю в її молекулі двох тіолових груп, здатних зв'язувати молекули радикалів, запобігаючи їхній участі у процесах перекисного окиснення ліпідів. Ліпоєва кислота має здатність регенерувати ендogenous антиоксиданти, такі як вітаміни С та Е, а також глутатіон [8]. У роботі Stanković і Mladenović [27] відмічено, що використання ліпоєвої кислоти на фоні неалкогольної жирової хвороби печінки у дозі 100 мг/кг на добу викликає зниження рівня МДА в печінці, покращує антиоксидантну здатність печінки за рахунок підвищення активності СОД і вмісту глутатіону, сприяє збільшенню концентрації насичених жирних кислот.

Для корекції гепатитів також широко використовують флавоноїди. Вони є потужними антиоксидантами, що відіграють важливу роль у запобіганні порушенням функцій печінки за різноманітних патологічних станів, прискорюють регенерацію та відновлюють функцію гепатоцитів [23].

Кверцетин – природний флавоноїд, що має виражену антиоксидантну активність. Він знижує концентрацію ТБК-активних продуктів у крові та печінці, сприяє відновленню активності глутатіону, СОД і каталази, що підвищує антиоксидантний захист печінки [7]. Антиоксидантні властивості кверцетину зумовлені наявністю в його молекулі великої кількості гідроксильних груп і кон'югованих π -орбіталей атомів Карбону. Він інактивує супероксидний ($O_2^{\cdot -}$), гідроксильний (ОН \cdot) і ліпідний пероксидний радикали (LOO \cdot) [4], інгібує синтез медіаторів запалення й активність окисних ферментів, що відповідають за утворення вільних радикалів і викликають окиснення ліпопротеїдів низької щільності [19].

Препаратом із вираженою антиоксидантною активністю є «Тріовіт». До його складу входять: токоферолу ацетат, аскорбінова кислота, β -каротин (провітамін А) та мікроелемент селен. «Тріовіт» нормалізує рівень ПОЛ і активність антиоксидантної системи, усуває патологічну дію вільних радикалів [14].

Аскорбінова кислота підсилює антиоксидантну дію α -токоферолу й інтенсифікує його метаболізм в організмі. Відзначено також посилення цього ефекту за наявності біофлавоноїдів. Встановлено, що в поєднанні з флавоноїдами аскорбінова кислота значно ефективніше пригнічує окисні процеси [21].

У зв'язку з цим вивчення можливостей застосування різних комбінацій антиоксидантів у корекції токсичних гепатитів і дослідження можливостей їхнього впливу на процеси ПОЛ мають важливе науково-практичне значення.

Мета роботи – дослідити ефекти п'ятиденного введення комплексів антиоксидантів «Тріовіт» + кверцетин і «Тріовіт» + кверцетин + α -ліпоева кислота на динаміку показників ПОЛ й ферментну ланку системи антиоксидантного захисту печінки щурів за умов експериментального гострого гепатиту.

Матеріали та методи

Досліди проводили на білих лабораторних щурах-самках лінії Wistar середньою масою 280 г, яких утримували у стандартних умовах віварію. Протягом усього експерименту щурів забезпечували стандартним раціоном харчування і вільним доступом до води. Усі маніпуляції проводили з дотриманням принципів роботи з лабораторними тваринами відповідно до положень «Європейської конвенції захисту хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985).

Тварин було поділено на чотири групи по 6 особин у кожній: I група – контроль; II – гострий токсичний гепатит, зумовлений одноразовим внутрішньоочеревинним введенням розчину гідразину сульфату (100 мг/кг) [26]; III – гострий токсичний гепатит (гідразину сульфат 100 мг/кг) і введення препаратів «Тріовіт» (50 мг/кг) + «Кверцетин» (20 мг/кг); IV – гострий токсичний гепатит (гідразин сульфат 100 мг/кг) і введення препаратів «Тріовіт» (50 мг/кг), «Кверцетин» (20 мг/кг) і α -ліпоевої кислоти (100 мг/кг). Тварини III та IV груп отримували комплекси препаратів після інтоксикації гідразину сульфатом, один раз на добу, протягом 5 діб. Щурів виводили з експерименту під тіопенталовим наркозом за допомогою тотального кровопускання зі серця на 7 добу від початку експерименту. Відбирали печінку, промивали у фізіологічному розчині (0,9 % розчин натрію хлориду), зважували для встановлення коефіцієнта маси печінки (співвідношення маси печінки до маси тіла) та використовували її для подальших досліджень. Препарати гомогенної фракції печінки отримували методом диференційного центрифугування [20].

Рівень маркерів ПОЛ – ДК визначали за здатністю утворювати систему спряжених подвійних зв'язків у молекулах жирних кислот на стадії утворення вільних радикалів за методом Левицького та ін. [13]. ТБК-активні продукти визначали фотометрично за концентрацією забарвленого комплексу, що утворюється під час взаємодії МДА з тіобарбітуровою кислотою (ТБК) за нагрівання у кислому середовищі за методом Стальної [22].

Активність СОД визначали за здатністю ферменту конкурувати з нітросинім тетразолієм за супероксидні аніони за методом Чеварі [24]. За одиницю активності СОД приймали таку кількість СОД, яка за додавання до суміші знижує швидкість неінгібованої реакції на 50 % і виражається в умовних одиницях активності на 1 г білка.

Активність каталази визначали за здатністю гідроген пероксиду утворювати зі солями молібдену стійкий комплекс жовтогарячого кольору, за методом Королюк та ін. [9].

Статистичну обробку результатів досліджень проводили за допомогою програми BioStat 2008 5.8.4.3 для Windows. Вірогідність різниці між вибірками оцінювали за t-критерієм Стюдента. Розбіжності вважали вірогідними за $P < 0,05$.

Результати і їхнє обговорення

За результатами проведеного експерименту встановлено, що інтоксикація шурів гідразин сульфатом у тварин II дослідної групи викликає зміну всіх досліджуваних параметрів. Відмічено зниження маси тіла, збільшення маси печінки та вірогідне збільшення коефіцієнта маси печінки на 60 % порівняно з контрольною групою (табл. 1). Під час використання для корекції комплексу антиоксидантів «Тріовіт» + кверцетин (III група) спостерігаємо зростання маси тіла, зменшення маси печінки та зниження коефіцієнта маси печінки на 34,5 % порівняно з II групою, тварини якої не отримувала антиоксидантів. За використання для корекції комплексу антиоксидантів «Тріовіт» + кверцетин + α -ліпоєва кислота (IV група) спостерігаємо зростання маси тіла шурів і маси печінки. При цьому спостерігається зниження коефіцієнта маси печінки на 29,7 % щодо тварин II групи.

Таблиця 1

Вплив комплексів антиоксидантів на масу тіла та печінки шурів
на фоні гострого гепатиту

Групи шурів	Маса тіла шурів після виведення з експерименту, г	Маса печінки, г	Коефіцієнт маси печінки, %
I група	273±14	8,04±0,8	29,5±1,3
II група	226±15 #	9,41±1,08	41,6±1,4 #
III група	283±13 *	8,72±0,3	30,8±1,4 *
IV група	331±8 #, *	11,03±0,7 #	33,3±2,1 *

Примітка: # P<0,05 порівняно з I групою; * P<0,05 порівняно з II групою

У результаті проведених досліджень встановлено, що введення гідразину сульфату тваринам II групи зумовило активацію ПОЛ у тканинах печінки, що підтверджується вірогідним зростанням показників ДК у печінці на 28 % порівняно з контрольною групою (рис. 1). Введення комплексу «Тріовіт» + кверцетин тваринам III групи на фоні гострого гепатиту призвело до вірогідного зниження рівня ДК на 35 % порівняно з II групою, що не отримувала антиоксидантів. У тварин IV групи, що отримували «Тріовіт», кверцетин і ліпоєву кислоту на фоні гострого гепатиту, спостерігалось зниження ДК на 11 % порівняно з тваринами II групи, однак отримані показники були на 36,6 % вищі, ніж у тварин III групи. Отримані дані свідчать про позитивний вплив комплексів антиоксидантів на показники ДК у тварин III та IV груп. Проте комплекс антиоксидантів, що містив α -ліпоєву кислоту, не спричиняв достовірного зниження показників ДК порівняно з тваринами, що не отримували корекцію антиоксидантами.

Інтоксикація гідразин сульфатом тварин II групи викликає вірогідне зростання показників МДА на 73 % порівняно з інтактною групою (рис. 1), а це є ще одним маркером інтенсивності ПОЛ і розвитку окисного стресу. Введення «Тріовіту» і кверцетину тваринам III групи на фоні гепатиту призвело до зниження показників МДА на 73,4 % порівняно з II групою. За введення комплексу антиоксидантів тваринам четвертої групи показники МДА знизилися на 58 % порівняно з II групою, але були вищими на 57 % порівняно з тваринами III групи.

Збільшення концентрації продуктів ПОЛ у печінці можна пояснити надлишком вільних радикалів і активних форм кисню, що утворилися внаслідок пошкодження мембран гепатоцитів гідразин сульфатом. Це свідчить про розвиток окисного стресу.

Захисним механізмом організму, що запобігає розвитку окисного стресу, є антиоксидантна система. Ключову роль у регуляції рівня вільних радикалів, у тому числі активних форм кисню, виконують каталаза та супероксиддисмутаза.

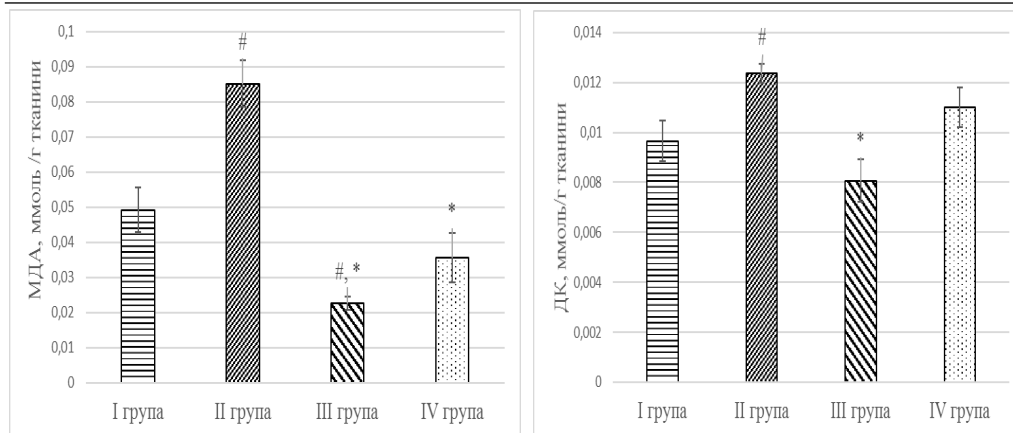


Рис. 1. Вміст продуктів ПОЛ у печінці щурів за умов гострого гепатиту та за корекції комплексами антиоксидантів

Примітка: # $P < 0,05$ порівняно з I групою; * $P < 0,05$ порівняно з II групою

За введення гідразин сульфату в гепатоцитах тварин II групи спостерігається вірогідне зниження активності СОД на 19 % порівняно з контролем (рис. 2), що свідчить про ослаблення ферментативного захисту клітин від реакцій вільнорадикального окиснення ліпідів. Пригнічення активності СОД може бути зумовлене виснаженням пулу ферменту внаслідок інтенсивнішого його використання на нейтралізацію вільних радикалів, утворення яких посилювалося за умов гострого гепатиту.

Зниження активності СОД у печінці за умов розвитку гепатиту відмічають й інші автори [5, 9]. За введення комбінації антиоксидантів «Тріовіт» і кверцетин тваринам III групи активність СОД підвищилася на 15,6 % порівняно з II групою, що не отримувала антиоксидантів. За корекції окисного стресу комплексом антиоксидантів у складі «Тріовіту», кверцетину та ліпоєвої кислоти активність СОД характеризувалася тенденцією до зростання щодо показників тварин III групи та зросла на 19,5 % щодо II групи. У тварин IV групи спостерігалася зростання активності СОД до рівня контролю.

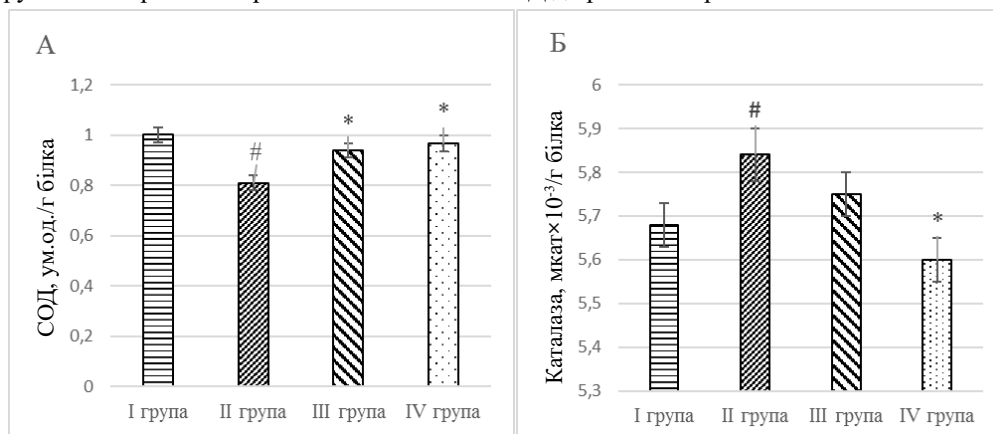


Рис. 2. Активність СОД (А) та каталази (Б) у печінці щурів за умов гострого гепатиту і за використання комплексів антиоксидантів

Примітка: # $P < 0,05$ порівняно з I групою; * $P < 0,05$ порівняно з II групою

Оскільки СОД утилізує активні форми кисню з утворенням пероксиду гідрогену, то важливим для життєдіяльності клітин є встановлення балансу між СОД і ферментом, який окиснює пероксид гідрогену – каталазою.

Введення гідразин сульфату тваринам II групи приводить до вірогідного зростання її активності порівняно з контрольною групою. Зростання активності каталази може бути пов'язане з активацією компенсаторних механізмів захисту організму у відповідь на окисний стрес, що необхідно для підтримання гомеостазу. За умов введення комплексу антиоксидантів «Тріовіт» + кверцетин спостерігаємо тенденцію до зниження активності каталази щодо тварин II групи. За використання для корекції гепатиту комплексу антиоксидантів, що включає «Тріовіт» + кверцетин + ліпоєву кислоту, спостерігається вірогідне зниження ферментативної активності каталази порівняно з тваринами II групи, що свідчить про антиоксидантні властивості комплексу (рис. 2).

Аналізуючи отримані результати, слід відмітити, що одноразове введення гідразин сульфату викликає біохімічні зміни в печінці, що підтверджується збільшенням маси печінки й індексу маси печінки, а також вірогідними змінами показників ДК, МДА, СОД, каталази. Комплекс антиоксидантів, що містить «Тріовіт» і кверцетин, позитивно впливає на стан ПОЛ та систему антиоксидантного захисту печінки за умов окисного стресу, що супроводжуються зростанням активності СОД і зменшенням активності каталази та концентрації продуктів ПОЛ – МДА та ДК. При цьому спостерігається зменшення маси печінки та зниження індексу маси печінки до маси тіла, порівняно з тваринами II групи. Використання комплексу «Тріовіт» + кверцетин + α -ліпоєва кислота зумовило зниження рівня МДА, проте несуттєво знизило показники ДК порівняно з тваринами, що не отримували корекції антиоксидантами. При цьому зросла активність СОД і знизилась активність каталази. У результаті корекції цим комплексом також спостерігається збільшення маси печінки та зниження індексу маси печінки до маси тіла, порівняно з тваринами що не отримували корекції, проте одержані показники були трохи вищими стосовно даних тварин III групи.

Обидва використаних комплекси позитивно впливають на показники ПОЛ і активність ферментів антиоксидантного захисту печінки, сприяючи відновленню цих показників до нормальних значень. Комплекс «Тріовіт» + кверцетин є більш ефективним для корекції гострих гепатитів, ніж комплекс «Тріовіт» + кверцетин + α -ліпоєва кислота. Прооксидантні властивості ліпоєвої кислоти на початкових етапах застосування можуть бути пов'язані з тим, що вона відновлюється в цитоплазмі клітини глутатіонпероксидазою до дегідроліпоєвої кислоти з використанням НАДФН, а потім переходить у позаклітинне середовище, де швидко окиснюється і знову надходить у клітину. Ці процеси тривають до встановлення рівноваги дегідроліпоєвої кислоти, що значно виснажує запас НАДФН та пригнічує глутатіонову антиоксидантну систему [12].

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Барабой В. А. Биоантиоксиданты. К.: Книга плюс, 2006. 462 с.
2. Барабой В. А., Сутковой Д. А. Окислительно-антиоксидантный гомеостаз в норме и патологии: в 2 ч. Ч. 1. К.: Чернобыльинтеринформ, 1997. 202 с.
3. Бішко О. І. Вільнорадикальні процеси за введення щурам гістаміну та гіпохлориту натрію: дис. ... канд. біол. наук: 03.00.02. Львів, 2016. 170 с.
4. Вильчинская Т. Кверцетин и его роль как антиоксиданта, цитостатика и онкопротектора // Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія. 2014. № 1–2 (70–71). С. 55–58.

5. Галенова Т. І., Геруш І. В. Стан пероксидного окиснення ліпідів і активність ферментів антиоксидантної системи печінки за умов гострого токсичного гепатиту та дії настоянки ехінацеї пурпурової // Клінічна фармація. 2001. Т. 5. № 4. С. 49–51.
6. Галенова Т. І., Ракиша Н. В., Савчук О. М. Зміна біохімічного профілю організму за умов тетрахлорметан-індукованого ураження печінки у щурів // Scientific Journal «ScienceRise:Biological Science». 2016. № 2(2). С. 47–54.
7. Доркина Е. К., Сергеева Е. О., Оганесян Э. Т., Парфентьева Е. П. Влияние биофлавоноидов на перекисное окисление липидов и антиоксидантные системы печени крыс при остром алкогольном отравлении // Вестн. Вол ГМУ. 2007. № 3 (23). С. 50–52.
8. Журавлева Л. В., Кривоносова Е. М. Влияние сочетаной терапии альфа-липоевой кислоты и бенфотиамина на течение неалкогольной жировой болезни печени // Практикуючий лікар. 2014. № 4. С. 42–47.
9. Задоріна О. В. Ферменти антиоксидантної системи печінки щурів за умов отруєння хлоридом кадмію або 1,2-дихлоретаном // Современные проблемы токсикологии. 2008. № 3. С. 68–72.
10. Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова Н. Т. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. 1988. № 1. С. 16–18.
11. Лавришин Ю. Ю., Вархоляк І. С., Мартишук Т. В. та ін. Біологічне значення системи антиоксидантного захисту організму тварин // Наук. вісн. Львів. нац. ун-ту ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С. З. Гжицького. 2016. Т. 18. № 2 (66). С. 100–111.
12. Лалетин В. С., Колесниченко Л. С. Липоевая кислота как потенциальный прооксидант // Сибирский мед. журнал. 2010. № 1. С. 72–74.
13. Левицький А. П., Макаренко О. А., Ходаков И. В. Методы исследования жиров и масел: метод. рекомендации. Одесса: КП «ОГТ», 2015. 32 с.
14. Лихацька Г. В. Структурно-функціональні зміни печінки та мінеральної щільності кісткової тканини та їх корекція у хворих на виразкову хворобу: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.36. Івано-Франківськ, 2006. 19 с.
15. Нагорная Н. В., Четверик Н. А. Оксидативный стресс: влияние на организм человека, методы оценки // Здоровье ребенка. 2010. № 2(23). С. 140–145.
16. Особа І. А. Особливості функціонування системи антиоксидантного захисту організму // Рибогосподарська наука України. 2009. № 1. С. 133–139.
17. Подымова С. Д., Давлетнина И. В. Эффективность применения α-липоевой кислоты (берлитиона) у больных неалкогольным стеатогепатитом // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2008. № 5. С. 77–84.
18. Резніков О. Г., Полумбрик О. М., Бальон Я. Г. Про- та антиоксидантна системи і патологічні процеси в організмі людини // Вісн. НАН України. 2014. № 10. С. 17–29.
19. Роговський В. С., Матюшин А. И., Шимановский Н. Л. Перспективы применения препаратов кверцетина для профилактики и лечения атеросклероза // Международный. мед. журнал. 2011. № 3. С. 114–118.
20. Северина С. Е., Соловьёва Г. А. Практикум по биохимии: учеб. пособ. М.: Изд-во МГУ, 1989. 509 с.
21. Смірнов О., Косик О. Флавоноїди рутин та кверцетин. Біосинтез, будова, функції // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2011. Вип. 56. С. 3–11.
22. Стальная И. Д., Гаршивили Т. Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии / ред. В.Н. Орехович. М.: Медицина, 1977. С. 66–68.

23. Харченко Ю. А. Влияние биофлавоноидного комплекса лиственицы на физиологическое состояние, биохимический состав крови поросят и функциональное состояние печени крыс: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.03.01. Белгород, 2013. 19 с.
24. Чевари С. Роль СОД в окислительных процессах и метод определения ее в биологических материалах // Лаб. дело. 1985. № 11. С. 678–680.
25. Чумакова А. С., Теплый Д. Л., Нестерова Ю. В. Изменение свободнорадикальных процессов в различных органах крыс разного возраста при остром стрессе // Биол. исследования. 2009. № 4. С. 34–37
26. Khanturin M. R., Saspugayeva G. E., Beysenova R. R. Morpho-functional blood changes under the influence of hydrazine and correction with “Salaokollin” drug // European Researcher. 2012. Vol. 28. N 9–1. P. 1311–1317.
27. Stanković M. N., Mladenović D., Ninčević M. The effects of α -lipoic acid on liver oxidative stress and free fatty acid composition in methionine-choline deficient diet-induced NAFLD // J. Med. Food. 2014. N 17(2). P. 254–261.
28. Valko M., Leibfritz D., Moncol J. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease // Int. J. Biochem. Cell. Bio. 2007. N 39 (1). P. 44–84.

Стаття надійшла до редакції 31.08.18

доопрацьована 07.11.19

прийнята до друку 28.11.19

ANTIOXIDANT SYSTEM ACTIVITY IN LIVER OF RATS UNDER CONDITIONS OF ACUTE HEPATITIS DURING CORRECTION WITH ANTIOXIDANT COMPLEXES

Y. Diorditsa

*Kherson State University
27, University St., Kherson 73000, Ukraine
e-mail: diorditsa_yv@ukr.net*

The article presents results of antioxidant complexes influence on dynamics of lipid peroxidation processes and enzymes activity of antioxidant system of rats liver under acute hepatitis during correction with antioxidant complexes “Triovit” + quercetin and “Triovit” + quercetin + α -lipoic acid. Four groups of white laboratory Wistar rats (6 in each group) were used in experiments: I group – control; II, III and IV groups – rats with acute hepatitis modelled experimentally by single intraperitoneal injection of hydrazine sulfate at concentration of 100 mg / kg. Animals of the III and the IV groups was injected both hydrazine sulfate and complexes of antioxidants for 5 days: “Triovit” and quercetin were given to the rats of the III group, while “Triovit”, quercetin and α -lipoic acid were applied while feeding the IV group rats. On the 7 day, animals of all groups were submitted to anesthesia with total bloodletting from heart. The level of malondialdehyde (MDA), diene conjugates (DK), activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase were determined in liver homogenates.

Intraperitoneal injection of hydrazine sulfate to animals of group II cause an increase of lipid peroxidation products concentration (DK and MDA). At the same time, activity of SOD was reduced and activity of catalase was increased when compared with control group. While using antioxidant complexes including “Triovite” + quercetin, and “Triovite” + quercetin + α -lipoic acid for hepatitis treatment, there was observed reliable reduction of DK and MDA levels and increase of SOD indexes as compared with non-treated animals. Reliable

changes of catalase activity were observed during treatment with “TrioVit”, quercetin and α -lipoic acid. The hepatitis correction by combination of antioxidants including “TrioVit” and quercetin had more effective influence on the intensity of the lipid peroxidation processes reduction and increase of SOD activity.

Oral supplementation of antioxidant complexes to animals of the III and the IV groups normalized lipid peroxidation and promotes increase of SOD index and catalase activity in liver of rats. These results indicate powerful antioxidant properties of drugs and feasibility of their using in hepatitis correction.

Keywords: acute hepatitis, diene conjugates, malonidialdehyde, superoxide dismutase, catalase, antioxidant complexes

SEED PROTEINS ANALYSIS OF *FESTUCA* SERIES *PSAMMOPHILAE*
M. PAWLUS AND *OVINAE* M. PAWLUS (POACEAE)

I. Bednarska¹, G. Angelov²

¹*Institute of Ecology of the Carpathians, NAS of Ukraine*
4, Kozelnytska St., Lviv 79026, Ukraine
e-mail: ibednarska@ukr.net

²*Institute of Biodiversity and Ecosystem Research Bulgarian Academy of Sciences*
Acad. G. Bonchev St., Bl. 23, Sofia 1113, Bulgaria
e-mail: jorkata_1953@mail.bg

According to the type of leaf anatomy, narrow-leaved fescues could be divided to three main groups: species with leaves as in *Festuca rubra* (sclerenchyma strands small, numerous), type *F. valesiaca* (3 main and big sclerenchyma strands + adventive) and type *F. ovina* (sclerenchyma ring). The species of the last group were chosen in our study. The seed proteins variation in natural populations of *Festuca vaginata*, *F. psammophila*, *F. pallens*, *F. polesica* and *F. ovina* from Ukraine and Bulgaria was examined by means of polyacrylamide (PAGE) and sodium dodecyl sulphate (SDS-PAGE) electrophoresis. These fescues exhibit high variability and overlap of morphological and anatomical characters, including diagnostic ones, leading to identification difficulties and uncertainties in their taxonomy. The purpose of the present study was to analyze seed protein composition in order to reveal systematic relationships among the above mentioned taxa of genus *Festuca*. The results showed that *F. vaginata*, *F. psammophila* and *F. polesica* are closely related. The species *F. pallens* was relatively distant from the above mentioned three species. The specific position of *F. pallens* is confirmed also by its ecological characteristics – it is the only species growing on carbonate rocks, while the rest of taxa are typical psammophytes. The results showed distinct differences between Ukrainian populations of *F. pallens* and *F. psammophila* and confirmed occurrence of latter in Ukrainian Roztocha. The cluster patterns were somewhat inconsistent in regard to different types of proteins (PAGE, SDS-PAGE). The only exception is *F. ovina*, which always occupies a separate position. This confirms its remote position within the studied group of the genus *Festuca* and supports the view to consider *F. ovina* s.str. as a separate series *Oviniae* among the species with sclerenchyma ring. Whereas all other studied species (*F. vaginata*, *F. psammophila*, *F. pallens*, *F. polesica*) should be considered as a separate series of closely related taxa – series *Psammophilae*.

Keywords: electrophoresis, *Festuca*, seed proteins, systematic relationships

Introduction

According to the type of leaf anatomy, narrow-leaved fescues could be divided into three main groups: species with leaves as in *Festuca rubra* (sclerenchyma strands small, numerous), *F. valesiaca* type (3 main and big sclerenchyma strands + adventive) and *F. ovina* type (sclerenchyma ring). The species of the last group were chosen in our study. There are different taxonomic treatments of this group. Two main treatments exist in Eastern Europe. According to the first one [3, 12], among the species with sclerenchyma ring there are several small species aggregates, namely *F. ovina* agg. (leaves predominantly green, thin 0,3–0,7 mm, 5–7 veins, 1–3 ribs: *F. ovina* L., *F. filiformis* Pourr., *F. airoides* Lam.), *F. glauca* agg. (or *F. pallens* s.l.) (leaves bluish, rigid

0,6–1,2 mm in diameter, flat, 7–13 veins, 3(-5) triangle ribs: *F. pallens* Host, *F. psammophila* (Hack. ex Čelak.) Fritsch and *F. beckeri* agg. (leaves green, rigid, often trachyphyllous, 0,4–0,8 mm, veins 7–11, ribs 5–7, partly flat: *F. beckeri* (Hack.) Trautv., *F. polesica* Zapal.). Maria Pawlus [9] proposed an alternative classification, dividing the species with sclerenchyma ring into two series: *Ovinae* M.Pawlus (*F. ovina*, *F. filiformis*, *F. airoides*, *F. guestfalica* Boenn. ex Rchb.) with thin leaves, 5–7 veins and 1–3 ribs, and series *Psammophilae* M.Pawlus (*F. psammophila*, *F. polesica*, *F. vaginata* Waldst. & Kit. ex Willd., *F. pallens*), which unites the rest of species with more rigid leaves, numerous veins and long trichomes on ribs. Despite of substantial differences among the typical representatives of all mentioned series/aggregates, quite frequently there can be observed specimens (sometimes whole populations) of intermediate type. The phylogenetic relationships among these species groups and their adequate taxonomic treatment still remain unresolved.

The present study includes five taxa of *Festuca* from Ukraine and Bulgaria: *F. vaginata*, *F. psammophila*, *F. pallens*, *F. polesica* and *F. ovina*, which represent all above-mentioned species aggregates.

The five above-mentioned fescues exhibit high variability and overlap of morphological and anatomical characters, including diagnostic ones leading to identification difficulties and uncertainties in their taxonomy. Thus, there is a need to apply different new approaches, including biochemical ones, to reveal the systematic structure and relationships among them. Electrophoretic techniques that separate seed storage proteins are rapid and generally free from environmental effects compared with the traditional morphological and other classical criteria. They indirectly reflect the genome. For these reasons, they are widely employed for estimation of systematic relationships and genetic variation of natural populations and cultivars of different plant taxa [2, 4, 7, 8, 10, 13].

The purpose of the present study was to analyze seed protein composition in order to reveal systematic relationships among the above mentioned taxa of the genus *Festuca*.

Materials and Methods

Bulk seeds' samples from natural populations of the above mentioned taxa were collected in Ukraine and Bulgaria (Table 1). Each population sample consisted of 20–30 plants which were identified first by their anatomical and morphological traits. Total seed proteins were extracted by 0.01M tris, 0.08M glycine, 20 % sucrose, pH 8.3 and ratio seeds : buffer = 1 : 6. Anodal seed proteins were electrophoretically resolved in vertical polyacrylamide slab gels (7.5 % separating, 3 % stacking gels) using slightly modified system of Davis [5]. The length of the separating gel was 8 cm, while the spacer was 1 cm long. Gels were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 (0.1 %) in 10 % acetic acid, 45 % methanol for 2 hours and destained in 10 % acetic acid, 10 % methanol for a night.

The discontinuous sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of proteins was performed as described by Gardiner et al. [7]. The stacking (5 % acrylamide) and separating (12 % acrylamide) gels were used. The length of stacking and separating gel was 2 cm and 12 cm, respectively.

Affinities among the taxa within the studied group were evaluated by the coefficient of similarity $SI = M/(M+N)$, where M is the number of bands common for compared taxa, N - the sum of absent bands in each compared taxon. The values of coefficient SI for each pair-wise comparison among the taxa were calculated separately for each set of seed proteins (anodal, SDS-PAGE). Then, mean values of coefficient SI as an average on the two data sets were calculated in order to assess overall affinities among the taxa within the studied group of *Festuca*. An index of group affinity (GA) was calculated for each taxon as a sum of its SI values [6].

Table 1

List of studied taxa and populations of *Festuca*

№	Taxon	Country	Location	Latitude	Longitude
1.	<i>F. vaginata</i>	Bulgaria,	Black sea coast, Pobitite camani,	43°13'60"	27°40'0"
2.	<i>F. vaginata</i>	Bulgaria,	Black sea coast, Arcutino,	42°20'4.74"	27°43'34.88"
3.	<i>F. psammophila</i>	Ukraine,	Lviv region, Yavoriv district, Stradch	49°53'45.09"	23°45'18.69"
4.	<i>F. pallens</i>	Ukraine,	Ternopil region, city Kremenets, tract Divochi Skeli	50°7'5.78"	25°43'38.35"
5.	<i>F. pallens</i>	Ukraine,	Ivano-Frankivsk region, Galych district, Podilla	49°16'36.11"	24°44'28.97"
6.	<i>F. polesica</i>	Ukraine,	Kyiv region, Vyshgorod district, village Hotyanivka	50°37'3.91"	30°33'8.85"
7.	<i>F. polesica</i>	Ukraine,	Volyn region, Lyubeshovsky district, Lyubotin	51°50'46.66"	25°19'44.61"
8.	<i>F. polesica</i>	Ukraine,	Kharkiv region, Bogodukhov	50°8'44.38"	35°32'16.72"
9.	<i>F. ovina</i>	Ukraine,	Kyiv region, Vyshgorod district, Hotyanivka	50°38'54.82"	30°33'17.26"

Results and Discussion

Anodal seed proteins. Totally eighteen anodally migrating electrophoretic bands were observed in the studied taxa of genus *Festuca* (Table 2). Bands 29 and 61 were shared by all taxa. Except *F. ovina*, electrophoretic bands 12, 41 and 45 were common for the studied group. Similarly, band 50 was observed in all taxa but absent in *F. pallens*. Band 23 was detected in *F. pallens* and *F. ovina* only. Electrophoretic band 53 was species-specific for *F. pallens*.

Table 2

Banding profiles of anodal seed proteins in the studied taxa of *Festuca*.

1 – band present, 0 – band absent. Each band was designated by a number reflecting its migration (in mm) from the origin.

Taxon	Electrophoretic band																	
	12	18	21	23	29	31	38	41	44	45	48	50	51	53	54	55	61	63
<i>F. vaginata</i>	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
<i>F. psammophila</i>	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0
<i>F. pallens</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0
<i>F. polesica</i>	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1
<i>F. ovina</i>	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0

The values of coefficient SI varied in a wide range from 0.20 (*F. ovina* vs *F. polesica*) to 0.73 when the latter species was compared to *F. vaginata* (Table 3). The latter species demonstrated also high affinity to *F. psammophila* and *F. polesica*. The species *F. ovina* proved to be most isolated within the studied group as its SI values were the lowest for all pair-wise comparisons.

Table 3

Coefficient of similarity (SI) values for pair-wise comparisons among the studied taxa of genus *Festuca* – anodal seed proteins

Taxon	Coefficient of similarity (SI) values				
	1	2	3	4	5
1. <i>F. vaginata</i>	1.00	0.69	0.50	0.73	0.29
2. <i>F. psammophila</i>	0.69	1.00	0.43	0.50	0.38
3. <i>F. pallens</i>	0.50	0.43	1.00	0.37	0.36
4. <i>F. polesica</i>	0.73	0.50	0.37	1.00	0.20
5. <i>F. ovina</i>	0.29	0.38	0.36	0.20	1.00

Index of group similarity contributed further to revealing systematic relationships within the examined group of the genus *Festuca*. Lower values of index GA mean greater distance for a given taxon, and vice versa, higher values are indication for a closer affinity within the group. Considering the index of group affinity (GA), it could be noticed that *F. ovina* (GA=1.23) is

most distantly positioned within the group. The species *F. polesica* (GA=1.80) and *F. pallens* (GA=1.66) were almost equidistantly positioned while *F. vaginata* (GA=2.22) was the most tightly bound within the group (Fig. 1).

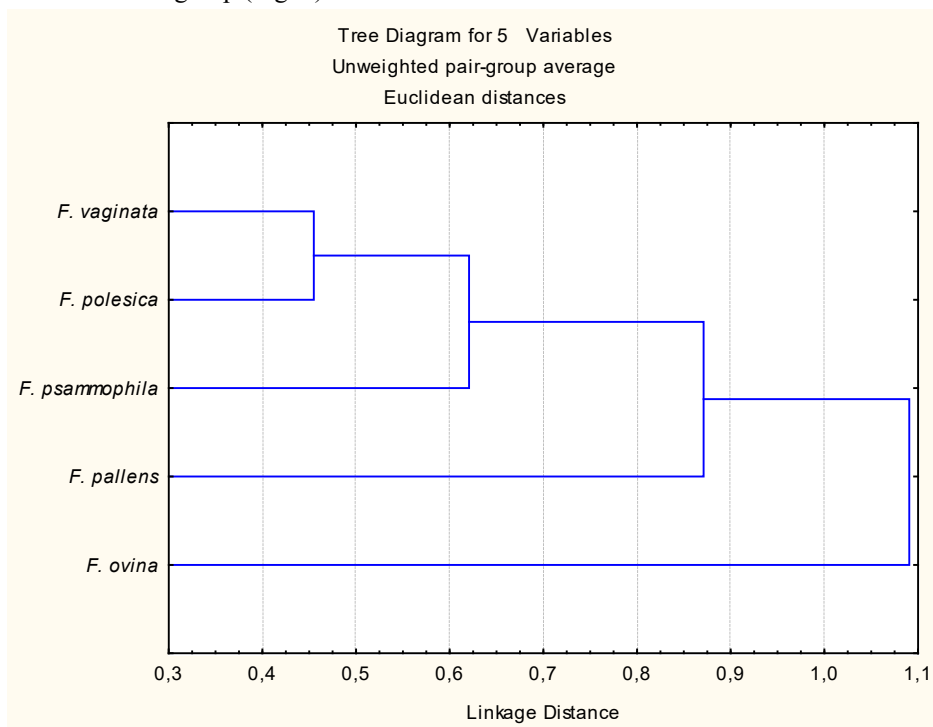


Fig. 1. Cluster analysis dendrogram for the studied *Festuca* species based on anodal seed proteins

SDS-PAGE seed proteins. Contrary to the PAGE method based on differences of proteins electric charge, the technique of SDS-PAGE separates proteins on the basis of their relative molecular mass. Smaller proteins move faster down the gel than larger ones. Thus, the final band pattern represents the proteins arranged down the gel in decreasing order of their molecular mass. Both enzymatic and storage proteins are extracted. As the storage proteins are major portion of total seed proteins, it is assumed that the patterns are mainly due to the former ones.

Overall, sixteen protein bands were resolved by SDS-PAGE in the seed samples of the studied *Festuca* species (Table 4). Four electrophoretic bands, namely 32, 43, 68, 100 were observed in all studied species. Except *F. ovina*, bands 52, 62 and 91 were detected throughout the whole group. Electrophoretic band 60 was observed in *F. polesica* and *F. ovina* only, whereas the bands 87 and 114 were common for the latter and *F. pallens*. Electrophoretic band 26 was species-specific for *F. ovina*.

Considering the values of coefficient SI, it was established that *F. ovina* occupied a relatively remote position within the studied group as its SI were the lowest (Table 5). The species *F. vaginata* demonstrated highest affinity to *F. polesica* and less to *F. pallens* and *F. psammophila*.

Analysis of GA values led to the same conclusions. The species *F. ovina* occupied the most remote species within the group as its GA value (1.61) was the lowest one, while the GA values of the other species were ranging from 2.19 to 2.47 – an indication for their high mutual affinity (Fig. 2).

Table 4

Banding profiles of SDS-PAGE seed proteins in the studied taxa of *Festuca*:
 1 – band present, 0 – band absent. Each band was designated by a number reflecting its migration (in mm) from the origin

Taxon	Electrophoretic band															
	26	30	32	43	52	56	60	62	68	77	81	87	91	100	105	114
<i>F. vaginata</i>	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0
<i>F. psammophila</i>	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0
<i>F. pallens</i>	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1
<i>F. polesica</i>	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
<i>F. ovina</i>	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1

Table 5

Coefficient of similarity (SI) values for pair-wise comparisons among the studied taxa of genus *Festuca* – SDS seed proteins

Taxon	Coefficient of similarity (SI) values				
	1	2	3	4	5
1. <i>F. vaginata</i>	1.00	0.64	0.64	0.71	0.31
2. <i>F. psammophila</i>	0.64	1.00	0.54	0.61	0.40
3. <i>F. pallens</i>	0.64	0.54	1.00	0.66	0.40
4. <i>F. polesica</i>	0.71	0.61	0.66	1.00	0.50
5. <i>F. ovina</i>	0.31	0.40	0.40	0.50	1.00

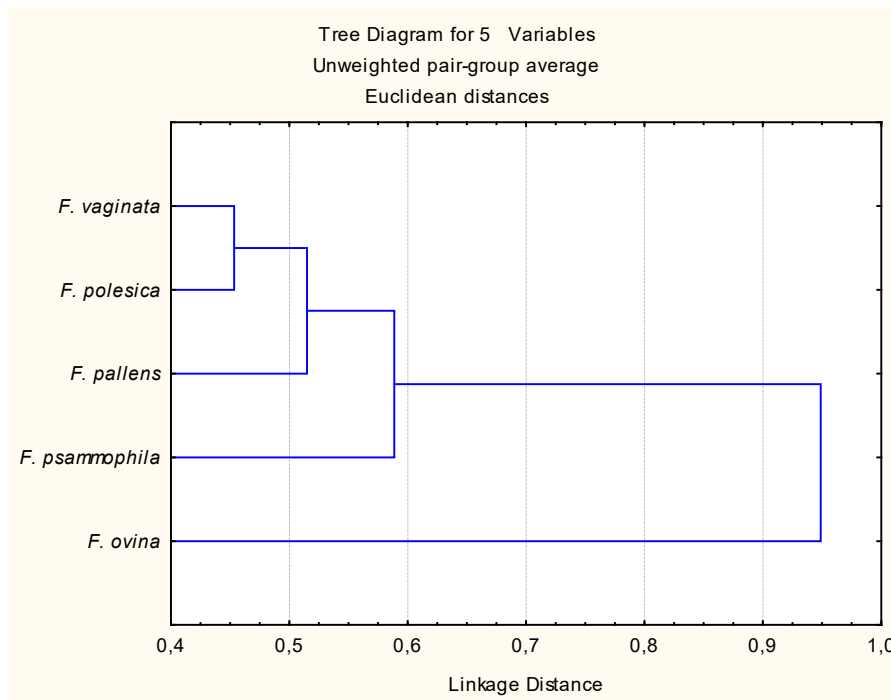


Fig. 2. Cluster analysis dendrogram for the studied *Festuca* species based on SDS-PAGE seed proteins

Mean values of coefficient SI for all pair-wise comparisons among the studied taxa calculated as an average of the two SI data sets (anodal, SDS-PAGE seed proteins) are presented in Table 6.

Table 6

Mean values of coefficient of similarity (SI) for pair-wise comparisons among the studied taxa of genus *Festuca* – anodal seed proteins and SDS-PAGE seed proteins

Taxon	Coefficient of similarity (SI) values				
	1	2	3	4	5
1. <i>F. vaginata</i>	1.00	0.66	0.57	0.72	0.30
2. <i>F. psammophilla</i>	0.66	1.00	0.48	0.56	0.39
3. <i>F. pallens</i>	0.57	0.48	1.00	0.52	0.38
4. <i>F. polesica</i>	0.72	0.56	0.52	1.00	0.35
5. <i>F. ovina</i>	0.30	0.39	0.38	0.35	1.00

Graphically the data are presented in Fig. 3. The species *F. vaginata*, *F. psammophilla* and *F. polesica* proved to be closely related as judged by the two data sets. The species *F. ovina* was most distantly positioned within the studied group as its SI values were the lowest for all pair-wise comparisons.

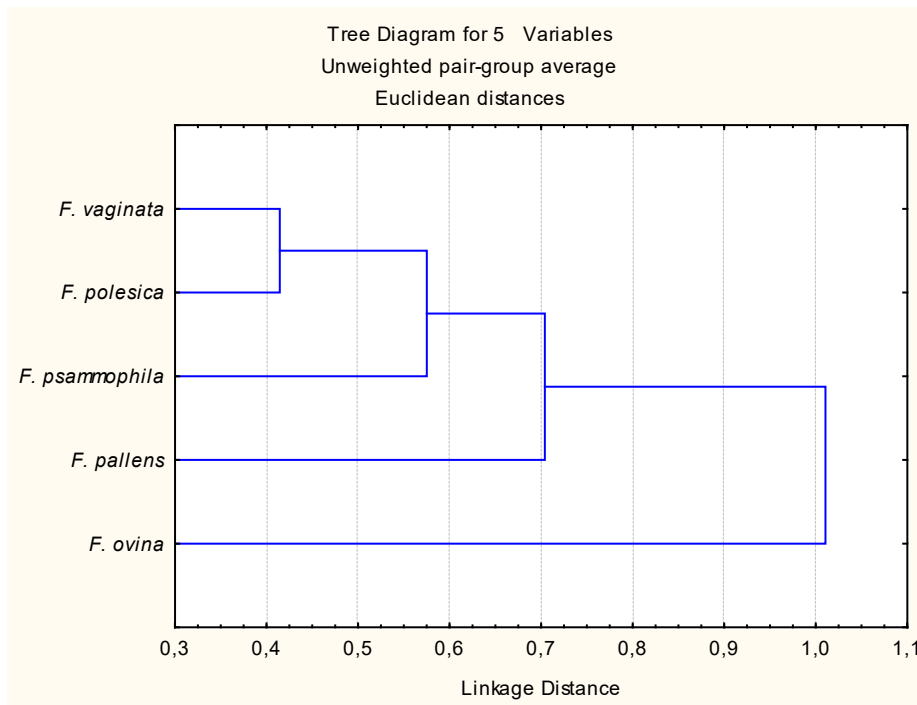


Fig. 3. Cluster analysis dendrogram based on the two SI data sets (anodal and SDS-PAGE seed proteins) for the studied *Festuca* species

The species *F. ovina* possessed the lowest overall value of index of group affinity (GA=1.43), which confirms its remote position within the studied group of the genus *Festuca* and supports the view to consider *F. ovina* s.str. as a separate series *Ovinae* among the species with sclerenchyma ring. On the contrary, the value for species *F. vaginata* (GA=2.25), *F. psammophilla* (GA=2.08) and *F. polesica* (GA=2.14) indicated their close affinity. The species *F. pallens* (GA=1.94) proved to be relatively distant from the above mentioned three species. Specific position of *F. pallens* is confirmed also by its ecological characteristics – it is the only species growing on carbonate rocks, while the rest of taxa are typical psamphytes which occur in pine

forest sands, river terrace sands, open dunes etc. Anatomical and morphological parameters and some of biochemical markers for *F. pallens* and *F. psammophila* are very similar [2, 3]. For this reason, some authors previously did not recognize *F. psammophila* as an independent species [11, 12]. There was also a number of discussions to which of this two species the population from Ukrainian Roztocha belongs to [3]. The results we obtained using seed protein markers showed that *F. pallens* and *F. psammophila* have substantial differences between each other – they were always located in different clusters. This fact once again confirms the independent status *F. psammophila*, and the fact that the species indeed occurs in Ukrainian Roztocha [3]. The cluster patterns were somewhat inconsistent (Figs. 1–3) in regard to different types of proteins (PAGE, SDS-PAGE). The only exception is *F. ovina*, which always occupies a separate position. This provides evidence that there is no clear distinction among small species aggregates (*F. beckeri* agg., *F. glauca* agg.), that previously were reviewed in Eastern Europe [3, 12], while *F. vaginata*, *F. psammophila*, *F. pallens*, *F. polesica* should be considered as a separate series of closely related taxa – series *Psammophilae*.

REFERENCES

1. Aiken S. G., Gardiner S. E., Bassett H. C. M. et al. Implications from SDS-PAGE analyses of seed proteins in the classification of taxa of *Festuca* and *Lolium* (Poaceae) // *Biochem. Syst. Ecol.* 1998. 26. P. 511–533.
2. Angelov G., Bednarska I. Systematic relationships among eight taxa of genus *Festuca* from the Ukraine, as revealed by seed proteins electrophoresis // *Phytologia Balcanica*. 2016. 22 (1). P. 3–68.
3. Bednarska I. *Festuca glauca* agg. species in the flora of Ukraine // *Visnyk L'viv Univ. Biology series*. 2003. 33. P. 27–41 (in Ukrainian).
4. Carreras M., Fuentes E., Merina M. Seed proteins patterns of nine species of *Cactaceae* // *Biochem. Syst. Ecol.* 1997. 25. P. 43–49.
5. Davis B. Disc electrophoresis. I. Method and application to human serum proteins // *Ann. New York Acad. Sci.* 1964. 12. P. 404–427.
6. Ellison W., Alston R., Turner B. Methods for presentation of crude biochemical data for systematic purposes, with particular references to genus *Bahia* (Compositae) // *Amer. J. Bot.* 1962. 49. P. 599–604.
7. Gardiner S. E., Forde M. B., Slack C. R. Grass cultivar identification by sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis // *New Zeland J. Agric. Res.* 1986. 29. P. 193–206.
8. Honghai Yan, Baum B. R., Pingping Zhou et al. Genetic diversity of seed storage proteins in diploid, tetraploid and hexaploid *Avena* species // *Isr. J. Ecol. Evol.* 2014. 60 (2-4). P. 47–54.
9. Pawlus M. Systematyka i rozmieszczenie gatunków grupy *Festuca ovina* L. w Polsce // *Fragm. Flor. Geobot.* 1983 (1985). 29 (2). P. 219–295.
10. Turi N., Farhatullah M., Rabani A. et al. Study of total seed storage protein in indigenous brassica species based on SDS-PAGE electrophoresis // *Afr. J. Biotechnol.* 2010. Vol. 9. P. 7595–7602.
11. Tveretinova V. V. Genus *Festuca* L. In: Prokudin Yu.N. et al. [eds.] *Grasses of Ukraine*. Kyiv: Naukova Dumka, 1977. P. 265–320. (In Russian).
12. Tzvelev N. *Zlaki SSSR [Grasses of the U.S.S.R.]*. Leningrad: Nauka, 1976. 788 p. (In Russian).
13. Yüzbaşıoğlu E., Açıık L., Özcan S. Seed protein diversity among lentil cultivars // *Biologia Plantarum*. 2008. 52 (1). P. 126–128.

АНАЛІЗ БІЛКІВ НАСІННЯ ВИДІВ СЕРІЇ *FESTUCA PSAMMOPHILAE* M. PAWLUS ТА *OVINAE* M. PAWLUS (POACEAE)

І. Беднарська¹, Г. Ангелов^{2*}

¹Інститут екології Карпат НАН України
вул. Козельницька, 4, Львів 79026, Україна
e-mail: ibednarska@ukr.net

²Інститут Біорізноманіття та
Вивчення Екосистем Болгарської Академії Наук
вул. акад. Г. Бончева, 23, Софія, Болгарія
*e-mail: jorkata_1953@mail.bg

Для ідентифікації вузьколистих видів роду *Festuca* традиційно використовують ознаки анатомічної будови листків. Загалом, можна виділити три основні групи видів: ті, що мають анатомію за типом *F. rubra* (численні тонкі тяжі склеренхіми), за типом *F. valesica* (є три основних грубих і можливі додаткові тяжі) та за типом *F. ovina* (наявне кільце склеренхіми). У межах останньої групи, за різними авторами, виділяють низку дрібних видових агрегатів, трактування обсягів яких (спорідненості) у різних авторів є досить відмінним. Метою роботи було провести аналіз філогенетичної спорідненості низки видів із кільцем склеренхіми за альтернативними до класичних морфологічних ознак біохімічними маркерами, зокрема, за протеїнами білків. За допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі (PAGE) та додецилсульфаті натрію (SDS-PAGE) було досліджено мінливість білків насіння п'яти видів костриці флори України та Болгарії: *Festuca vaginata*, *F. psammophila*, *F. pallens*, *F. polesica* та *F. ovina*. Результати показали, що *F. vaginata*, *F. psammophila* та *F. polesica* виявилися досить тісно пов'язаними між собою, тоді як *F. pallens* є порівняно віддаленою від них. Специфічне положення *F. pallens* підтверджується її екологічними особливостями – це єдиний вид серії, що росте на карбонатних породах, у той час як всі інші таксони є типовими псамофітами. Результати показали також чіткі відмінності між українськими популяціями *F. pallens* і *F. psammophila*. Цей факт є особливо важливим з огляду на нещодавні сумніви стосовно визнання останньої самостійним видом. Отримані дані підтвердили гіпотезу виростання *F. psammophila* на українському Розточчі та доцільність розглядати її як окремий вид. Найвіддаленішою від усіх виявилася *F. ovina*, яка в межах досліджуваної групи має найменші морфологічні параметри та найтонші листки. Отримані результати підтверджують її приналежність до окремої серії *Oviniae* серед видів із кільцем склеренхіми. Дендрограми кластерного аналізу були трохи відмінні за результатами щодо різних типів білків (PAGE, SDS-PAGE). Це свідчить про відсутність чіткого розмежування малими видовими агрегатами. Звідси можна зробити висновок, що всі інші досліджувані види (*F. vaginata*, *F. psammophila*, *F. pallens*, *F. polesica*) слід розглядати як окрему серію близькоспоріднених таксонів – серію *Psammophilae*.

Ключові слова: електрофорез, *Festuca*, насіннєві білки, систематика, взаємодносини

ВІДДІЛ *POLYPODIOPHYTA* У СТРУКТУРІ ФЛОРИ НАЦІОНАЛЬНОГО ПРИРОДНОГО ПАРКУ “ГУЦУЛЬЩИНА” (УКРАЇНСЬКІ КАРПАТИ)

М. Томич

*Національний природний парк “Гуцульщина”
вул. Дружби, 84, Косів, Івано-Франківська обл. 78601, Україна
e-mail: maritom82@ukr.net*

Національний природний парк (НПП) “Гуцульщина” розташований на території Косівського району Івано-Франківської області на площі 32 271 га. У межах НПП ми виявили 27 видів папоротеподібних, що належать до 16 родів і 9 родин. Наведено конспект видів відділу *Polypodiophyta*, у якому подано біоморфологічну, екологічну, регіональну та географічну характеристики кожного виду вищих спорових рослин на території НПП “Гуцульщина”. За зональним розподілом найбільшою групою серед папоротеподібних є пліоризональні види – 33,3 %, бореально-субмеридіональні – 22,2 %, температурно-меридіональні – 14,8 %, бореально-меридіональні – 11,1 %, арктично-меридіональні та бореально-субтропічні – по 7,4 %, а бореально-температні – 3,7 %.

Висотний аналіз папоротеподібних свідчить, що зі семи груп поширення флори найбільшою виявилася група монтанно-рівнинних видів – 85,1 %. За кліматичною характеристикою для відділу *Polypodiophyta* домінуючою є група океаністів – 85,1 %.

Характер розподілу папоротей по Земній кулі визначає регіональне поширення видів. Домінуючою групою, що включає більше половини видового складу, є циркумполярні види (59,3 %), що трапляються на території всієї північної півкулі. Інші групи мають невелику частку від загальної чисельності папоротей. Провівши аналіз життєвих форм *Polypodiophyta* за К. Раункієром, ми виявили, що вони представлені двома групами: переважаючими є гемікриптофіти (70,4 %), менше третини видів становлять геофіти (29,6 %).

Відношення папоротей до зволоженості ґрунту (субстрату) таке: найбільшою групою (70,4 %) виявилися мезофіти, мезогірофіти становлять 22,2 %, тоді як гігрофіти та ксеромезофіти включають по одному виду – 3,7 % від загальної кількості видів папоротей. Розподіл папоротеподібних території НПП “Гуцульщина” за показником трофності субстрату: мезотрофи становлять 55,6 %, а мезоевтрофи – 40,7 % від загальної кількості видів, що свідчить про помірну вибагливість *Polypodiophyta* до багатства ґрунту. У досліджуваній групі флори НПП “Гуцульщина” значну перевагу мають сціофіти, які проходять життєвий цикл в умовах досить слабкого освітлення (55,6 %) і приурочені до лісових фітоценозів. Сціогеліофіти, що можуть і рости на відкритих ділянках, і витримувати певний ступінь затінення, становлять 33,3 % від загальної кількості видів.

Із 27 видів папоротеподібних, виявлених на території НПП “Гуцульщина”, два види (*Botrychium lunaria*, *Cystopteris sudetica*) занесено до Червоної книги України.

До переліку ендемічних, реліктових, рідкісних і зникаючих видів рослин, що відомі з території Івано-Франківської області, увійшли *Ophioglossum vulgatum*, *Phyllitis scolopendrium*, *Polystichum braunii*, *Polystichum aculeatum*.

Ключові слова: флора, папоротеподібні, географічне поширення, життєві форми, екотопи

Національний природний парк (НПП) “Гуцульщина” розташований на території Косівського р-ну Івано-Франківської обл. на площі 32 271 га [13]. Згідно з фізико-географіч-

ним районуванням [12], територія НПП “Гуцульщина” належить до районів Передкарпаття, Покутських Карпат і Горган. Територія НПП “Гуцульщина” характеризується значною фізико-географічною та флористичною різноманітністю. Флору цієї території вивчали фрагментарно або частково у межах більших фітохоріонів [17, 25]. Представники відділу *Polypodiophyta* наявні в більшості фітоценозів парку, що зумовлює необхідність вивчення цієї групи рослин [21]. Папороті належать до найбільш древніх груп судинних рослин. За своєю давністю вони поступаються лише риніофітам і мають приблизно однаковий вік із *Lycopodiophyta* й *Equisetophyta* [5]. Але в той час, як риніофіти давно вимерли, а плауно-подібні та хвоцєподібні представлені невеликою кількістю видів у сучасному рослинному покриві Землі, папоротеподібні усе ще характеризуються значним видовим різноманіттям. Хоча вони належать до вимираючої групи рослин, проте цей відділ містить більше 12 тисяч видів світової флори, поступаючись за кількістю видів лише відділам *Bryophyta* та *Magnoliophyta* [31].

Матеріали та методи

Вивчення флори НПП “Гуцульщина” проводили упродовж 2005–2017 рр. Було використано літературні дані та матеріали гербаріїв CHER, LW, LWS, LWKS, KRA, KRAM, власні гербарні збори. Дослідження видового складу здійснено маршрутним і напівстаціонарним методами. Аналіз систематичної структури флори проводили методами порівняльної флористики. Визначення видів здійснювали за Визначником рослин Українських Карпат [2] і Определителем высших растений Украины [11], номенклатура таксонів подана за зведенням С.Л. Мосякіна та М.М. Федорончука [28]. Обсяг систематичних одиниць флори папоротеподібних наведено за системою А.Л. Тахтаджяна [16]. Аналіз життєвих форм *Polypodiophyta* здійснювали за К. Раункієром [30]. Виділення екологічних флористичних груп здійснено на основі фітоіндикаційних шкал Г. Еленберга [26], Д.М. Циганова [23], Я.П. Дідуха [3].

Важливою характеристикою будь-якої групи рослин є їхнє географічне поширення. Щоб відобразити особливості папоротеподібних, наявних у флорі НПП “Гуцульщина”, ми подаємо ареалогічну формулу (ареалдіагноз) для кожного виду, розроблену на основі ботаніко-географічного районування Земної кулі Г. Мойзеля зі співавторами [27]. Вони адаптовані як у зарубіжних, так і у вітчизняних виданнях [4, 32] та доповнені нашими даними щодо поширення видів на території України й Українських Карпат, зокрема. На основі ареалогічних формул здійснено зональний, кліматичний, висотний і регіональний аналіз видів *Polypodiophyta*, характерних для флори досліджуваної території.

Окремо в конспекті наявна інформація про трапляння видів папоротеподібних на території парку, наданій йому в постійне користування, включеній до складу НПП “Гуцульщина” без вилучення у землекористувачів, і на суміжних землях. Ми скористалися такими скороченнями у конспекті: **1П** – Старокутське природоохоронне науково-дослідне відділення (далі – ПНДВ) НПП “Гуцульщина”, **2П** – Косівське ПНДВ НПП “Гуцульщина”, **3П** – Шешорське ПНДВ НПП “Гуцульщина”, **1Д** – Березівське лісництво ДП “Кутське лісове господарство”, **2Д** – Космацьке лісництво ДП “Кутське лісове господарство”, **3Д** – Яблунівське лісництво ДП “Кутське лісове господарство”, **4Д** – Кутське лісництво ДП “Кутське лісове господарство”, **5Д** – Косівське лісництво ДП “Кутське лісове господарство”, **2А** – Пістинське лісництво районного підприємства (далі РП) “Райагроліс”, **3А** – Рожнівське лісництво РП “Райагроліс”, **4А** – Кобаківське лісництво РП “Райагроліс”, **5А** – Великорожинське лісництво РП „Райагроліс”, **Ш** – околиці с. Шепіт Косівського р-ну, **Повс.** – повсюди на території парку (Літопис..., 2008).

Результати і їхнє обговорення

На території НПП “Гуцульщина” ми виявили 27 видів відділу *Polypodiophyta*, що належать до 9 родин, 16 родів. Це становить 3,2 % від загальної кількості видів вищих судинних рослин флори НПП “Гуцульщина”. Ці показники відповідають аналогічним характеристикам у флорах Голарктики [18]. Представники давніх філогенетичних груп поширені переважно на значних площах територій ПЗФ Українських Карпат, оскільки тут переважають лісові території. За нашими спостереженнями, зі збільшенням площі досліджуваної території частка представників древніх філогенетичних груп у флорах зменшується (оберненопропорційна залежність) [20]. Для флори Українських Карпат наведено 38 видів, або 1,9 % [15], для флори України – 57 видів, або 1,1 % загального числа видів вищих судинних рослин [11].

На території НПП “Гуцульщина” представники *Polypodiophyta* належать переважно до бореального, неморального та петрофільного флороценотипів [6–8]. Великий відсоток папоротеподібних у флорі НПП “Гуцульщина”, як і плауноподібних та хвощеподібних (0,5 %; 0,8 %; 3,2 %), порівняно з флорою Українських Карпат (0,45 %; 0,45 %; 1,9 %) [15] визначається невеликою площею досліджуваної території та високим ступенем її репрезентативності.

Нижче наводимо конспект видів відділу *Polypodiophyta*, у якому подано біоморфологічну, екологічну, регіональну та географічну характеристики вищих судинних рослин, які трапляються на території НПП “Гуцульщина”.

POLYPODIOPHYTA**OPHIOGLOSSOPSIDA****OPHIOGLOSSACEAE*****Botrychium lunaria* (L.) Sw.**

Біоморфа: геофіт.

Екологія: геліофіт, мезофіт, мезотроф.

Поширення: 2Д, с. Космач, ур. Прелуки (Барикіна 1965 СHER).

Ареалдіагноз: austr+m/alp-arct·(oz) CIRC POL

***Ophioglossum vulgatum* L.**

Біоморфа: геофіт.

Екологія: геліофіт, мезофіт, мезотроф.

Поширення: 2Д, III.

Ареалдіагноз: m/mo-b·(oz) CIRC POL

ONOCLEACEAE***Matteucia struthiopteris* (L.) Tod.**

Біоморфа: гемікриптофіт.

Екологія: сціогеліофіт, мезогігрофіт, евтроф.

Поширення: 2Д 2А.

Ареалдіагноз: sm/mo-b·suboz CIRC POL

ATHYRIACEAE***Athyrium distentifolium* Tausch ex Opiz**

Біоморфа: гемікриптофіт.

Екологія: сціогеліофіт, мезофіт, мезотроф.

Поширення: Повс.

Ареалдіагноз: strop/mo-b·(oz) CIRC POL

***Athyrium filix-femina* (L.) Roth**

Біоморфа: гемікриптофіт.

Екологія: сціофіт, мезофіт, мезотроф.

Поширення: Повс.

Ареалдіагноз: strop/mo-b·(oz) CIRCPOŁ

***Cystopteris fragilis* (L.) Bernh.**

Біоморфа: гемікриптофіт.

Екологія: сціогеліофіт, гігромезофіт, мезотроф.

Поширення: Повс.

Ареалдіагноз: austr-trop/salp-arct·(oz) CIRCPOŁ

***Cystopteris sudetica* A. Br. et Milde**

Біоморфа: геофіт.

Екологія: сціогеліофіт, мезофіт, мезотроф.

Поширення: 1Д, Косівський р-н, с. Баня-Березів північний схил г. Рокити, (Slendzinski 1874 KRA).

Ареалдіагноз: temp/mo-b·(k) EURAS

ASPIDIACEAE

***Dryopteris affinis* (Lowe) Fraser-Jenkins**

Біоморфа: гемікриптофіт.

Екологія: сціофіт, мезофіт, мезоевтроф.

Поширення: 2Д 5Д 3П.

Ареалдіагноз: m/mo-temp/demo·oz EUR

***Dryopteris carthusiana* (Vill.) H.P.Fuchs**

Біоморфа: гемікриптофіт.

Екологія: сціогеліофіт, гігромезофіт, мезотроф.

Поширення: 3Д, 3П, 5Д, Ш.

Ареалдіагноз: antarctAM + sm/mo-b·(oz) CIRCPOŁ

***Dryopteris cristata* (L.) A.Gray**

Біоморфа: гемікриптофіт.

Екологія: сціофіт, мезогірофіт, мезоевтроф.

Поширення: 2Д Ш.

Ареалдіагноз: sm/mo-b·suboz EUR – WSIB + OAM

***Dryopteris dilatata* Hoffm. A. Gray**

Біоморфа: гемікриптофіт.

Екологія: сціофіт, гігромезофіт, мезотроф.

Поширення: 2Д 5Д 3П.

Ареалдіагноз: antarctAM + sm/mo-arct·(oz) CIRCPOŁ

***Dryopteris expansa* (C.Presl) Fraser-Jenkins et Jermy**

Біоморфа: гемікриптофіт.

Екологія: сціофіт, гігромезофіт, мезотроф.

Поширення: 2Д 5Д Ш.

Ареалдіагноз: sm/mo-b·oz CIRCPOŁ

***Dryopteris filix-mas* (L.) Schott**

Біоморфа: гемікриптофіт.

Екологія: сціофіт, мезофіт, мезотроф.

Поширення: Повс.

Ареалдіагноз: austr-trop/mo AM - m/mo-b·(oz) CIRCPOŁ

***Gymnocarpium dryopteris* (L.) Newman**

Біоморфа: геофіт.

Екологія: сціофіт, мезофіт, мезоевтроф.

Поширення: Повс.

Ареалдіагноз: m/mo-arct·(suboz) CIRCPOŁ

***Gymnocarpium robertianum* (Hoffm.) Newman**

Біоморфа: геофіт.

Екологія: сціогеліофіт, мезофіт, мезотроф.

Поширення: 1Д Ш.

Ареалдіагноз: m/mo-temp/demo·oz EUR + OAS + (WAM)

***Polystichum aculeatum* (L.) Roth**

Біоморфа: гемікриптофіт.

Екологія: сціофіт, мезогігрофіт, евтроф.

Поширення: 3П Ш.

Ареалдіагноз: m/mo-temp/demo·(subk) EURAS

***Polystichum braunii* (Spenner) Fée**

Біоморфа: гемікриптофіт.

Екологія: сціофіт, мезофіт, мезоевтроф.

Поширення: 2Д 3П Ш.

Ареалдіагноз: sm/mo-b·(oz) CIRCPOŁ

THELYPTERIDACEAE

***Oreopteris limbosperma* (All.) Holub**

Біоморфа: гемікриптофіт.

Екологія: сціофіт, мезофіт, мезоевтроф.

Поширення: Повс.

Ареалдіагноз: sm/mo-b·oz EUR + OAS + WAM

***Phegopteris connectilis* (Michx.) Watt.**

Біоморфа: геофіт.

Екологія: сціофіт, мезофіт, мезоевтроф.

Поширення: Повс.

Ареалдіагноз: sm/mo-b·(oz) CIRCPOŁ

***Thelypteris palustris* Schott**

Біоморфа: геофіт.

Екологія: сціогеліофіт, гігрофіт, мезоевтроф.

Поширення: 1П.

Ареалдіагноз: austr-trop/mo-b·(oz) CIRCPOŁ

ASPLENIACEAE

Asplenium ruta-muraria L.Біоморфа: гемікриптофіт.Екологія: геліофіт, ксеромезофіт, мезоевтроф.Поширення: 2П 4А.Ареалдіагноз: m/mo-b·(oz) EURAS*Asplenium trichomanes* L.Біоморфа: гемікриптофіт.Екологія: сціогеліофіт, мезофіт, мезотроф.Поширення: Повс.Ареалдіагноз: austr-trop/mo-b·(oz) CIRCPO*Asplenium viride* Huds.Біоморфа: гемікриптофіт.Екологія: сціофіт, мезофіт, мезотроф.Поширення: 4А 4Д.Ареалдіагноз: m/salp-arct·(oz) CIRCPO*Phyllitis scolopendrium* (L.) NewmanБіоморфа: гемікриптофіт.Екологія: сціофіт, мезофіт, мезоевтроф.Поширення: 4А 5А 3Д 4Д.Ареалдіагноз: m/salp-temp/desalp·oz EUR + OAS + (OAM)

BLECHNACEAE

Blechnum spicant (L.) RothБіоморфа: гемікриптофіт.Екологія: сціофіт, мезофіт, мезотроф, кальціефоб.Поширення: 1Д 2Д Ш.Ареалдіагноз: m/mo-b·ozEUR+OAS+WAM

HYPOLEPIDACEAE

Pteridium aquilinum (L.) KuhnБіоморфа: геофіт.Екологія: сціогеліофіт, мезофіт, мезотроф.Поширення: Повс.Ареалдіагноз: austr-boreotrop/mo-b·(oz) CIRCPO

POLYPODIACEAE

Polypodium vulgare L.Біоморфа: гемікриптофіт.Екологія: сціогеліофіт, мезофіт, мезотроф.Поширення: Повс.Ареалдіагноз: austr AFR + m/mo-b·oz CIRCPO

Зональна характеристика поширення видів відображає загальні закономірності їхнього розподілу і меншою мірою показує особливості їхніх ареалів. Що стосується папоротеподібних, то зональні особливості розподілу видів значно відрізняються від аналогічного розподілу видів у досліджуваній флорі загалом. Розподіл видів папоротеподібних

за зональним показником такий: пльоризональні – 33 %, бореально-субмеридіональні – 22,2 %, температурно-меридіональні – 14,8 %, бореально-меридіональні – 11,1 %, арктично-меридіональні та бореально-субтропічні – по 7,4 %, а бореально-температні – 3,7 %. Групи температурних і температурно-субмеридіональних видів (поширені у одній-двох зонах), що є першими за кількістю видів у загальному спектрі флори (24,3 % і 22 % видів відповідно), не представлені серед папоротеподібних. Дві групи видів – бореально-меридіональні (20,9 %) та бореально-субмеридіональні (14,3 %) займають третє і четверте місця за кількістю видів у флорі НПП “Гуцульщина”, відповідно четверте і друге місця за кількістю видів – у групі папоротеподібних. На п’ятому місці у флорі парку перебуває група пльоризональних видів, що включає 8,3 % загальної їх кількості, ця ж група є найбільшою серед папоротеподібних флори НПП “Гуцульщина” – 33,3 % видів. Варто зазначити, що папороті становлять значну частку – 13 % пльоризональних видів флори парку. Можливо, це наслідок останнього спалаху чисельності папоротей на межі кайнозойської та мезозойської ер у пізньокрейдово-палеогеновому періодах [33, 34]. Конкурентна боротьба за ресурси із квітковими рослинами призвела до диверсифікації екологічних ніш і спеціалізації видів відділу *Polypodiophyta* [29], що дало їм змогу бути поширеними в обох півкулях практично незалежно від зонального розподілу землі.

Висотний аналіз папоротеподібних свідчить, що зі семи груп висотного поширення флори найбільшою виявилася група монтанно-рівнинних видів (85,1 %), за нею йдуть групи субальпійсько-рівнинних (11,1 %) та альпійсько-рівнинних (3,7 %) папоротеподібних. У флорі НПП загалом частка монтанно-рівнинних видів також переважаюча (71,8 %), другою є група рівнинних видів (16,7 %), що не представлена у флорі папоротеподібних досліджуваної території, всі інші групи займають менше 3,5 % загальної чисельності видів.

У папоротеподібних наявні пристосування до умов різних екоотопів: толерантність до субстрату і низької інтенсивності освітлення, висока стійкість до умов надмірного зволоження, необхідність участі води у здійсненні статевого процесу [29]. Тому оптимальними умовами для існування цієї групи є монтанні та рівнинні лісові угруповання.

Відсутність видів, поширених у одному висотному поясі, наявність ще двох груп із великою висотною амплітудою свідчать про слабку залежність видів досліджуваної групи від висотної поясності.

Важливу роль у поширенні рослин на території Земної кулі відіграє тип клімату, що проявляється у показниках океанічності-континентальності. Нами було виділено п’ять кліматичних типів ареалів: *океанічний*, *субокеанічний*, *субконтинентальний*, *континентальний* та *індиферентний*. Єдиною групою, до якої не увійшли папоротеподібні флори НПП “Гуцульщина”, є група з індиферентним типом ареалу. Це свідчить про те, що поширення папоротей, безумовно, залежить від кліматичного показника. Для відділу *Polypodiophyta* домінуючою є група видів з океанічним типом ареалу – 85,1 %. Група видів зі субокеанічним типом ареалу – 11,1 %, а з континентальним і субконтинентальним – лише по 3,7 % видів у складі флори папоротеподібних НПП “Гуцульщина”. У флорі судинних рослин парку домінують дві основні групи: види з океанічним і субокеанічним типами ареалів становлять 40,1 % та 35,9 % видового складу відповідно, на три інші групи припадає сумарно 24 % видів. Досліджувана територія, за літературними даними, належить до субокеанічної зони. Гумідний характер клімату гірських систем, у тому числі Українських Карпат, зумовлює високі значення вологості повітря і кількості опадів протягом року [4]. Оскільки для папоротеподібних вода є визначальним фактором у життєвому циклі, то ця група у помірній зоні закономірно пов’язана з гірськими системами, тому переважання океанічного типу ареалу було очікуваним.

Характер поширення *Polypodiophyta* у конкретних географічних районах визначає регіональний розподіл видів. Домінуючою групою, що включає більше половини наведеного нами видового складу, є циркумполярні види, що підтверджує поширення цих папоротеподібних на території всієї північної півкулі – 59,3 %. Інші групи займають невелику частку від загальної кількості видів. Євразійсько-американські види – 14,8 %, євразійські – 11,1 %, космополіти – 7,4 %, групи європейсько-західносибірсько-американських і європейських видів займають по 3,7 % від усієї флори папоротеподібних. Як бачимо, явище ендемізму не характерне для флори папоротеподібних НПП “Гуцульщина”. Найбільшою групою у цій флорі загалом є види з європейським типом ареалу – 35,6 %, другими є європейсько-азійські – 28,2 %, третя група – циркумполярні види – 14,6 %. Таким чином, папоротеподібні досліджуваної флори тяжіють до великих географічних територій, хоча флора НПП “Гуцульщина” складена видами, третина з яких поширена у Європі, а більше половини – на території Євразії. Це підтверджує думку про те, що конкурентна боротьба з квітковими рослинами за екотопи призвела не до вимирання філогенетичної групи папоротеподібних, а до спеціалізації видів, збільшення біологічного різноманіття і підсилення адаптивних механізмів багатьох таксонів [29]. Така ситуація дала їм можливість зберегти за собою та зайняти велику кількість екологічних ніш на значних територіях.

Провівши аналіз життєвих форм *Polypodiophyta* як наслідок адаптації видів до кліматичних особливостей регіону за К. Раункієром, ми виявили, що вони представлені двома групами, найбільшу частку з яких становлять гемікриптофіти – 70,4 %. Менше третини видів становлять геофіти – 29,6 %. Гемікриптофіти є головною групою серед папоротей у складі флори НПП “Гуцульщина”, як і флори Українських Карпат [14]. Переважання гемікриптофітів спостерігається загалом у флорах Середньої Європи, що пов’язано з кліматичною сприятливістю цього регіону для їхнього розвитку [1]. Другою групою серед папоротеподібних у флорі НПП “Гуцульщина” є криптофіти, зокрема, геофіти, що також мають високу адаптивну стратегію виживання і часто до їхнього числа входять реліктові види [35].

Екологічні характеристики розглянутої нами групи показують спектр умов середовища існування, характерний для представників *Polypodiophyta* на досліджуваній території. Відношення папоротей до зволоженості ґрунту (субстрату) таке: найбільшою групою виявилися мезофіти (70,4 %), меншою – мезогігрофіти (22,2 % від загальної кількості видів), тоді як гігрофіти та ксеромезофіти включають по одному виду (по 3,7 %). Як і у флорі НПП “Гуцульщина” загалом, так і для цієї групи переважаючими є мезофіти та мезогігрофіти, що зумовлено гумідним характером клімату досліджуваної території та Українських Карпат загалом і формування внаслідок цього великих площ вологих екотопів [4]. Групи гідрофітів і ксерофітів представлені дуже слабо, оскільки вони потребують наявності відповідних водойм, а також сухих чи відкритих скельних фітоценозів, що займають незначні площі на території НПП «Гуцульщина». Отже, папоротеподібні досліджуваної території приурочені переважно до вологих фітоценозів, що характерно для бореальних і неморальних флороценозів, які тут переважають.

Одним із основних абіотичних факторів у екотопах для рослин є трофність ґрунту. Розподіл папоротеподібних території НПП “Гуцульщина” за цим показником такий: мезотрофи – 55,6 %, а мезоевтрофи – 40,7 % від загальної кількості видів, еутрофи – 3,7 %, що свідчить про помірну вибагливість *Polypodiophyta* до багатства ґрунту. Варто зазначити, що група мезофітів є найширшою за амплітудою. Більша частина видів тяжіє до середньо багатих і багатих ґрунтів, що є найбільш поширеними на території НПП “Гуцульщина” та характерні для дубин і бучин, мішаних лісів та, частково, смеречин. Відсутність оліготро-

фів у цій групі пов'язана як з екологічними особливостями папоротеподібних (толерантність до субстрату), так і з незначною площею бідних екоотопів на території парку.

Важливим екологічним фактором є інтенсивність освітлення, яка, завдяки фотосинтезу, стала одним із лімітуючих факторів у житті рослин. Серед *Polypodiophyta* у флорі НПП «Гуцульщина» значну перевагу мають сціофіти, які проходять життєвий цикл в умовах досить слабкого освітлення (55,6 %) і приурочені до лісових фітоценозів. Сціогеліофіти, що можуть як рости на відкритих ділянках, так і витримувати певний ступінь затінення, становлять 33,3 % від загальної кількості видів. Геліофіти виявилися найменшою групою видів – 11,1 %, оскільки папоротеподібні у процесі еволюції виробили здатність здійснювати фотосинтез за низької інтенсивності освітлення, тому вони пов'язані з лісовою рослинністю [29].

Із 27 видів папоротеподібних, виявлених на території НПП «Гуцульщина», два види занесені до Червоної книги України [24]. Обидва наводяться для досліджуваної території виключно за гербарними зразками, які поки що не підтверджені сучасними зборами. Згідно з літературними даними, *Botrychium lunaria* росте у світлих лісах, на узліссях, у чагарниках, на сухих луках, виходах каміння [24]. Гербарний зразок зібраний на післялісовій сінокісній луці, що лежить у поясі смерекових лісів, у 1965 р. і зберігається у гербарії Чернівецького національного університету ім. В. Федьковича (CHER). Тепер ці луки випасаються, хоча наявні також процеси заростання, спричинені зменшенням інтенсивності господарського використання лук у Карпатському регіоні. *Cystopteris sudetica* росте в субальпійському та поясі гірських лісів на затінених скелях і кам'янистих схилах [24]. Зразок зібраний 1874 р. на північному схилі г. Рокита над Баня-Березовом, однак тепер гора слабо заліснена, і угруповання з участю цього виду ми не виявляли. Гербарний зразок зберігається у Гербарії Ягеллонського університету, м. Краків (KRA).

До переліку ендемічних, реліктових, рідкісних і зникаючих видів рослин, що відомі з території Івано-Франківської обл., увійшли *Ophioglossum vulgatum*, *Phyllitis scolopendrium*, *Polystichum braunii*, *Polystichum aculeatum*. Перший досить часто трапляється в лучних фітоценозах на вологих післялісових сінокісних луках. *Phyllitis scolopendrium* виявлений лише у чотирьох локалітетах, у букових лісах на багатих ґрунтах, де формує щільні популяції. Багаторядники трапляються частіше, вони є типовими видами для букових і ялицево-букових лісів, особливо літогенних [19].

Досить великою групою папоротеподібних помірних широт є реліктові види. Рештками третинної флори, рідкісними за філогенетичними причинами, вважаються: *Botrychium lunaria*, *Ophioglossum vulgatum*, *Phyllitis scolopendrium*, *Asplenium ruta-muraria*, *Asplenium trichomanes*, *Cystopteris sudetica*, *Gymnocarpium robertianum*, *Matteucia strutioptheris* [10]. Фактор рідкисності листовика сколопендрового визначається не лише філогенетичними причинами, але й особливостями літології, зокрема, його кальцієфільністю [23].

Папоротеподібні НПП «Гуцульщина» представлені 27 видами, що належать переважно до бореального, неморального та петрофільного флороценотипів. Найбільшою зональною групою є плюризональні види, разом із бореально-субмеридіональними та температурно-меридіональними видами вони становлять більше половини видового складу флори папоротей парку. Переважаючою групою за висотним розподілом є монтанно-рівнинні види, досліджувана група має слабку залежність від висотної поясності. Під час аналізу досліджуваної групи за кліматичним показником було виявлено, що папоротеподібні помірної зони – це переважно види з океанічним типом ареалу, що зумовлено безпосередньою участю води у їхньому життєвому циклі. Географічне поширення папоротеподібних значне – більше половини становлять циркумполярні види. Також представлені

євразійсько-американська, євразійська та космополітична групи. Аналіз кліматоморф за К. Раункієром показав, що панівною групою є гемікриптофіти, як і у флорах Середньої Європи загалом. Аналіз спектра умов існування папоротеподібних вказує, що за показником зволоженості ґрунту переважають мезофіти. Мезотрофи та мезоевкторфи є домінуючими групами під час аналізу розподілу видів за показником багатства ґрунту. За інтенсивністю освітлення переважають сціофіти і сціогеліофіти. Два види папоротеподібних досліджуваної території занесені до Червоної книги України, чотири види – до переліку реліктових, рідкісних і зникаючих видів рослин, що відомі з території Івано-Франківської обл., шість видів є третинними реліктами.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Вальтер Г.* Общая геоботаника. М.: Мир, 1982. 264 с.
2. *Визначник рослин Українських Карпат.* К.: Наукова думка, 1977. 434 с.
3. *Дідух Я. П., Плюта П. Г.* Фітоіндикація екологічних факторів. К.: Наукова думка, 1994. 280 с.
4. *Дідух Я. П., Бурда Р. І., Зиман С. М.* та ін. Екофлора України Т. 1. К.: Наук. думка, 2000. 284 с.
5. *Жизнь растений Т. 4.* Мхи, плауны, хвощи, папоротники, голосеменные растения. М.: Просвещение, 1978. 513 с.
6. *Заверуха Б. В.* Флора Волыно-Подолли и ее генезис. К.: Наук. думка, 1985 б. 192 с.
7. *Камелин Р. В.* Флорогенетический анализ естественной флоры горной Средней Азии. Л.: Наука, 1973. 355 с.
8. *Камелин Р. В.* Кухистанский округ горной Средней Азии (ботанико-географический анализ) // Комаровские чтения. Л.: Наука, 1979. Т. 31. С. 3–117.
9. *Літопис природи НПП «Гуцульщина».* Косів, 2011. Т. VIII. 193 с.
10. *Малиновський К. А., Царик Й. В., Кияк В. Г., Нестерук Ю. Й.* Рідкісні, ендемічні, реліктові та про гранично-ареальні види рослин Українських Карпат. Львів: Ліга-Прес, 2002. 76 с.
11. *Определитель высших растений.* К.: Фитосоцицентр, 1999. 545 с.
12. *Природа Івано-Франківської області / за ред. К. Геренчука.* К.: Вища школа, 1973. 160 с.
13. *Пророчук В. В., Стефурак Ю. П., Брусак В. П.* та ін. Національний природний парк “Гуцульщина”: монографія. Львів: НВФ “Карти і атласи”, 2013. 408 с.
14. *Тасенкевич Л. О.* Флора, її структура та охорона // Природа Карпатського національного парку. К.: Наук. думка, 1993. С. 48–62.
15. *Тасенкевич Л. О.* Розмаїття флори судинних рослин в Українських Карпатах // Праці Наук. т-ва ім. Шевченка (Львів). Екол. збірн. 3. 2003. Т. 12. С. 147–157.
16. *Тахтаджян А. Л.* Система магнолиофитов. Л.: Наука, 1987. 439 с.
17. *Ткачик В. П.* Флора Прикарпаття. Львів: НТШ, 2000. 254 с.
18. *Толмачёв А. И.* Введение в географию растений. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1974. 244 с.
19. *Томич М. В.* Ендемічний компонент флори НПП «Гуцульщина» // Матеріали Міжнар. наук.-практ. конф., присв. 10-річчю НПП «Гуцульщина». Косів, 2012. С. 77–81
20. *Томич М. В.* Систематичний аналіз флори Національного природного парку «Гуцульщина» та її репрезентативність для природозаповідного фонду Карпатського регіону // Вісн. Чернів. нац. ун-ту. Біол. системи. 2019. С. 52–58.
21. *Томич М. В., Савчук Г. В.* Загальна характеристика Polypodiophyta на території НПП «Гуцульщина» // Функціонування заповідних територій в сучасних умовах України: матеріали Міжнар. наук.-практ. конф. Синеvir, 2009. С. 81–82.

22. Царик Й. В., Жилияєв Г. Г., Кияк В. Г. та ін. Внутрішньопопуляційна різноманітність рідкісних, ендемічних і реліктових видів рослин Українських Карпат. Львів: Поллі, 2004. 198 с.
23. Цыганов Д. Н. Фитоиндикация экологических режимов в подзоне хвойно-широколиственных лесов. М.: Наука, 1983. 196 с.
24. Червона книга України. Рослинний світ / за ред. Я.П. Дідуха. К.: Глобалконсалтинг, 2009. 900 с.
25. Чорней І. І. Флора Чивчино-Гринявських гір (Українські Карпати): автореф. дис. ... д-ра біол. наук: 03.00.05. Чернівці, 2009. 41 с.
26. Ellenberg H. Zeigerwerte von Pflanzen in Mitteleuropa // Scripta Geobot. 1992. Bd. 18. 258 S.
27. Meusel H., Jäger E., Weinert E. Vergleichende Chorologie der Zentraleuropäischen Flora. Jena: Fischer, 1965. Bd. 1. 583 S.
28. Mosyakin S. L., Fedoronchuk M. M. Vascular plants of Ukraine. A nomenclatural checklist. Kyiv: Kholodny Institute of Botany, 1999. 345 p.
29. Page C. Ecological strategies in fern evolution: a neopteridological overview // Rev. Palaeobot. Palynol. 2002. Vol. 119. P. 1–33.
30. Raunkiaer C. Life forms of plants and statistical plant geography C. Raunkiaer. N. Y.; L., 1934. 352 p.
31. Ross M. Mapping the world's pteridophyte diversity – sistematics and floras // Pteridology in Perspective. Kyiv: Rojal Botanic Gardens, 1996. P. 29–42.
32. Rothmaler W., Eckehart J., Jäger et al. Exkursionsflora von Deutschland. Bd. 3: Gefäßpflanzen: Atlasband. Jena; Stuttgart: Gustav Fischer, 1995. 754 S.
33. Rothwell G. W. Complex Paleozoic Filicales in the evolutionary radiation of ferns // Amer. J. Bot. 1987. Vol. 74. P. 458–461.
34. Rothwell G. W. Pteridophytic evolution: An often underappreciated phytological success story // Rev. Palaeobot. Palynol. 1996. Vol. 90. P. 209–222.
35. Szafer Władysław. Ogólna geografia roślin. Państwowe wydawnictwo naukowe. Warszawa, 1964. 433 s.

Стаття надійшла до редакції 30.05.19

доопрацьована 05.09.19

прийнята до друку 19.09.19

**SECTION *POLYPODIOPHYTA* IN THE STRUCTURE
OF FLORA OF THE NATIONAL NATURAL PARK “GUTSULSHCHYNA”
(UKRAINIAN CARPATHIANS)**

M. Tomych

*National Natural Park “Gutsulshchyna”
Druzhy St. 84, Kosiv, Ivano-Frankivsk reg. 78601, Ukraine
e-mail: maritom82@ukr.net*

National Natural Park “Gutsulshchyna” is situated on the territory of the Kosiv district of Ivano-Frankivsk region on the area of 322.71 km². In the borders of NNP we have found 27 species of ferns, which belong to 16 generas and 9 families. Here we are representing a list of the flora of *Polypodiohyta* plants section, biomorphological, ecological, regional and geographical characteristic of each species of higher spore plants on the territory

of NNP "Hutsulshchyna". According to zonal distribution the largest group among ferns are plurizonal species – 33.3 %, boreal-submeridional – 22.2 %, temperate-meridional – 14.8%, boreal-meridional – 11.1 %, arctic-meridional and boreal-subtropic – 7.4 % respectively and boreal-temperate – by 3.7 %. An altitude analysis of pteridophytes shows that among seven groups of flora's distribution the biggest is the group of montana-plain species – 85.1 %. The climatic analysis of Polypodiophyta plants section shows, that dominative is the group of oceanists – 81.5 %. The character of distribution of ferns across the globe designate the regional distribution of species. The dominative group, which includes more than half of all species composition are circumpolar species – 59.3 %, they are occurring in the entire of all Northern hemisphere. The other groups make a small part of the total numbers of ferns. The result of analyze of the life forms of *Polypodiophyta* by K. Raunkier was next: they are represented by two groups, hemicryptophytes dominate – 70.4 %, geophytes are less than one third of the species – 29.6 %. The ratio of the ferns according to the level of moisture content of the soil (substrate) is as follows: the largest group is mesophytes – 70.4 %, mesogigrophytes – 22.2 %, while hihrophytes and xeromesophytes includes only one species – 3.7 % of the total numbers of ferns. A distribution of the ferns on the territory of NNP "Hutsulshchyna" as a measure of trophy of the substrate is: mesotrophs are 55.6 %, mesoeutrophs – 40.7 % of the total number of species, shows a moderate curiosity to the richness of the soil. In the researching group of the flora of NNP "Hutsulshchyna" there is significant advantage of sciophytes, which life cycle undergo in the conditions of rather weak light (55.6 %), they are confined to forest phytocenoses. Sciogeliophytes which can existing on the open areas and withstand a certain degree of shading make up 33.3 % of the total number of species. Among the 27 species of ferns which are founded on the on the territory of the National park two species (*Botrychium lunaria*, *Cystopteris sudetica*) are included in the Red Book of Ukraine. The list of endemic, relict, rare and endangered plant species known from the territory of the Ivano-Frankivsk region includes *Ophioglossum vulgatum*, *Phyllitis scolopendrium*, *Polystichum braunii*, *Polystichum aculeatum*.

Keywords: flora, ferns, geographic distribution, life forms, ecotops

УСПАДКУВАННЯ ОРАНЖЕВИХ ЗАБАРВЛЕНЬ КРАЙОВИХ КВІТОК СОНЯШНИКУ

К. Ведмедєва

*Інститут олійних культур НААН України
вул. Інститутська, 1, с. Сонячне, Запорізька обл. 70417, Україна
e-mail: vedmedeva.katerina@gmail.com*

У наукових роботах описано до п'яти типів забарвлення крайових квіток соняшнику (*Helianthus annuus* L.) одночасно: лимонне, світло-жовте, кремове (абрикосоє), жовте й оранжеве. Повідомлено про моногенний рецесивний контроль оранжевого забарвлення щодо жовтого. Відомо п'ять хімічних сполук пігментів, унікальних для оранжевого забарвлення.

Мета нашого дослідження – встановити різноманітність і з'ясувати генетичний контроль оранжевого забарвлення крайових квіток соняшнику. Матеріалом дослідження слугувала колекція ліній соняшнику Інституту олійних культур Національної академії аграрних наук України. Для дослідження використано 28 ліній, із яких 14 ліній мали темне забарвлення крайових квіток соняшнику. Досліди проводили упродовж 2012–2018 рр. Визначення кольору крайових квіток соняшнику проводили з використанням сканера HP300 і програми Photoshop.

Вивчення параметрів складових забарвлення трьох каналів RGB показало істотну зміну і відмінність у забарвленні квіток ліній за каналом G. Окремо аналізували дві частини квітки: крайову половину й основну – ближчу до місця прикріплення квітки до кошика. Існують лінії з однаковим і різним відтінком забарвлення частин квітки. Розраховано кількісні показники забарвлення за жовтим кольором показали розподіл ліній на кілька груп. Найбільш темне оранжеве забарвлення має група з 9 ліній. Діапазон інтенсивності забарвлення за каналом G цієї групи 150–107, а краю – 165–185. Ще 6 ліній утворили групу зі ще світлішим забарвленням, схожим на оранжеве. Діапазон забарвлення основи квітки цієї групи 170–180, а краю 190–205. Щоб виділити цю групу окремо, забарвлення позначили як темно-жовте. Третя група ліній має жовте забарвлення. Відмінність груп ліній із оранжевим, темно-жовтим і жовтим забарвленням квіток доведена з імовірністю більше 0,001.

Вивчено нащадків першого та другого покоління від схрещувань ліній із різними типами забарвлення крайових квіток. Встановлено моногенний рецесивний контроль ознаки темно-жовтого забарвлення квіток лінії НАР7 щодо звичайного жовтого забарвлення крайових квіток. Встановлено домінуючий контроль ознаки темно-жовтого забарвлення квіток лінії НАР7 щодо оранжевого забарвлення крайових квіток. Встановлено, що оранжеве забарвлення лінії КП11Б обумовлено двома рецесивними генами в гомозиготному стані щодо жовтого забарвлення.

Ключові слова: соняшник, лінія, оранжеве забарвлення крайових квіток, ген, алель

Забарвлення крайових квіток соняшнику – одна з найпомітніших морфологічних ознак. Ця ознака використовується для морфологічного маркування господарських ліній і в селекції декоративних форм. В обох випадках використовують лише кілька типів забарвлень, що зумовлено невеликою обізнаністю щодо різноманіття та їхнього генетичного контролю [5, 11].

Генетика ознаки забарвлення крайових квіток соняшнику (*Helianthus annuus* L.) вивчається досить давно. У наукових роботах описано до п'яти типів забарвлення одночасно: лимонне, світло-жовте, кремове (абрикосове), жовте й оранжеве. За допомогою сучасних методів молекулярного аналізу геному вивчено еволюцію культурного соняшнику і представлено на карті геному [6]. В 11-й хромосомі виявлено молекулярний маркер гена, який відповідає за появу лимонного забарвлення квіток соняшнику [14]. Для інших типів забарвлення не виявлено молекулярних маркерів і місця локалізації генів, що їх контролюють.

Встановлено моногенне рецесивне успадкування кількох типів світлих забарвлень крайових квіток: лимонного, сірчастого, світло-жовтого [13]. Успадкування антоціанової пігментації квіток соняшнику вивчено у двох дослідженнях [7, 12]. У той же час більш темні не антоціанові тони усі дослідники називають оранжевим забарвленням. Повідомлено про моногенний рецесивний контроль оранжевого забарвлення щодо жовтого [10]. Нещодавно було встановлено наявність абрикосового забарвлення, яке контролюється алелем оранжевого забарвлення квіток [3].

Вивчення пігментів, які утворюють забарвлення в соняшнику, показало наявність п'яти хімічних сполук, унікальних для забарвлення квіток [1]. Більш детальний розгляд забарвлень крайових квіток жовтого й оранжевого діапазону дає можливість виявити нерівномірність забарвлення різних частин крайових квіток [2]. Усе це вказує на недостатність вивчення генетичного контролю оранжевого забарвлення крайових квіток соняшнику.

Мета нашого дослідження – встановити різноманітність і успадкування оранжевого забарвлення крайових квіток соняшнику.

Матеріали та методи

Матеріалом дослідження слугувала колекція ліній соняшнику Інституту олійних культур Національної академії аграрних наук України. Для дослідження використано 28 ліній, із яких 14 ліній мали темне забарвлення крайових квіток соняшнику. Дослідження проводили у 2012–2018 рр. в науковій сівозміні. Насіння ліній, гібридів першого і другого покоління висівали ручними сівалками, кожен генотип не менше 20 рослин щорічно. Рослини ізолювали індивідуальними ізоляторами, кастрували, схрещували, самозапилювали, обмолочували дозрілі кошики вручну, кожен окремо.

Визначення кольору крайових квіток соняшнику проводили з використанням сканера HP300 і програми Photoshop у режимі RGB [4]. Режим описує всі відтінки забарвлень за допомогою трьох кольорових каналів у цифрах від 0 до 255. Для аналізу брали 7–10 квіток із різних рослин лінії, 20 квіток гібридів першого покоління і по 5 квіток кожної рослини з гібридів другого покоління. Рослини розподіляли на класи відповідно до батьківських забарвлень. Статистичну достовірність відмінностей між батьківськими лініями перевіряли за допомогою критерію Сьюдента. Достовірність гіпотези розщеплення підтверджували критерієм достовірності Пірсона [8].

Результати і їхнє обговорення

Вивчення параметрів складових забарвлення, а саме трьох каналів RGB показало істотну мінливість у забарвленні квіток ліній саме за каналом G. Крайові квітки досліджуваних ліній були проскановані та розраховані середні значення за жовтою складовою забарвлення. При цьому окремо аналізували дві частини квітки: крайову половину й основну – ближчу до місця прикріплення квітки до кошика. Як з'ясовано раніше [2], існують лінії з однаковим і різним відтінком забарвлення частин квітки. Ця особливість характерна для оранжевих і жовтих квіток. Включені в дослідження лінії були виміряні за забарвленням квіток семи рослин трьох років вирощування. Усереднені дані з відпо-

відними похибками представлені на рис. 1, з якого видно, що описані лінії зосереджені в кількох групах. Найтемніше забарвлення має група з 9 ліній (I2K670, InK235, In7034, K103, VIP130, APS56, LD156, APS 04, КП11Б). Цей тип забарвлення дослідники завжди виділяли як оранжевий. Діапазон інтенсивності забарвлення каналу G основи квіток цієї групи 150–107, а краю – 165–185. Ще 6 ліній утворили другу групу, з трохи світлішим забарвленням, але візуально схожим на оранжеве: M10, LD835, HAP7, InK630, I3K2218, Temp1254. Частина цих ліній була візуально описана раніше і позначена у публікаціях як така, що має оранжеве забарвлення крайових квіток. Діапазон забарвлення основи квітки цієї групи 170–180, а краю – 190–205. Щоб виділити цю групу окремо, забарвлення позначимо далі як темно-жовте. Усі інші лінії позначені як жовті й одна ЛВО12 – світло-жовта за забарвленням крайових квіток.

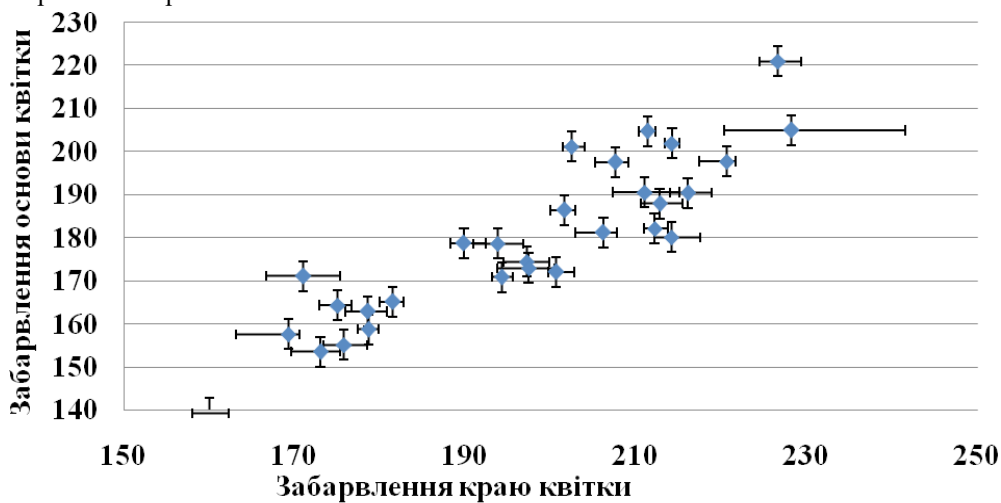


Рис. 1. Забарвлення крайових квіток ліній соняшнику за каналом (G)

Виділені групи ліній з оранжевим, темно-жовтим і жовтим забарвленням квіток перевірено на наявність відмінності між групами із застосуванням однофакторного дисперсійного аналізу. Аналіз проводили окремо за забарвленням основи та краю квіток (табл. 1–2).

У результаті отримано наявності відмінностей груп між собою з імовірністю більше 0,001. Попарне порівняння груп оранжевих, темно-жовтих і жовтих за забарвленням квіток груп ліній за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу також виявило достовірність відмінностей між ними з імовірністю більше 0,001.

Таблиця 1

Однофакторний дисперсійний аналіз забарвлення краю квіток

Групи	Кількість рослин	Сума показників	Середнє	Дисперсія		
Оранжеві	34	5909	173,79	78,71		
Темно-жовті	35	6677	196,38	41,76		
Жовті	35	7310	208,86	72,01		
Дисперсійний аналіз						
Джерело варіації	SS	df	MS	F	P-значення	F критичне
Між групами	21728,32	2	10864,16	169,12	8,21E-33	3,09
Усередині груп	6423,87	100	64,24			
Усього	28152,19	102				

Однофакторний дисперсійний аналіз забарвлення основи квіток

Групи	Кількість рослин	Сума показників	Середнє	Дисперсія		
Оранжеві	34	5262	154,77	107,34		
Темно-жовті	35	6243	178,37	56,30		
Жовті	35	6451	184,31	105,52		
Дисперсійний аналіз						
Джерело варіації	SS	df	MS	F	P-значення	F критичне
Між групами	16783,71	2	8391,85	93,72	9,67E-24	3,09
Усередині груп	9043,83	101	89,54			
Усього	25827,54	103				

Для встановлення генетичного контролю забарвлень квіток проведено низку схрещувань між лініями всередині груп і між ними. Кожна із пар схрещування була проаналізована за допомогою однофакторного аналізу на відмінність за каналом забарвлення (G). Попарне порівняння ліній у межах кожної групи в більшості випадків не мало достовірних відмінностей згідно з критерієм Стьюдента.

У групі ліній з оранжевим забарвленням квіток проаналізовано комбінації схрещування: I2K670 x КП11Б, K103 x APS04, VIP130 x LD156, K103 x InK235, APS56 x K103, InK235 x K103, КП11Б x APS04. Отримані гібриди першого і другого покоління були в рамках оранжевого забарвлення крайових квіток.

Отримано нащадки першого та другого поколінь від схрещування класичної оранжевої лінії VIP130 і мутанта M10 із групи ліній з темно-жовтим забарвленням крайових квіток. Обидві лінії раніше описували як такі, що мають оранжеве забарвлення. Результати представлено на рис. 2.

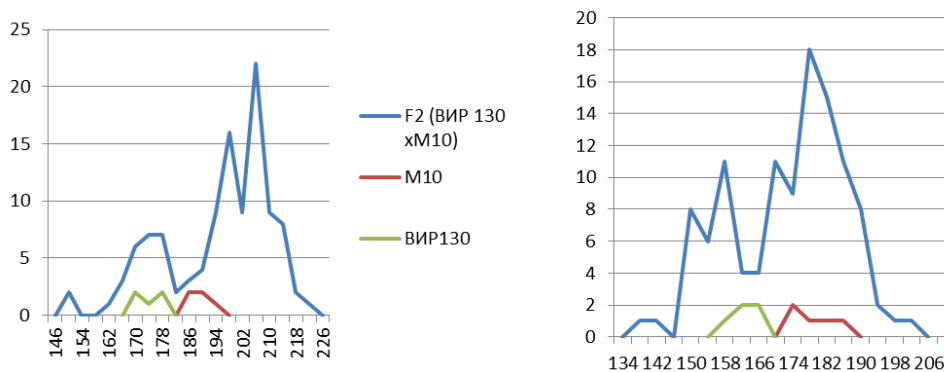


Рис. 2. Забарвлення краю квітки (зліва) і основи квітки (справа) в комбінації схрещування VIP 130 x M 10

Гібриди першого покоління мали темно-жовте забарвлення квіток зі світлішим за основу краєм. Добре видно відмінність батьківських форм і поділ другого покоління на два класи. За краєм квітки поділ чітко відповідав батьківським лініям.

Фактичний обсяг рослин за забарвленням краю квіток становив : 85 темно-жовтих : 26 оранжевих, що відповідає моногенній моделі успадкування 3:1 $\chi^2 = 0,15$. Можна зробити висновок про рецесивне успадкування ознаки оранжевого забарвлення краю квітки у лінії VIP130 щодо темно-жовтого забарвлення в лінії M10.

Під час розгляду забарвлення основи квіток співвідношення нащадків у другому поколінні становило 65 темно-жовтих до 46 оранжевих, що відповідає моделі розщеплення 9:7 $\chi^2 = 0,24$. З вищеописаного видно, що вивчені лінії відрізняються за забарвленням краю

квітки за одним геном, а за основою – двома. Відмінний варіант генетичного контролю забарвлення основи квіток від забарвлення краю може бути пояснений наявністю окремих генів забарвлення саме основи квіток. Нашими попередніми дослідженнями [2] було встановлено наявність різного забарвлення частин крайових квіток соняшнику. При цьому досліджено лінії з різними його варіантами. Забарвлення квіток усіх ліній соняшнику має два варіанти: або однакове для обох частин квітки, або більш темне (темно-жовте, оранжеве) для основи. Опис забарвлення за обома частинами квіток необхідний для подальших досліджень із вивчення генетики основи забарвлення квіток.

Виявлені відмінності у забарвленні різних частин квітки ми простежили подібним же чином за допомогою сканування нащадків другого покоління в комбінації схрещування APS56 x HAP7 (рис. 3). У цій комбінації материнська лінія належала до групи оранжевих за забарвленням крайових квіток, а батьківська – до темно-жовтих.

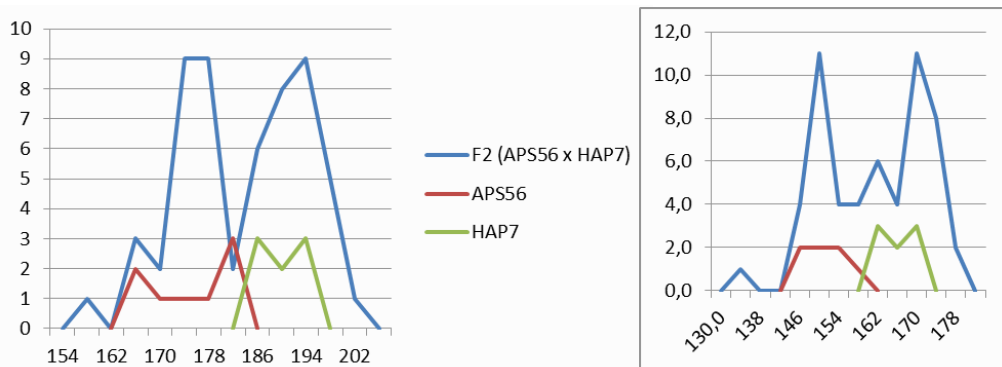


Рис. 3. Забарвлення краю квіток (зліва) і основи квіток (справа) в комбінації схрещування APS56 x HAP7

У результаті за забарвленням краю квітки помітні відмінності між батьківськими лініями і спостерігається розщеплення у другому поколінні на два класи: 29 темно-жовтих і 26 оранжевих, що відповідає співвідношенню 9:7 $\chi^2 = 0,28$ або 1:1 $\chi^2 = 0,16$.

За основою квітки спостерігається схожа картина, рослини поділяються на два класи: 31 рослина з темно-жовтим забарвленням квіток і 24 з оранжевим забарвленням квіток, що відповідає моделі 9:7 $\chi^2 = 0,01$ або 1:1 $\chi^2 = 0,90$. Отримані розщеплення можна інтерпретувати двома версіями, але попереднє схрещування лінії з оранжевим забарвленням з лінією з темно-жовтим ВІР 130 x М 10 вказало на наявність одного гена. Тому можна вважати, що в цьому разі ми натрапили на гетерозиготу за геном темно-жовтого забарвлення.

Лінію з жовтим забарвленням крайових квіток М1048 схрестили з лінією з оранжевим забарвленням крайових квіток КП11Б. Гібриди першого покоління мали проміжне забарвлення (рис. 4). Край квітки мав світло-оранжеві тони забарвлення і наближався до лінії М1048, тобто до жовтого. За забарвленням основи квіток спостерігали оранжеве забарвлення, як у батьківської лінії КП11Б.

У другому поколінні спостерігали розщеплення за забарвленням крайових квіток, з переважанням нащадків жовтого забарвлення, серед яких є рослини з більш світлим забарвленням, ніж найсвітліший (жовтий) із батьків М1048. Виділення із загального числа нащадків другого покоління рослин, відповідних батьківській лінії КП11Б з темно-оранжевим забарвленням квітки за краєм квітки показало 4 рослини, а за основою 5 із 46 рослин другого покоління. Отримане розщеплення відповідає співвідношенню 15:1 ($\chi^2 = 0,47$ для краю і $\chi^2 = 1,67$ для основи квіток). Це свідчить про дигенний контроль різниці

в забарвленні квіток батьківських ліній. Оранжеве забарвлення в цьому разі обумовлено рецесивним станом двох генів.

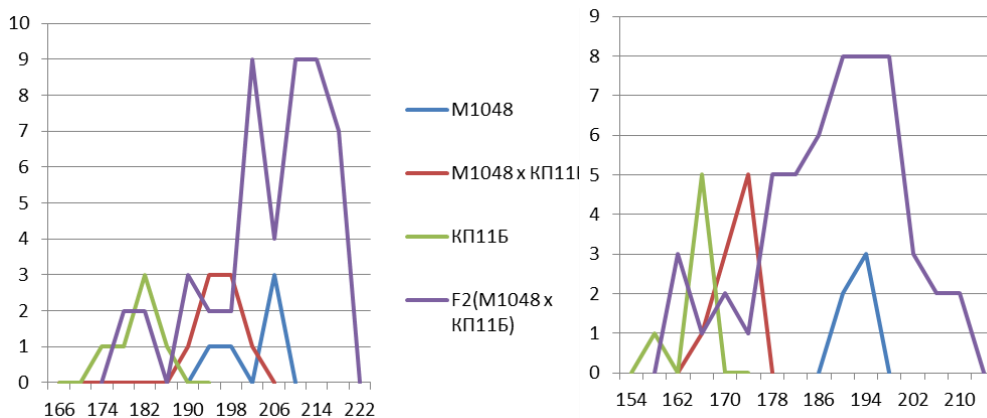


Рис. 4. Забарвлення краю квіток (зліва) і основи квіток (справа) в комбінації схрещування М1048 х КР11Б

Гібриди першого покоління від схрещування лінії НАР7 з темно-жовтим забарвленням крайових квіток з лінією М1048 з жовтим забарвленням квіток мали жовте забарвлення, близьке до лінії М1048. Друге покоління показало розщеплення (рис. 5).

Отримано співвідношення жовтих і темно-жовтих нащадків за краєм квіток 38:16, а за основою квіток 45:13. Обидва співвідношення достовірно відповідають моногенній моделі розщеплення 3: 1 ($\chi^2 = 0,62$ по краю квітки і $\chi^2 = 0,21$ по основі).

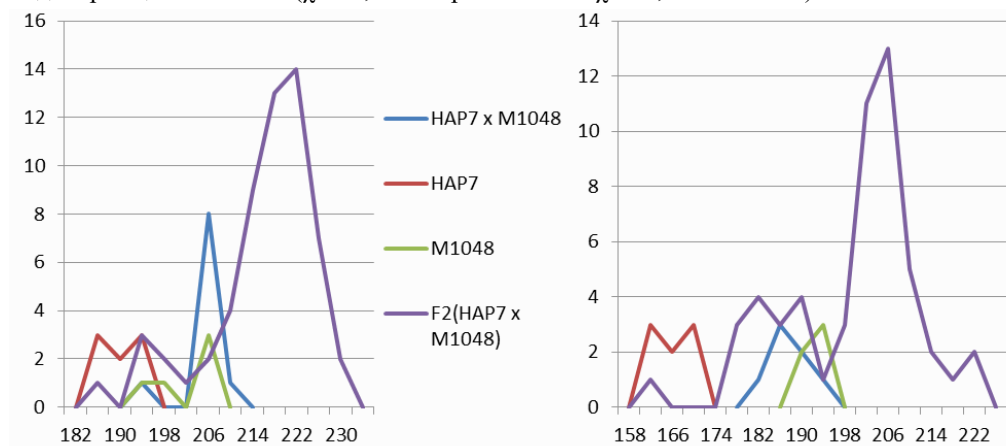


Рис. 5. Забарвлення краю квітки (зліва) і підстави квітки (справа) в комбінації схрещування НАР7 х М1048

Для конкретності результатів слід відокремлювати забарвлення частин квіток, оскільки вони не завжди збігаються, як за забарвленням, так і за кількістю генів, що його контролюють. Проаналізовані схрещування можна представити у вигляді схеми генетичних відмінностей ліній із різним типом забарвлення краю квіток (рис. 6.) Стрілочками позначено домінування ознаки, з внутрішнього боку стрілочок отримано співвідношення другого покоління за класами забарвлення крайових квіток, із зовнішнього боку кількість генів, що їх обумовлюють.

Зі схеми зрозуміло, що виділений новий тип забарвлення крайових квіток – темно-жовтий – справді відрізняється і від оранжевого, і від жовтого не тільки своїм діапазоном забарвлення, а й наявністю розщеплення. Так, розщеплення за краєм квіток у другому поколінні від схрещувань ліній з оранжевим і темно-жовтим забарвленням: 3:1 та 1:1. Це свідчить про наявність одного гена.

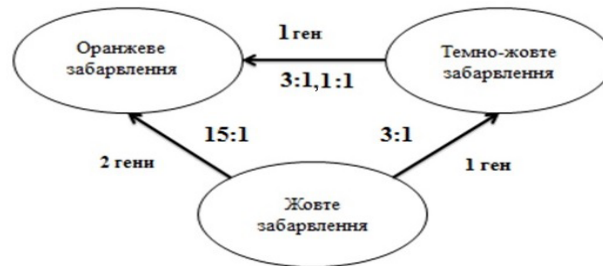


Рис. 6. Схема генетичних відмінностей за забарвленням квіток соняшнику між групами ліній

Варіант 1:1 може вказувати у випадку другого покоління на гетерозиготу, а варіант 3:1 свідчить про моногенну модель. Інші комбінації схрещування показують наявність моногенного контролю ознаки темно-жовтого забарвлення та дигенного оранжевого щодо жовтого. Жовте домінує в обох випадках. Різний контроль темних забарвлень опосередковано вказує на наявність і різних генів, що обумовлюють оранжеве й темно-жовте забарвлення. Встановлення генетичного контролю забарвлення різних частин квіток у групі ліній із темно-жовтим забарвленням щодо ліній з оранжевим забарвленням крайових квіток потребує більшої кількості схрещувань і буде розглянуто у наступному дослідженні.

Із наукових статей інших авторів відомо про типи забарвлень і їхній генетичний контроль. Леклерк [10] встановив, що оранжеве забарвлення квіток соняшнику обумовлене одним рецесивним геном. Усі інші дослідники [7, 9] також опублікували спостереження, які вказували на моногенний контроль цієї ознаки, обумовлений рецесивним станом гена. Поки використовували лише зорове сприйняття забарвлень квіток соняшнику, ми також могли доповісти про наявність одного гена, хоча в наших дослідженнях під час порівняння квіток між собою завжди виникали питання стосовно появи більш темних або проміжних типів забарвлень, а особливо стосовно появи різного забарвлення частин квіток у гібридах. Перехід до точного визначення цього параметра показав, що є ще один темний тип забарвлення крайових квіток соняшнику, і слід виділяти, крім оранжевого, ще й темно-жовте забарвлення окремо.

Виділення нового темно-жовтого забарвлення не суперечить відомим знанням з успадкування забарвлення квіток. Використання нових методів дослідження збільшує роздільну здатність генетичних досліджень і допоможе порівняти у майбутньому кожну одиницю успадкування з відповідними хімічними сполуками, які обумовлюють забарвлення у соняшнику [1].

Доведено наявність трьох груп ліній із різними типами забарвлення крайових квіток соняшнику: жовтим, темно-жовтим і оранжевим.

Встановлено моногенний рецесивний контроль ознаки темно-жовтого забарвлення квіток лінії НАР7 щодо звичайного жовтого забарвлення крайових квіток.

Встановлено домінантний контроль ознаки темно-жовтого забарвлення квіток лінії НАР7 щодо оранжевого забарвлення крайових квіток.

Встановлено, що оранжеве забарвлення лінії КП11Б обумовлено двома рецесивними генами в гомозиготному стані щодо жовтого забарвлення.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Барнашова Е. К., Лобачев Ю. В., Воронков М. Г., Белоусов Е. Б. Масс-спектрометрическое определение химического состава красящих пигментов язычковых цветков подсолнечника // *Агрохимия*. 2007. № 9. С. 75–79.
2. Ведмедева К. В. Окраска краевых цветков в коллекции линий подсолнечника // *Масличные культуры. Науч.-тех. бюллетень ВНИИМК*. 2017. Вып. 4 (172). С. 31–38.
3. Ведмедева К. В. Успадкування ознаки абрикосового забарвлення крайових квіток соняшнику (*Helianthus annuus* L.) // *Plant Varieties Studying and Protection*. 2019. Vol. 15. No. 2. С. 118-123. DOI: <https://doi.org/10.21498/2518-1017.15.2.2019.173556>
4. Пат. 87462 Україна, МПК А01G 7/00 Спосіб визначення забарвлення крайових квітів соняшнику / Ведмедева К.В.; заявник і патентовласник : Інститут олійних культур НААН – № u2013 09730; заявл. 05.08.2013 ; опубл. 10.02.2014. Бюл. № 3. [Ссылка на документ <http://uapatents.com/4-87462-sposib-viznachennya-zabarvlennya-krajjovikh-kvitiv-sonyashniku.html>]
5. Пимахин В. Ф., Лобачев Ю. Г. Использование маркерных признаков у подсолнечника // *Генетика*. 1994. Т. 30. Приложение. С. 121. / Pimakhin, V.F., Lobachev YU.G. The use of marker features in sunflower // *Genetics*. 1994. Т. 30. Appendix. FROM. P. 121.
6. Badouin H. J., Gouzy H., Langlade N. B. The sunflower genome provides insights into oil metabolism, flowering and Asterid evolution // *Nature*. 2017. N 546. P. 148–152.
7. Fick G. N. Genetics of Floral Color and Morphology in Sunflower // *J. Heredity*. 1976. N 67. P. 227–230.
8. Gomez K. A., Gomez A. A. Statistical procedures for agricultural research. New York, 1984. 704 p.
9. Kovacic A., Skaloud V. Results of inheritance evaluation of agronomically important traits in sunflower // *Helia*. 1990. N 13. P. 41–46.
10. Leclerg P. Heredity de quelques caracteres qualitatifs chez le tournesol // *Ann. Amelior. Plants*. 1968. N 18. P. 307–315.
11. Mladenovic E., Cvejic S., Jovic S. et al. Variability of morphological characters among ornamental sunflower collection // *Genetika*. 2017. No. 49 (2). P. 573–582.
12. Secerov-Fiser V., Skoric D. Inheritance of flower colour and morphology in ornamental sunflower // *Proc. 12th Sunflower Conf., Novi Sad, Yugoslavia 2–29 July 1988*. Paris, France: Int Sunflower Assoc, 1988. P. 442.
13. Škorić D., Seiler G. J., Zhao L. Sunflower breeding. Novi Sad, Serbia: Serbian Academy of Science and Arts, 2012. 520 p.
14. Yue B., Vick B. A., Yuan W., Hu J. Mapping one of the 2 genes controlling lemon ray flower color in sunflower (*Helianthus annuus* L.) // *J. Heredity*. 2008. N 99. P. 564–567.

Стаття надійшла до редакції 29.07.19

доопрацьована 07.10.19

прийнята до друку 11.11.19

**INHERITANCE OF ORANGE COLORS
OF THE INFERTALE RAY FLOWERS OF SUNFLOWER****K. Vedmedeva**

*Institute of Oilseeds, NAAS of Ukraine
1, Instytutska St., v. Sonyachne, Zaporizhzhya region 70417, Ukraine
e-mail: vedmedeva.katerina@gmail.com*

In scientific literature sources it is described up to 5 types of coloring of the edinfertale ray flowers of sunflower (*Helianthus annuus* L.) simultaneously: lemon, light yellow, cream (apricot), yellow and orange. Monogeneous recessive control of orange color in relation to yellow was reported. It is known 5 chemical compounds of pigments unique to orange coloring.

The aim of our research was to establish the variability and inheritance of orange color of the infertale ray flowers of sunflower. The material of the study was the collection of sunflower lines of the Institute of Oilseeds of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine. For study, 28 lines were used, of which 14 lines had a dark color of the infertale ray flowers of sunflower. Experiments were conducted in 2012–2018. Determination of the color of the infertale ray flowers of sunflower was carried out using the HP300 scanner and the Photoshop program.

Study of the parameters of the color components of the three channels of RGB showed a significant change and the difference in the color of the colors of the lines along the channel G. Separately analyzed two parts of the flower: the marginal half and the main part – closer to the place of attachment of the flower to the sunflower heart. There are lines with the same and different tint of coloring parts of the flower. Observed quantitative expressions of yellow color showed the distribution of lines into several groups. The darkest orange color is the group of 9 lines. The range of the intensity of the channel G of this group is 150–107, and the marginal half is 165–185. Another 6 lines formed a group with a lighter coloring similar to orange. The color range of the main part of the flower of this group is 170–180, and the marginal half is 190–205. With aim to isolate this group, the color is labeled as dark-yellow. The third group of lines is yellow. Significans of the variability of groups of lines with orange, dark yellow and yellow color of flowers is more than 0.001.

The first and second generation from crossings the lines with different types of color of infertale ray flowers were studied. Monogeneous recessive control of the trait of the dark-yellow color of the HAP7 line flowers was established in relation to the usual yellow color of the infertale ray flowers. The dominant control of the dark-yellow color of HAP7 flowers relative to the orange color of the ray flowers was established. It has been established that the orange color of the line KP11B is formed due to two recessive genes in the homozygous state in relation to the yellow color.

Keywords: sunflower, line, orange color of infertale ray flowers, gene, allele

**TN5-BASED TRANSPOSON MUTAGENESIS
OF *STREPTOMYCES GHANAENSIS* ATCC14672: SEARCHING
FOR NOVEL REGULATORS OF MOENOMYCIN PRODUCTION**

Y. Kuzhyk¹, Y. Rebets², I. Popko¹, I. Ostash¹, S. Walker², V. Fedorenko¹, B. Ostash^{1,*}

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

²*Harvard Medical School
4, Blackfan Circle, Boston, MA 02115, USA*

**e-mail: bohdan.ostash@lnu.edu.ua*

Streptomyces ghanaensis ATCC14672 is the only genetically characterized natural producer of moenomycin A (MmA), a unique phosphoglycolipid antibiotic capable of direct inhibition of peptidoglycan glycosyltransferases. At the moment there are no drugs on the market that would target this step of peptidoglycan formation. There is much interest in development of MmA-based drugs to combat growing threat of multidrug resistant Gram-positive infections. Consequently, there is also major interest in development of microbiological approaches towards production of this natural compound via submerged cultivation. Currently available ATCC14672 strains accumulate minute quantities of MmA, which fueled the investigations of genetic control of its biosynthesis over the last decade. Much of our understanding of the regulation of MmA production stems from homology-based approaches. Namely, homologs of known pleiotropic regulators of antibiotic production were searched in ATCC14672 genome and functionally characterized. Although this approach was largely successful, it left out of the focus those regulators of MmA production that share no similarity to the regulators identified in model streptomycetes. In this work we report an attempt to discover novel genes involved in regulation of moenomycin biosynthesis via the use of *Streptomyces* codon-adapted transposon Tn5, which represents an unbiased way to find genuinely new regulators. After a primary screening of transposon library we were able to identify five Tn mutants that differed in morphology and/or total antibiotic production. We identified Tn5 insertion sites in these mutants through sequencing and re-analyzed their moenomycin production levels, revealing two strains with increased total antibiotic activity. The genes affected in Tn5 mutants were cloned into expression vectors and introduced back into wild type (ATCC14672) in order to study the effects of their increased dosage on the strain. One of the genes, *ssfg_04565*, exerted negative effects on antibiotic activity when introduced on the plasmid. Possible functions of the identified genes in the context of secondary metabolism are discussed.

Keywords: Streptomyces ghanaensis, Tn5, transposon mutagenesis, regulatory genes

Moenomycin A (MmA) is a founding member of a small family of phosphoglycolipid natural products that exert very specific and potent antibiotic action on Gram-positive cocci [8]. Particularly, by mimicking Lipid II, natural substrate for peptidoglycan glycosyltransferases, MmA tightly and irreversibly binds the latter thus blocking elongation of peptidoglycan chains and causing bacterial cell rupture [1]. Uniqueness of MmA structure and mode of action makes it an ideal target for development as a drug of novel class. Such antibiotics are desperately needed today because humankind faces unprecedented rise of bacterial infections that resist all currently available drugs [12]. Nevertheless, MmA, as a drug candidate, possesses two shortcomings. First, its pharmacokinetics is suboptimal because it gets absorbed into the bloodstream very poorly,

making oral administration impossible. Once in the blood, the half-life of MmA there is within days range, and not few hours as for the other marketed drugs. Second, due to immensely complex chemical structure, MmA can be produced only microbiologically (e.g. via submerged fermentation). Current MmA production levels are very low (a few milligrams per liter of culture broth), necessitating the strain improvement. Although empirical approaches in the past led to isolation of several promising strains [10], their production profiles (e.g. types of moenomycins being produced) has never been studied, and these strains cannot be retrieved for further exploration. To rationalize the development of moenomycin overproducers, we have been studying the genetics of regulation of MmA biosynthesis since 2007. As a result, a number of regulators of MmA production have been discovered and put to practical purpose of increased antibiotic titers [7]. All these approaches hinged on the fact that global regulatory networks for antibiotic production are quite similar across different species. This homology-based paradigm, however, does not permit to identify genuinely novel regulators for certain metabolic pathway. One possible remedy to this problem is to use an unbiased mutagenesis protocol coupled to screening of MmA-deficient variants. Indeed, recently we demonstrated the feasibility of *mariner* transposon mutagenesis to find novel genes involved in modulation of the level of MmA production [11]. In this work we report the use of another transposon system, based on hyperactive Tn5 variant [9], to search for regulators of MmA production.

Materials and Methods

Strains and plasmids used and constructed in this work are listed in Table 1. Tryptic soy broth (Merck), oatmeal and soy-mannitol agars [3, 4] were used to grow *Streptomyces* and plate matings. *Escherichia 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 aforementioned solid media. Genomic DNA from *Streptomyces* and plasmid DNA from *E. coli* were isolated using standard protocols [3]. Molecular biology enzymes were used according to recommendation of suppliers (Thermo).

Transposon mutagenesis and rescue of genomic fragments carrying Tn insertion sites in *E. coli pir⁺* strains have been done as described in [9]. A 1.5-kb fragment carrying the fd terminator, MCS and promoterless neomycin resistance gene *neo* was cloned as SmaI fragment from pIJ487 [3] into pGEM T-easy vector (Promega) to give pGN1. The 515-bp fragment adjacent to *moeO5* along with first 35 bp of the ORF (*moeO5p*) was amplified from moeno38-5 cosmid with primers O5PFHindIII and O5RXbaI and cloned into respective sites of pGN1 to give pGNO5P. The latter was digested with NheI and MfeI and *moeO5p-neo* cassette was cloned into EcoRI/XbaI sites of pOOB5 [8] to give pONO5P. Moenomycin was extracted from 10 ml of TSB and quantified with the help of agar plug and antibiotic disc assays as described in [6]. For cloning of all *S. ghanaensis* genes a common strategy was adopted. Briefly, all genes (along with their presumed ribosome binding sites) were amplified with dedicated primers (Table 2) to introduced XbaI and EcoRI recognition sites at the gene's ends. The amplicons were digested with XbaI and EcoRI and ligated to respective sites of pTES and pmoeE5script to give final constructs listed in Table 1. Sequencing of the cloned DNA fragment has been performed at the Biopolymers Facility of Harvard Medical School.

Genes that are knocked out in Tn5 *S. ghanaensis* mutants were analyzed using standard homology-based bioinformatics tools. Particularly, homologs were searched within GenBank database using pairwise alignment program BLASTP against taxonomy group "Streptomyces". Synteny analysis was carried out with the help of BioCyc database. Domain structure was predicted using Conserved Domain Database at NCBI.

Table 1

Plasmids and bacterial strains used in this work		
Strain	Relevant characteristics	Source/Reference
<i>S. ghanaensis</i> ATCC14672	Wild type moenomycin producer	ATCC
<i>E. coli</i> DH10B	Routine cloning host; F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15	Invitrogen
<i>E. coli</i> ET12567 pUZ8002	Strain for conjugative transfer of coresident plasmids; <i>dam13::Tn9</i> (Cm ^r) <i>dem6 hsdM hsdR zjj202::Tn10</i> (Tet ^r) <i>recF143 galK2 galT22 ara14 lacY1 xyl5 leuB6 thi1 tonA31 rpsL136</i> (Str ^r) <i>hisG4 tsx78 mtl1 glnV44</i> . pUZ8002 - Km ^r	[3]
<i>E. coli</i> WM6026	<i>lacI^q rrnB3 ΔlacZ4787 hsdR514 ΔaraBAD567 ΔrhaBAD568 rph-1 attλ::pAE12 (ΔoriR6K-cat::Frt5) ΔendA::Frt</i>	[5]
<i>Bacillus cereus</i> ATCC19637	Moenomycin-sensitive test -culture	ATCC
pTNM	<i>ts-or^{ipSG5} aac(3)IV</i> (Am ^r) <i>hygB</i> (Hy ^r); carries synthetic gene <i>tnp(a)</i> of Tn5 transposase; apramycin resistance gene <i>aac(3)IV</i> flanked with mosaic ends for Tnp(a)	[9]
pONO5P	Sp ^r ; φC31-based vector carrying transcriptional fusion of <i>moeO5</i> promoter to aminoglycoside phosphotransferase gene <i>neo</i>	This work
pTES	φC31-based vector for <i>ermEp</i> -driven expression of cloned genes	[2]
pmoeE5script	φC31-based vector carrying <i>moeE5p-gusA</i> transcriptional fusion	[7]
pTESssfg_03173	pTES carrying <i>S. ghanaensis</i> gene <i>ssfg_03173</i> under <i>ermEp</i>	This work
pYK160	pTES carrying <i>S. ghanaensis</i> gene <i>ssfg_04363</i> under <i>ermEp</i>	This work
pKL1j	pmoeE5script where <i>gusA</i> was substituted with <i>S. ghanaensis</i> gene <i>ssfg_02631</i> ; <i>moeE5p-ssfg_02631</i> fusion	This work
pTESssfg_04565	pTES carrying <i>S. ghanaensis</i> gene <i>ssfg_04565</i> under <i>ermEp</i>	This work
pTESssfg_05134	pTES carrying <i>S. ghanaensis</i> gene <i>ssfg_05134</i> under <i>ermEp</i>	This work

Table 2

Primers used in this study

Name	Sequence (5'→3')*	Purpose
pMODfor	CCAACGACTACGCACTAGCCAAC	Sequencing of the
pTn5Oksfor	ATTCAGGCTGCGCAACTG	rescue plasmids
O5PFHindIII	(ATAAGCTTGTCCGGCAGGAATGCATAAC	Construction of
O5PRXbaI	(ATTCTAGAGTTCGGTGTGGTGGTCCAG)	pONO5P
ssfg_04565_XbaI_up	AAATCTAGAGTCGGCGTGAAGCTGGAGCC	Cloning of
ssfg_04565_EcoRI_rp	AAAGAATTCGCGGGGCGTGTTC AAGGCAG	<i>S. ghanaensis</i> genes
ssfg_05134_XbaI_up	AAATCTAGAGCACGGAGAACAGCACATGC	
ssfg_05134_EcoRI_rp	AAAGAATTCGATCAGGCGAGGTC ACTGCC	
ssfg_03173_XbaI_up	AAATCTAGAATCCTCGACATCGGCCTCGAC	
ssfg_03173_EcoRI_rp	AAAGAATTCACATCCGCGACACGTTCCGC	
160up	AAATCTAGAGTACGACCCGACTCGGTCATC	
160rp	AAAGAATTCGTGCGCGTTACAGTCGTCCG	
162up	AAATCTAGACACCCGACTTCGGCTCGATCAC	
162rp	AAAGAATTCGACACGTACGGCTTGCTCATG	

*Restriction sites are underlined

Results and Discussion

Transposon mutagenesis of *S. ghanaensis* ATCC14672. In this work we used to approaches to isolate *S. ghanaensis* Tn5 mutants with altered antibiotic activity. In a direct screening, transposon- vector pTMN was conjugally transferred into ATCC14672 and transpositions were induced and selected for as described in [9]. Single colonies were visually inspected for

changed morphology and overlaid with *B. cereus* to check for antibiotic activity. This is rather tedious way when one has to check bioactivity of thousands of colonies. We therefore devised and tested here an alternative approach based on selection for increased resistance to kanamycin of Tn5 mutants impaired in genes for repressor(s) of moenomycin production. For this purpose, we first constructed reporter plasmid pONO5P where promoter of key MmA biosynthetic gene, *moeO5*, is fused to promoterless reporter gene *neo* for kanamycin resistance. The pONO5P⁺ *S. ghanaensis* exhibited growth on tryptic-soy agar plates supplemented with 100 µg/ml of kanamycin; no growth was observed at 125 µg/ml of kanamycin. We reasoned that transposition of Tn5 into a gene for repressor of *moeO5* transcription would increase the expression of *moeO5p-neo* fusion. This, consequently, will enable the growth of reporter strain in presence of high concentrations of kanamycins, that would otherwise kill *S. ghanaensis*. Through direct screening of approximately 5000 clones we picked 21 Tn5 mutants with altered antibiotic activity. Three mutants (TN2-29, TN12-1, TN12-7) were taken for further analysis due to notable changes in bioactivity and morphology (Fig. 1). Using pONOP5⁺ reporter strain we isolated about 500 Km^r clones of which two mutants, TN-NO12 and TN-NO17, showed increased bioactivity.

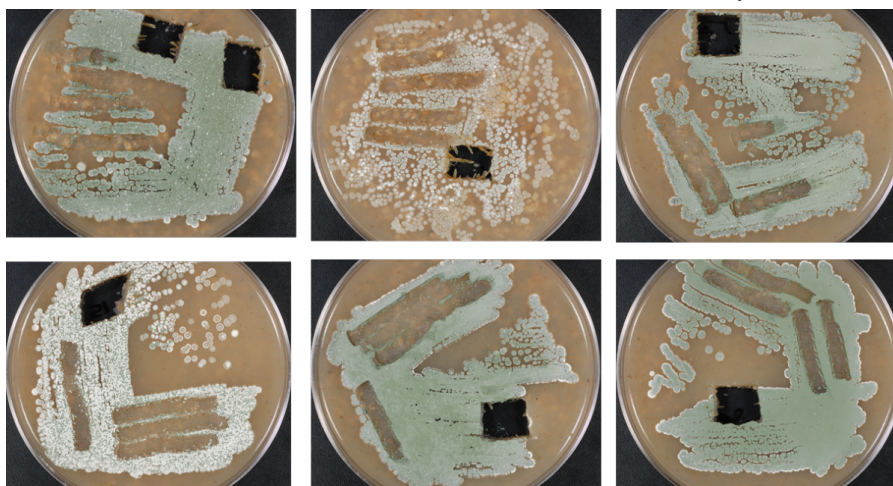


Fig. 1. 5 day-old lawns of *S. ghanaensis* strains on oatmeal agar plates. From top left corner there shown following strains: ATCC14672, TN2-29, TN12-1, TN12-7, TN-NO12, TN-NO17. Note that TN2-29 and TN12-7 are characterized by sparse and delayed sporulation; on second day of growth these mutants still remain white, while the other strains are covered with dark-green spores

Identification of Tn5 insertion sites in YR mutants. Sequencing of Am^r plasmid rescued from genomes of aforementioned mutants showed that in all cases resistance cassette was inserted within coding sequences of genes, proximally to presumable start codon. Information about identified insertion sites is summarized in Table 3. In TN2-29 Tn5 resides within gene *ssfg_03173* for putative type III pantothenate kinase. This is essential enzyme involved in coenzyme A (CoASH) production. Indeed, high-scoring hits to *Ssfg_03173* is encoded within each streptomycete genome. No *ssfg_03173* paralogs can be found in *S. ghanaensis* genome, implying that this strain possesses alternative ways to produce CoASH.

In TN12-1 the insertion was found within gene *ssfg_04363* for lipoprotein of unknown function. This protein also contains von Willebrand factor (vWF) domain. Functions of vWF domain proteins in prokaryotes remain elusive. Several genes for hypothetical proteins are situated around *ssfg_04363*, shedding no light onto the function of the latter. The *Ssfg_04363* are

highly conserved across *Streptomyces*, again pointing to its involvement in as-yet-unknown core processes.

Table 3

Tn5 insertion sites in *S. ghanaensis* YR mutants

Mutant	Insertion	Plausible function (BLASTP result)	Counterpart*; ID%
TN2-29	<i>ssfg_03173</i>	Type III pantothenate kinase; CoA synthesis	KUN23912; 98
TN12-1	<i>ssfg_04363</i>	YeaD2-like lipoprotein with vWF domain	WP_102928894; 96
TN12-7	<i>ssfg_02631</i>	Two-component sensor histidine (His) kinase	KES03849; 87
TN-NO12	<i>ssfg_04565</i>	BaeS-like two-component sensor His kinase	WP_040907105; 96
TN-NO17	<i>ssfg_05134</i>	Class 3 adenylate cyclase	WP_051909073; 75

*Accession number to homologous protein sequence from validly described *Streptomyces* species

In the next two YR mutants, TN12-7 and TN-NO12, Tn5 derailed the expression of putative sensor histidine kinase genes *ssfg_02631* and *ssfg_04565*, respectively. There are *Ssfg_02631* and *Ssfg_04565* counterpart within each streptomycete genome, pointing to their indispensability.

The gene *ssfg_05134* for putative adenylate cyclase is not ubiquitous in *Streptomyces*, suggesting that it controls less conserved, niche functions. Next to *ssfg_05134* are the other genes involved in cyclic nucleotide metabolism. We noted that none of the uncovered BLAST hits for five studied *ssfg* genes was studied experimentally.

Moenomycin production by YR mutants under different cultivation conditions. Primary bioassays provide only rough estimation of antibacterial potency of Tn library, therefore we decided to revisit this issue for selected YR mutants. The latter were grown on oatmeal agar plates and cultivated in liquid TSB medium. The results of these experiments are summarized in Table 4. One can see that for TN12-1 the results of surface and submerged fermentation differ, while for the other strains the data demonstrate roughly the same range of MmA production.

Production of moenomycins by strains carrying additional copy of the genes. We cloned all aforementioned genes from ATCC14672 into actinophage phiC31 expression vectors and the resulting plasmids were introduced into ATCC14672. In this way we generated ATCC14672 derivative carrying single extra copy of a given *ssfg* gene. It could be expected that this extra copy might shift the moenomycin production either towards higher (if the cloned gene is for positive regulator) or lower (for repressors) level than in the ATCC14672. Results of our studies, summarized in the Table 5, demonstrate that only for *ssfg_04565*-expressing strain there was detected significant change in antibacterial activity as compared to control (ATCC14672) strain.

Table 4

Antibiotic activity of YR mutants

Strain	Original notation*	Agar plugs, ø, mm	Disc diffusion, ø, mm
ATCC14672	-	11±2	14±2
TN2-29 (<i>ssfg_03173</i>)	Increase	14±2	18±1
TN12-1 (<i>ssfg_04363</i>)	Decrease	13±1	8±1
TN12-7 (<i>ssfg_02631</i>)	Decrease	9±1	16±1
TN-NO12 (<i>ssfg_04565</i>)	Increase	15±2	17±1
TN-NO17 (<i>ssfg_05134</i>)	Increase	14±1	17±1

*Strain's productivity as determined in primary bioassays, relative to production by ATCC14672

Table 5

Antibacterial activity* of recombinant ATCC14672 derivatives

ATCC14672	pTES <i>ssfg_03173</i> ⁺	pYK160 ⁺	pKL1j ⁺	pTES <i>ssfg_04565</i> ⁺	pTES <i>ssfg_05134</i> ⁺
15	13±2	14±1	13±2	12±1	15±1

*Agar plug assay; *S. ghanaensis* was grown on TSA plates for 5 days

In this work we report molecular genetic analysis of five Tn5 mutants of *S. ghanaensis* initially picked up for changes in antibiotic activity. For two mutants the Tn5 insertion resides in regulatory genes, for protein kinases, whose involvement in certain signaling pathways of secondary metabolism can be rather straightforwardly imagined. It is more challenging to explain how pantothenate kinase or vWF protein can be involved in moenomycin production; this will require more extensive experimental work. In this regard we note that the changes in antibiotic activity that we revealed in Tn mutants were moderate at best, and they show up only under certain conditions, such as submerged fermentation, and not growth on agar plates. The identified genes are likely not key regulators of moenomycin production, but rather modulators of certain signaling or precursor production pathways. So far, studies of mutant TN-NO12 (impaired in kinase gene *ssfg_04565*) showed the most consistent results. Both in solid and liquid media this mutant showed increased antibiotic activity and extra copy of this gene in ATCC14672 caused decreased antibiotic titers. The *ssfg_04565* gene therefore deserves more detailed experimental scrutiny. Our work also attests to the utility of reporter-based strategy for selection of mutants impaired in regulatory genes for antibiotic production.

Acknowledgements. We thank Prof. A. Luzhetskyy (Saarbrücken University, Germany) for providing pTNM plasmid for Tn5 mutagenesis. B.O. and V.F. were supported by the grants BG-80F and BG-46F, respectively, both from Ministry of Education and Science of Ukraine. V.F. and S.W. were supported by NIH grant R03TW009424. The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the NIH. Lilia Kravciv is thanked for initial efforts in construction of pKL1j plasmid.

REFERENCES

1. 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.
2. Herrmann S., Siegl T., Luzhetskyy M. et al. Site-specific recombination strategies for engineering actinomycete genomes // *Appl. Environ. Microbiol.* 2012. Vol. 78. P. 1804–1812.
3. Kieser T., Bibb M., Buttner M. et al. *Practical Streptomyces genetics*. Norwich: John Innes Foundation. 2000. 634 p.
4. Koshla O., Lopatniuk M., Rokytskyy I. et al. Properties of *Streptomyces albus* J1074 mutant deficient in tRNA(Leu)(UAA) gene *bldA* // *Arch. Microbiol.* 2017. Vol. 199. P. 1175–83.
5. Luo Y., Huang H., Liang J. et al. Activation and characterization of a cryptic polycyclic tetramate macrolactam biosynthetic gene cluster // *Nat. Commun.* 2013. Vol. 4. P. 2894–2909.
6. Makitrynskyy R., Rebets Y., Ostash B. et al. Genetic factors that influence moenomycin production in streptomycetes // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2010. Vol. 37. P. 559–566.
7. Makitrynskyy R., Ostash B., Tsyplik O. et al. Pleiotropic regulatory genes *bldA*, *adpA* and *absB* are implicated in production of phosphoglycolipid antibiotic moenomycin // *Open Biology*. 2013. Vol. 3. 130121.
8. Ostash B., Doud E. H., Lin C. et al. Complete characterization of the seventeen step moenomycin biosynthetic pathway // *Biochemistry*. 2009. Vol. 48. P. 8830–8841.
9. Petzke L., Luzhetskyy A. *In vivo* Tn5-based transposon mutagenesis of Streptomycetes // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009. Vol. 83. P. 979–986.
10. Schuricht U., Endler K., Hennig L. et al. Studies on the biosynthesis of the antibiotic moenomycin A // *J. Prakt. Chem.* 2000. Vol. 342. P. 761–769.

11. *Sehin Y., Koshla O., Dacyuk Y. et al. Gene ssfg_01967 (miaB) for tRNA modification influences morphogenesis and moenomycin biosynthesis in Streptomyces ghanaensis ATCC14672 // Microbiology. 2019. Vol. 165. P. 233–245.*
12. *Wright G.D. Q&A: antibiotic resistance: what more do we know and what more can we do? // BMC Biol. 2013. Vol. 11. P. 51. doi: 10.1186/1741-7007-11-51.*

Стаття надійшла до редакції 04.09.19

прийнята до друку 14.11.19

ТРАНСПОЗОННИЙ МУТАГЕНЕЗ *STREPTOMYCES GHANAENSIS* ATCC14672 НА ОСНОВІ Tn5: ПОШУК НОВИХ РЕГУЛЯТОРІВ ПРОДУКЦІЇ МОЕНОМІЦИНУ

Ю. Кужик¹, Ю. Ребець², І. Попко¹, І. Осташ¹, С. Уокер², В. Федоренко¹, Б. Осташ^{1*}

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

²*Гарвардська медична школа
кільце Блекфена, 4, Бостон, МА 02115, США
e-mail: bohdan.ostash@lnu.edu.ua*

Streptomyces ghanaensis ATCC14672 – один із генетично охарактеризованих природних продуцентів моеноміцину А (MmA), унікального фосфогліколіпідного антибіотика, що може прямо інгібувати пептидогліканові глікозилтрансферази. Наразі на ринку немає ліків, які би діяли за таким механізмом. Існує значний інтерес у розробці ліків на основі MmA для лікування множинно стійких грампозитивних інфекцій. Відповідно, неабиякий інтерес становить розробка мікробіологічних підходів до глибинного культивування штаму-продуцента цієї природної сполуки. Наявні штами ATCC14672 накопичують мізерні кількості MmA, що протягом останнього десятиріччя стимулює дослідження генетичного контролю його біосинтезу. Наше розуміння регуляції продукції MmA наразі головню ґрунтується на порівнянні за гомологією. Тобто гомологи відомих плейотропних регуляторів продукції антибіотиків виявляли у геномі ATCC14672 і далі характеризували експериментальними методами. Хоча такий підхід загалом був успішний, за його межами залишилися ті регулятори продукції MmA, що не гомологічні з регуляторами, описаними для модельних стрептоміцетів. У цій статті ми описуємо спробу виявити нові гени, задіяні у регуляції біосинтезу моеноміцину, за допомогою кодон-оптимізованого транспозона Tn5, що репрезентує об'єктивний спосіб виявлення справді нових регуляторів. У результаті первинного скринінгу транспозонної бібліотеки нам вдалося ідентифікувати п'ять Tn5 мутантів, що відрізнялися за морфологією та/або сумарною антибіотичною активністю. Методом секвенування ДНК ідентифіковано сайти інсерції Tn5 у геномах мутантів і повторно проаналізовано їхні рівні продукції моеноміцину. Це привело до виявлення двох мутантів зі збільшеною продукцією антибіотика. Виявлені гени клоновано у вектори експресії та введено у штаму дикого типу (ATCC14672) для вивчення впливу додаткової копії гена на штаму. Один із генів, *ssfg_04565*, справляв негативний вплив на антибіотичну активність, коли його ввели у штаму ATCC14672 на плазміді. Імовірні функції генів обговорено у контексті розуміння регуляції вторинного метаболізму.

Ключові слова: Streptomyces ghanaensis, Tn5, транспозонний мутагенез, регуляторні гени

ВИЯВЛЕННЯ МОЖЛИВОЇ ГЕНОТОКСИЧНОЇ НЕБЕЗПЕКИ ЗА ВИКОРИСТАННЯ СИНТЕТИЧНОГО ХАРЧОВОГО АРОМАТИЗАТОРА «ВИШНЯ»

Л. Боднар, І. Типусяк, С. Горбулінська

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

Складники ароматизаторів зазвичай представлені ксенобіотиками – це не власний живим організм хімічні сполуки, які з натуральними продуктами не надходять в організм людини. Будь-які ксенобіотики, потрапляючи в організм, можуть включатися в обмін речовин, впливати на генетичний матеріал клітини і тим самим призводити до більш або менш важких наслідків. Дана робота присвячена виявленню можливої мутагенної активності синтетичного харчового ароматизатора «ВИШНЯ AS00640» з використанням про- та сукаріотичних тест-систем. Індукування хромосомних аберацій вивчали на двох тест-системах – *Allium cepa* та *Mus musculus*, використовуючи рекомендовану виробником добову дозу, а також іще дві дози – збільшену та зменшену в 10 разів. У тесті на меристемних клітинах корінців цибулі за різних концентрацій рівень хромосомних аберацій за дії ароматизатора перевищував значення контролю. Серед аномалій найчастіше траплялися подвійні фрагменти, які є результатом делецій і утворення одинарних та подвійних мостів (дицентриків) як наслідок процесів транслокацій. На препаратах клітин кісткового мозку мишей було виявлено анеуплоїдні клітини, а також модифіковані набори хромосом. Результати цього тесту корелюють із результатами, отриманими нами в анателофазному тесті на *A. cepa*, у всіх випадках спостерігали дозозалежний ефект. Тест на індукування домінуючих летальних мутацій у *Drosophila melanogaster* показав, що хімічні складові ароматизатора «Вишня AS00640» можуть сприяти появі різноманітних змін у генах і хромосомах, які відповідають за нормальний перебіг процесів сперматогенезу.

Оскільки складники ароматизаторів зазвичай представлені ксенобіотиками, які в організмі вищих сукаріот можуть підлягати частковій або повній біотрансформації, що представлена цілим комплексом як ферментативних, так і спонтанних перетворень, нами проведено дослідження з використанням тесту Еймса з і без метаболічної активації на *Salmonella typhimurium*. У тесті Еймса без метаболічної активації виявили індукування генних мутацій порівняно з контролем за всіх досліджуваних доз лише за механізмом зсуву рамки зчитування. Виходячи з результатів досліджень із додаванням мікросомальної фракції гомогенату печінки щурів, мутагенну активність з використанням штаму TA-98 *S. typhimurium* не було виявлено. Це свідчить про можливість утворення у процесах біотрансформації менш активних метаболітів порівняно з вихідними інгредієнтами ароматизатора, які тим самим сприяють зниженню ризику генотоксичних ефектів нативного продукту.

Ключові слова: ароматизатори продуктів харчування, генні мутації, хромосомні аберації, генотоксичність, біотрансформація ксенобіотиків

У харчовій промисловості дедалі ширше застосовують синтетичні ароматизатори. Це допоміжні полікомпонентні речовини у виробництві фармацевтичних препаратів і продуктів харчування, які використовують у технологічному процесі для поліпшення запаху й смаку готової продукції [5, 15]. До складу ароматизаторів можуть входити, окрім

хімічних сполук або їхніх сумішей, виділених із натуральної сировини, і такі хімічно синтезовані небезпечні речовини, як галова кислота, пропіленгліколь, Д-карвон, бензойна кислота, натрій нітрит, оксифенілон, цис-3-гексеніл та інші [7, 8, 14]. Більшість із цих речовин мають токсичну та мутагенну активність, яка встановлена на різних тест-системах [1, 2, 8, 10, 12, 16]. Фірми-виробники переважно не розголошують повний перелік інгредієнтів ароматизаторів, а якщо його перелічують, то не вказують кількість того чи іншого складника, наприклад, в 1 г ароматизатора. Окрім того, мутагенні й токсичні властивості компонентів ароматизаторів не завжди характеризуються простою сумою мутагенних властивостей кожного з них. Тому важливим підходом до розуміння мутагенного навантаження на геном людини, яке може нести той чи інший ароматизатор, є вивчення саме сумарної мутагенної активності його за різних концентрацій. В Україні використання харчових добавок можливе тільки після їхньої реєстрації центральним органом виконавчої влади у сфері охорони здоров'я, проте висновок про генотоксичну безпеку харчових добавок не є обов'язковим [6, 17]. Останнім часом небезпечним генотоксикантам приділяється все більше уваги, особливо біотестуванню для визначення генотоксичних властивостей їх на різних тест-об'єктах, яке допомагає з'ясувати мутагенну і/або цитотоксичну, і/або канцерогенну дію досліджуваних зразків. Одним із доказових показників мутаційного процесу на клітинному рівні є виявлення генних мутацій і хромосомних аберацій. Підвищений рівень останніх розглядається як хромосомна нестабільність, котра в подальшому може спричинити розвиток злоякісних новоутворень [3, 4, 9, 18].

Метою даної роботи було дослідити можливу мутагенну активність ароматизатора «Вишня AS00640» фірми Etol і деяких його хімічних компонентів із використанням про-й еукаріотичних тест-систем.

Матеріали та методи

У роботі досліджували генотоксичну активність синтетичного харчового ароматизатора «Вишня AS00640» фірми Etol. До компонентного складу даного ароматизатора входять мальтол, який є потенційно шкідливим для здоров'я людини і в багатьох країнах заборонений; бензилальдегід, який легко реагує з нуклеофільними реагентами, вступаючи в різноманітні реакції; пропіленгліколь, який добувають переробкою нафтопродуктів, може викликати алергічні реакції, подразнення, порушення роботи печінки та нирок, у великих дозах впливає на нервову систему, а також може стимулювати виникнення ракових пухлин, і молочна кислота [1, 23]. Також можливі в незначних кількостях домішки – аміачний нітроген, діоксид сульфуру, фосфати, важкі метали, які з'являються в готовому продукті внаслідок технологічних процесів виробництва. З літератури відомо, що аміачний нітроген за ступенем впливу на людину належить до 4-го класу небезпеки, може впливати на репродуктивну функцію, викликаючи природжені вади розвитку, а важкі метали є вираженими мутагенами для еукаріотичних клітин [13, 19]. В експериментах використовували рекомендовану виробником добову дозу ароматизатора – 0,52 г/л, а також ще дві дози – збільшену в 10 разів (5,2 г/л) і зменшену в 10 разів (0,052 г/л).

Дослідження проводили на трьох еукаріотичних тест-об'єктах: *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster*, *Allium cepa* та на прокаріотичному об'єкті *Salmonella typhimurium*. Для виявлення генотоксичного й цитотоксичного впливу розчинів ароматизатора «Вишня AS00640» на геном цибулі *Allium cepa* використовували метод анателофазного аналізу хромосомних аберацій у клітинах кореневої меристеми насіння, яке розвивалося на досліджуваних зразках. У цьому тесті можна фіксувати хромосомні мутації типу делецій і транслокацій, а також порушення веретена поділу за частотою відставання хромосом, багатополюсності й асиметричних мітозів. Окрім того, одночасно можна фіксувати

появу мікроядер, які утворюються з ацентричних фрагментів хромосом і об'єднуються в хромосомні агрегати [11].

Drosophila melanogaster лінії Oregon використовували для виявлення індукування домінантних летальних мутацій (ДЛМ) у процесі сперматогенезу. Згодовування зразками різних концентрацій проводили на личинковій стадії, вносячи їх у кількості 2 мл на поверхню готового поживного середовища. Домінантні летальні мутації, які виникають за дії хімічних сполук у клітинах процесу сперматогенезу, можуть призводити до летальності зиготи. Такі ефекти відбуваються, наприклад, за дефіциту хромосомного матеріалу в геномі або за різноманітних змін у генах і хромосомах, які призводять до блокування процесів реплікації. Цим методом фіксують пізні ембріональні леталі (яйця жовто-коричневого кольору) та ранні ембріональні леталі (яйця білого кольору). Також за дії на *D. melanogaster* хімічних чинників підвищується ймовірність появи незапліднених яєць унаслідок фізіологічного чи генетичного пошкодження сперматозоїдів або зниження статевої активності самців [9].

З метою дослідження впливу ароматизатора на геном соматичних клітин ссавців використовували метод метафазного аналізу аберацій хромосом у клітинах кісткового мозку мишей *Mus musculus* за допомогою рутинного забарвлення розчином барвника Гімза. Метод вивчення хромосом на стадії метафази є найбільш інформативним, оскільки дає змогу дослідити широкий спектр структурних і кількісних змін хромосом. Індукування хромосомних аберацій у клітинах кісткового мозку *Mus musculus* досліджували на молодих білих статевозрілих самцях, зразок вводили перорально одноразово у вигляді водного розчину по 0,4 мл в дозах 0,52 та 5,2 мг/кг за допомогою металевого зонду. Препарати метафазних хромосом готували за методом Н.У. Evans [20].

Для виявлення можливого індукування генних мутацій за дії ароматизатора «Вишня AS00640» проведено дослідження тестом Еймса на плазмідних штаммах TA100 та TA98 *Salmonella typhimurium* [22]. Вони є ауксотрофами за гістидином, а за дії мутагенних чинників можуть ревертувати до прототрофності. Штам *S. typhimurium* TA100 несе мутацію у гістидиновому опероні (місенс мутація his G46) – це дає можливість зафіксувати точкові мутації типу заміни пар основ; штам TA98 (місенс мутація hisD3052) реєструє мутації типу зсуву рамки зчитування. Експеримент проводили з і без додавання мікросомальної активуючої суміші (МАС), яку готували з печінки самців щурів лінії Вістар. Мікросомальні ферменти індукували фенобарбіталом. Використання гомогенату печінки щурів дає можливість отримати більш наближені результати біотрансформації ксенобіотиків, яка може відбуватися в організмі вищих еукаріот [21]. Як контроль замість досліджуваних зразків у шар напіврідкого агару вносили 0,2 мл дистильованої води – негативний контроль. Як позитивний контроль для штаму TA98 використовували бензидин (200 мкг на чашку), для штаму TA100 у варіанті без метаболічної активації застосовували N-метил-N-нітро – N-нітрозогуанідин (200 мкг на чашку) й у варіанті з метаболічною активацією – азид натрію (200 мкг на чашку). Мутагенний ефект вважали встановленим у тому випадку, коли співвідношення кількості колоній-ревертантів у досліді й контролі становило 2,5 і більше, причому мутагенний ефект характеризується як слабкий за перевищення кількості дослідних колоній над контрольними у 2,5–10 разів (1 бал), як середній – у 10–100 разів (2 бали), як сильний – у більш ніж 100 разів (3 бали) [21]. Статистичну обробку результатів проводили з використанням критерію Стьюдента t.

Результати і їхнє обговорення

Проведений аналіз мутагенної активності ароматизатора «Вишня AS00640» у різних концентраціях за допомогою анателофазної тест-системи на клітинах кореневої ме-

ристеми *A. cepa* та проаналізовані зміни в проліферації клітин. Виявлено збільшення мітотичного індексу порівняно з контролем. Це може відбуватися внаслідок збільшення кількості клітин, що вступають у мітоз, або ж за рахунок затримки поділу клітин. Збільшення кількості профаз може відбуватись унаслідок подовження в часі процесів у профазі або пришвидшення процесів синтезу в інтерфазі та вступу клітин в процеси мітозу. Підвищення мітотичного індексу спостерігали як за дослідження добової концентрації ароматизатора, так і за концентрації, збільшеної у 10 разів. Таким чином, за дії харчового ароматизатора «Вишня AS00640» виявлено стимулюючий вплив на проліферативну активність клітин кореневої меристеми *A. cepa*, який не виявляв чіткого дозозалежного характеру. Аналіз результатів анателофазного тесту на індукування хромосомних мутацій зразками цього ароматизатора показав різні типи порушень у правильному розходженні хромосом до полюсів. Як за добової концентрації, так і за концентрації, збільшеної у 10 разів, рівень хромосомних аберацій за дії ароматизатора перевищував значення контролю. За добової концентрації 0,52 г/л показники індукування хромосомних мутацій становили 8,2 %, у контролі – 2,8 %. За концентрації 5,2 г/л показники хромосомних мутацій були ще вищими і становили 12,8 %, що у 4,5 разу перевищували контрольні показники (табл. 1). Серед аномалій найчастіше виявляли подвійні фрагменти, які виникають у результаті хромосомних делецій, та утворення одинарних і подвійних мостів (дицентриків) як наслідок процесів транслокацій. Частота виникнення мутацій за дії молочної кислоти становила 2,5 %, що відповідає рівню контролю. Пропіленгліколь викликав мутації з частотою 6,7 %, що більш ніж у 2 рази перевищує показники контролю (табл. 1). Серед аномалій найчастіше виявляли поодинокі фрагменти хромосом.

Таблиця 1

Рівень хромосомних аберацій у меристемних клітинах *A. cepa*
за дії харчового ароматизатора «Вишня AS00640»

Зразок	Доза, г/л	Всього анателофаз	Кількість аномальних анателофаз					Частота виникнення мутацій, %	t**	
			Абсол. к-сть	I*	II	[[]			Ин.
Контроль		71	2	2	–	–	–	–	2,8±1,9	–
Ароматизатор	0,52	49	4	–	2	–	1	1	8,2±3,9	1,26
Ароматизатор	5,2	47	6	1	2	2	1	–	12,8±4,9	2,09
Пропіленгліколь	3,6	90	6	3	1	2	–	–	6,7±2,6	1,13
Молочна кислота	1,0	119	3	2	1	–	–	–	2,5±1,4	0,13

Примітка: *I – одинарний фрагмент; II – подвійний фрагмент; [– одинарний (хроматидний) міст; [] – подвійний (хромосомний) міст. ** – рівень достовірності $p \geq 0,95$

Частоту домінуючих летальних мутацій вивчали на *D. melanogaster*, вносячи зразки ароматизатора «Вишня AS00640» у середовище та згодуючи личинок, яких у подальшому на стадії імаго (лише самців) використовували в системах схрещування з необробленими самками. Таким підходом можна з'ясувати можливість індукування домінуючих летальних мутацій, у тому числі й тих, які задіяні в процесах сперматогенезу. Показники рівня індукції летальних мутацій у дослідженні всіх концентрацій розчинів ароматизатора перевищували показники контролю. Серед модифікованих яєць частіше виявляли незапліднені яйця та реєстрували появу яєць із ранніми летелями. Частота ДЛМ у дослідженні зразка добової дози становила 5,86 %, що більш ніж у 10 разів перевищувало показники контролю, а за концентрації 5,2 г/л вона була ще вищою і становила 6,19 % (табл. 2). Отже, виходячи з отриманих результатів, можна припустити, що хімічні складники ароматизатора «Вишня AS00640» можуть сприяти появі різноманітних змін у генах і хромосомах,

наприклад, викликати дефіцит хромосомного матеріалу в геномі або блокувати процеси реплікації, пригнічуючи нормальний перебіг процесів сперматогенезу.

Таблиця 2

Рівень індукції домінантних летальних мутацій у *Drosophila melanogaster* за дії харчового ароматизатора «Вишня AS00640»

Зразок	К-сть відкл. яєць	К-сть незапл. яєць	К-сть яєць з ранніми ДЛМ	К-сть яєць з пізніми ДЛМ	Частота ДЛМ, %	Коефіцієнт Стьюдента, t*
5,2 г/л	904	45	43	13	6,19±0,64	2,95
0,52 г/л	917	39	44	9	5,86±0,92	2,44
Контроль	940	12	5	–	0,55±0,08	–

Примітка: * – рівень достовірності $p \geq 0,95$

Для з'ясування впливу ароматизатора «Вишня AS00640» на генетичний матеріал вищих сукаріот проведено аналіз здатності розчинів ароматизатора у різних концентраціях індукувати появу хромосомних аберацій у клітинах кісткового мозку *M. musculus*. Виявлено різні типи порушень у правильному розходженні хромосом, а також зміну числа хромосом і наборів хромосом. Відсоток аномальних метафаз за дії ароматизатора добової дози становив 3,6 %, що більш ніж у 2 рази перевищував показники контролю. За дії зразка концентрацією 5,2 г/л середня частота метафаз із абераціями становила 6,2 % (табл. 3). На препаратах було виявлено анеуплоїдні клітини із загальним числом хромосом 38 або 39, а також модифіковані набори хромосом, у яких число хромосом становило 20 або 60, за норми диплоїдного набору 40 хромосом. Причиною цього можуть бути порушення проходження нормального мітозу, нерівномірний розподіл генетичного матеріалу, каріогенез без цитокінезу, порушення формування веретена поділу та ін. Результати цього тесту корелюють із результатами, отриманими нами в анателофазному тесті на *A. cerea*.

Таблиця 3

Рівні хромосомних аберацій у клітинах кісткового мозку *Mus musculus* після згодовування мишам ароматизатора «Вишня AS00640»

Зразок	Загальна к-сть метафаз	К-сть аномальних метафаз	Середня частота метафаз із абераціями хромосом (M±m), %	Коефіцієнт Стьюдента, t*
5,2 г/л	276	17	6,2±2,9	0,6
0,52 г/л	249	9	3,6±2,2	0,5
Контроль	225	3	1,3±0,13	–

Примітка: * – рівень достовірності – $P \leq 0,001$

Індукування генних мутацій за дії ароматизатора «Вишня AS00640» досліджували в тесті Еймса на *S. typhimurium* на зразках допустимої добової дози, а також іще двох доз, збільшених і зменшених у десять разів. З використанням штаму TA-100 нами не виявлено індукування генних мутацій за механізмом заміни пар основ за жодної концентрації та модифікації експериментів, рівень реверсій коливався у межах 25–40 колоній за спонтанного мутаційного рівня 44 (табл. 4). Проведені експерименти на штамі TA98 показали, що зразки різної концентрації ароматизатора «Вишня AS00640» здатні індукувати появу мутацій типу зсуву рамки зчитування, але тільки в експериментах без додавання мікросомальної фракції. Кількість колоній ревертантів коливалась у межах 80–90 за негативного контролю 27. З одночасним додаванням у верхній напіврідкий агар зразків ароматизатора з мікросомальною фракцією гомогенату печінки шурів мутагенної активності не виявлено, що свідчить про можливість утворення у процесі біотрансформації менш активних метаболітів порівняно з вихідними інгредієнтами ароматизатора. За внесення мікросомальної фракції кількість колоній коливалась у межах 40–60 при негативному контролі 40 (табл. 5). Отже, виходячи з одержаних результатів, можна припустити, що внаслідок біотрансформа-

ції хімічних складових ароматизатора «Вишня AS00640» в організмі еукаріот можуть утворюватися сполуки, які не здатні індукувати генні мутації й тим самим сприяти зниженню ризику генотоксичних ефектів ароматизатора.

Таблиця 4

Індукування генних мутацій за дії ароматизатора «Вишня AS00640»
на штамі TA100 *Salmonella thyphimurium*

Зразки	Доза, г/кг	Без МАС			З додаванням МАС		
		Кількість колоній His ⁺ ревертантів	ХдХк	Мутагенність, бали	Кількість колоній His ⁺ ревертантів	ХдХк	Мутагенність, бали
Ароматизатор	5,2	25	0,57	–	77	1,51	–
	0,52	37	0,84	–	39	0,76	–
	0,052	38	0,86	–	83	1,63	–
Негативний контроль		44			51		
Позитивний контроль	Азид натрію Нітрозогуанідин	268	6,09	1	368	8,36	1

Таблиця 5

Індукування генних мутацій за дії ароматизатора «Вишня AS00640»
на штамі TA98 *Salmonella thyphimurium*

Зразки	Доза, г/кг	Без МАС			З додаванням МАС		
		Кількість колоній His ⁺ ревертантів	ХдХк	Мутагенність, бали	Кількість колоній His ⁺ ревертантів	ХдХк	Мутагенність, бали
Ароматизатор «Вишня»	5,2	74	2,74	1	36	0,91	–
	0,52	92	3,41	1	46	1,90	–
	0,052	86	3,19	1	60	1,49	–
Негативний контроль		27			40		
Позитивний контроль	Бензидин	240	8,89	1	298	7,45	1

Таким чином, виходячи з результатів досліджень, складники ароматизатора «Вишня AS00640» мають генетичну активність, здатні індукувати різні типи порушень у генетичному матеріалі як прокаріот, так і еукаріот навіть за рекомендованої виробником дози. Проте показано, що проходження через систему мікосомальних ферментів у процесах біотрансформації у вищих організмів за дії цього ароматизатора можуть виникати менш реактивні сполуки, які не здатні стимулювати появу генетичного вантажу у вигляді мутацій, тим самим сприяючи зниженню ризику генотоксичних ефектів нативного продукту.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Бандман А. Л., Волкова И. В., Грехова Т. Д. и др. Вредные химические вещества. Неорганические соединения элементов V-VIII групп. Л.: Химия, 1989. 595 с.
2. Боднар І. В., Боднар Л. С. Оцінка мутагенної активності новосинтезованих харчових ароматизаторів з використанням про- та еукаріотичних тест-систем // Довкілля і здоров'я. 2012. № 1. С. 70–75.
3. 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.

4. Боднар І. В., Зубко О. С., Щербакова О. В. та ін. Виявлення змін на хромосомному рівні в еукаріотичних організмів за дії синтетичних ароматизаторів продуктів харчування та корегування їх за допомогою вітамінних хіміопреверентерів // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. праць. К., 2016. Т. 18. С. 67–71.
5. Булдаков А. С. Пищевые добавки: справочник. СПб., 1996. 240 с.
6. ВОЗ. Принципы оценки безопасности пищевых добавок и компонентов в продуктах питания // Генетические критерии состояния окружающей среды / ВОЗ. М.: Мир, 1991. 120 с.
7. Габович Р. Д., Припутина Л. С. Гигиенические основы охраны продуктов питания от вредных химических веществ. К.: Здоров'я, 1987. 248 с.
8. Гончаренко Т. П., Гончаренко О. Г. Харчові добавки як об'єкт моніторингових досліджень // Екологія довкілля та безпека життєдіяльності. 2008. № 4. С. 81–84.
9. Дубініна А. А., Малюк Л. П., Селютіна Г. А. Токсичні речовини у харчових продуктах і методи їх визначення. К.: ВД «Професіонал», 2007. 384 с.
10. Дурнев А. Д. Мутагены и антимутагены в продуктах питания // Генетика. 1997. № 33. С. 165–176.
11. Калаев В. Н., Карнова С. С. Цитогенетический мониторинг: методы оценки загрязнения окружающей среды и состояния генетического аппарата организма. ВГУ, 2004. 80 с.
12. Лаврущенко Л. Ф. Основні аспекти механізму токсичної дії ксенобіотиків // Праці VII Укр. біохім. з'їзду. К., 1997. Ч. III. С. 150–151.
13. Мацевич Л. Л., Лукаш Л. Л. Генетична активність важких металів в еукаріотичних клітин // Біополімери і клітина. 2001. Т. 17. № 1. С. 5–19.
14. Росивал Л. Посторонние вещества и пищевые добавки в продуктах. М.: Наука, 1982. 250 с.
15. Смирнов Е. В. Пищевые ароматизаторы: справочник: СПб., Профессия, 2008. 736 с.
16. Смоляр В. І. Токсичні ефекти харчових добавок // Проблеми харчування. 2005. № 1. С. 5–15.
17. Смоляр В. І. Харчова експертиза. К.: Здоров'я, 2005. 505 с.
18. Спейерс Г. О генотоксических канцерогенах // Вопросы питания. 2002. Т. 71. № 1. С. 11–15.
19. Стрижельчик Н. Г., Бариляк И. Р. Мутагенные и антимутагенные свойства пищевых добавок. Х.: ХНУ им. Каразина, 2009. 152 с.
20. 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. N 4. P. 1–29.
21. Maron D. M., Ames B. N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test // Mutat Res. 1983. Vol. 113 (3–4). P. 173–215.
22. Martelmans K., Zeiger E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity test // Mutat Res. 2000. Vol. 455 (1–2). P. 29–60.
23. Verholyak N. S., Peretyatko T. B. Utilization of aromatic compounds by bacteria // Flexibility of aromatic xenobiotics. Studia Biologica. 2018. Vol. 12 (3–4). P. 117–140.

Стаття надійшла до редакції 04.09.19

доопрацьована 03.10.19

прийнята до друку 03.09.19

**DETECTION OF POSSIBLE GENOTOXIC HAZARD
BY USING SYNTHETIC FLAVOURING «CHERRY»****L. Bodnar, I. Typusiak, S. Horbulinska***Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: bodnarlidia@ukr.net*

Components of flavourings are usually presented by xenobiotics – improper to the living organisms chemical compounds, that not get into the people's organism with natural products. Every xenobiotic, getting into the organism, can be included in metabolism, influence the genetic material of the cell and therefore lead to more or less important consequences. This work is dedicated to detection of possible mutagenic activity of synthetic flavouring «CHERRY AS00640» with using pro- and eukaryotic test-systems. Induction of chromosome aberration had been studied in two test-systems *Allium cepa* and *Mus musculus* using recommended by producer day dose and also doses that was tenfold increased or reduced. In the test on the meristem cells of onion roots at the different concentrations the chromosome aberrations level under the flavouring action had been exceeded control value. Among the anomalies the most often were double fragment that are the result of deletions and the single and double dicentrics formation as a result of translocation processes. On the mouse bone marrow cells preparations were detected aneuploidy cells and also modified sets of chromosomes. Results of this test correlate with the results received by us in ana-telophase test on *A. cepa*, in all cases were observed dose depended effect. Tests for induction of dominant-lethal mutations in *Drosophila melanogaster* have showed that chemical components of «CHERRY AS00640» flavouring may lead to the emergence of varied changes in genes and chromosomes, which are responsible for normal passing the spermatogenesis processes.

Whereas the flavouring components usually are presented by xenobiotics that in higher eukaryotes organisms may be total or partial biotransformed that are presented by whole complex both enzymatic and spontaneous transformations. It had been conducted researches by us using the Ames test both with and without metabolic activation on *Salmonella typhimurium*. On the Ames test without the metabolic activation was detected induction of gene mutation in comparison with the control under the all studied dose only by the frameshift mechanism. According to the research results with the adding microsomal fraction of homogenate of the rat's liver mutagenic activity with the using of TA-98 strain was not detected which evidence of possibility of formation less active metabolites in the transformation processes in comparison with source ingredients of flavouring which thus leads to decrease the risk of genotoxic effects of native product.

Keywords: food flavouring, gene mutations, chromosome aberrations, genotoxicity, biotransformation of xenobiotics

ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ЛЕЙКЕМІЧНИХ КЛІТИН НА РІЗНИХ ЕТАПАХ ПЕРЕБІГУ ГОСТРИХ ЛЕЙКЕМІЙ

О. Зотова^{1*}, А. Лук'янова², М. Вальчук¹, Ю. Кароль³, Н. Горон³,
О. Шалай¹, В. Логінський¹

¹ДУ «Інститут патології крові
та трансфузійної медицини НАМН України»
вул. Генерала Чупринки, 45, Львів 79044, Україна

²Медико-біологічний центр «Геном»
вул. Коперника, 23, Київ 04216, Україна

³Комунальна 5 міська клінічна лікарня
вул. Генерала Чупринки, 45, Львів 79044, Україна
e-mail: lnkzotova@gmail.com

Цитогенетичні дослідження клітин кісткового мозку та/або периферичної крові проведено у 11 хворих (хворі віком від 18 до 47 років, серед них 6 чоловіків і 5 жінок) на різних етапах перебігу гострих лейкемій (ГЛ): при встановленні діагнозу, під час ремісії хвороби й у разі рецидиву. Використовували метод класичної цитогенетики (GTG) та флуоресцентну *in situ* гібридизацію (FISH). Цитогенетичні дослідження було виконано згідно зі стандартними методиками, а каріотиби – описано відповідно до *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (ISCN, 2016). Виявлено структурні (del(1)(q24), i(7)(q10), t(8;21)(q22;q22), del(9)(q21-q22), t(9;22)(q34;q11), t(15;17)(q22;q11-21), der(17)t(17;?)(p11;?), маркерні хромосоми) та кількісні (трисомії, моносомії) хромосомні аномалії. Деякі генетичні перебудови (фузійні гени *BCR/ABL* та *PML/RARA*) виявлено за допомогою молекулярно-генетичних методів (FISH). Спектр хромосомних аберацій у хворих на ГЛ має важливе діагностичне та прогностичне значення. Діагностика ГЛ можлива завдяки наявності характерних генетичних аномалій-маркерів, що дає змогу підтвердити деякі типи ГЛ, а саме: t(8;21)(q22;q22) виявляють у хворих на гостру мієлоїдну лейкемію М2 (ГМЛ М2); t(15;17)(q22;q11-21) – у пацієнтів із гострою промієлоцитарною лейкемією (ГПЛ); t(9;22)(q34;q11) – у хворих із гострою лімфобластною лейкемією (ГЛЛ). З урахуванням виявлених цитогенетичних аномалій хворих на ГЛ класифіковано на три групи ризику: група хворих зі сприятливими цитогенетичними маркерами, група проміжного ризику без прогностично значущих маркерів і група хворих із несприятливими факторами прогнозу. Розподіл хворих на групи ризику відповідно до виявлених прогностичних маркерів дає змогу підібрати оптимальну тактику їхнього лікування, а саме: інтенсивність терапії, необхідність проведення трансплантації кісткового мозку вже у ремісії I, необхідність призначення інгібіторів тирозинкінази при ГЛ з t(9;22)(q34;q11) або диференціального агента – повної транс-ретиноевої кислоти (АТРА) при ГМЛ з t(15;17)(q22;q11-21). Цитогенетичні методи мають бути включені у стандарти обстеження хворих на ГЛ для діагностики, прогнозування перебігу та підбору оптимальної тактики лікування. Крім обов'язкового аналізу диференціально-зафарбованих хромосом, у хворих на ГЛ необхідно застосовувати молекулярно-генетичні дослідження, а саме: метод FISH, а також полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР).

Ключові слова: гостра лейкемія, каріотип, цитогенетичні аномалії, діагноз, прогноз

У гематології спостерігається тенденція до дедалі глибшого вивчення біології лейкемічних клітин, що стає підставою для виділення окремих варіантів лейкемій, їхньої про-

гностичної оцінки та вибору адекватної терапії. Однак в Україні досі використовуються прогностичні системи, які не враховують сучасних досягнень у цитогенетиці й молекулярній генетиці, в той час як впровадження лікування злоякісних неоплазій гемопоетичної та лімфоїдної систем препаратами цільової дії, опрацювання показань для трансплантації кісткового мозку, діагностування мінімальної залишкової хвороби неможливі без адекватної оцінки ефективності проведеного лікування на підставі визначення цитогенетичних і молекулярно-генетичних ознак лейкоемічних клітин, а також з'ясування прогностичних чинників перебігу хвороби. Визначення характерних генетичних аномалій злоякісних клітин набуває дедалі більшого клінічного значення і у хворих на гострі лейкоемії (ГЛ). Вони передбачені новою класифікацією ГЛ – ВООЗ, 2016 [5, 16].

Початкове цитогенетичне обстеження згідно з рекомендаціями провідних міжнародних організацій має обов'язково проводитись у первинних хворих для підтвердження, уточнення діагнозу або диференційної діагностики ГЛ. Аналіз метафазних хромосом проводять з метою опису каріотипу хворого. Коли ж мітозів немає або їхня якість незадовільна, використовують молекулярно-цитогенетичний метод флуоресцентної *in situ* гібридації (FISH), який дає можливість виявити діагностичні (маркерні) перебудови, наприклад, t(15;17)(q22;q11-21) під час гострої промієлоцитарної лейкоемії (ГПЛ); t(8;21)(q22;q22) під час гострої мієлоїдної лейкоемії M2 (ГМЛ M2); t(9;22)(q34;q11) під час гострої лімфобластної лейкоемії (ГЛЛ) та інші. У цьому разі, однак, не буде виявлено інших перебудов каріотипу [3, 7, 15].

Планові контрольні цитогенетичні обстеження проводять після курсів поліхіміотерапії (ПХТ) або під час лікування препаратами цільової дії, наприклад, диференціувальним агентом – повною транс-ретиноевою кислотою (АТРА) при ГПЛ чи інгібіторами тирозинкінази при Ph-позитивних ГЛ. Зазвичай контрольні обстеження виконують як мінімум через 2 тижні після курсу ПХТ (після виходу з аплазії) і раз на пів року/рік під час лікування препаратами цільової дії [3, 7, 15].

Цитогенетичне дослідження показано також за різкої зміни клінічної картини хвороби (поява ознак прогресування або рецидиву). Під час рецидиву ГЛ проводять аналіз диференційно-зафарбованих хромосом. Коли ж мітозів немає або їхня якість незадовільна, використовують FISH-дослідження. У таких випадках часто виявляють клональну еволюцію у вигляді появи додаткових аномалій або нових субклонів клітин [3, 7, 15].

Оцінка мінімальної залишкової хвороби при ГЛ передбачає проведення комплексного цитогенетичного та молекулярно-генетичного дослідження. Застосування цитогенетичних методів з метою моніторингу мінімальної залишкової хвороби обмежене їхньою невисокою чутливістю. Метод диференційно-зафарбованих хромосом характеризується невеликою кількістю метафазних пластинок, які піддаються аналізу (20–50 клітин), та високою імовірністю того, що серед них не буде лейкоемічних. За повної цитогенетичної ремісії (наявності нормального каріотипу в усіх проаналізованих метафазах) необхідно підтвердити відсутність аберантного клону клітин за допомогою молекулярно-генетичних методів (FISH) і полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) із відповідними зондами або праймерами. Тому дуже важливою є початкова оцінка хромосомних аномалій, оскільки методи молекулярної генетики дають дуже точну, але вибіркочну детекцію окремих змін. З використанням FISH можна проаналізувати 200–500 клітин, але його чутливість залежить від кількості хибно-позитивних сигналів. Найчастіше для моніторингу мінімальної залишкової хвороби використовують метод ПЛР у зв'язку з його високою чутливістю (одна клітина на 10^3 – 10^6 проаналізованих) [3, 7, 15]. Особлива увага в літературі, яка стосується мінімальної залишкової хвороби при ГЛ, приділяється вивченню та вдосконаленню сучас-

них методів діагностики мінімальної залишкової хвороби – скануванню нового покоління та високочутливій проточній цитометрії [9, 17].

Спектр цитогенетичних і молекулярно-генетичних перебудов у хворих на різних етапах перебігу ГЛ має важливе діагностичне та прогностичне значення для вибору оптимальної тактики лікування пацієнтів. Цитогенетичні методи дослідження необхідні для встановлення, підтвердження або спростування діагнозу, а також для проведення диференційної діагностики підтипу хвороби та прогнозування перебігу ГЛ. Це можливо завдяки наявності характерних генетичних аномалій-маркерів, деякі з них можуть бути одночасно і діагностичними, і прогностичними маркерами. Їх можна виявити як методом каріотипування, так і FISH-аналізом [3, 6, 8].

Після проведеного лікування ГЛ за допомогою цитогенетичного дослідження можна точніше оцінити вплив препаратів на лейкомічний клон. Поява клітин із нормальним каріотипом свідчить про його елімінацію, повна нормалізація каріотипу – про наявність цитогенетичної ремісії. Тому особливого значення цитогенетичні методи набувають за використання сучасних препаратів цільової дії. Виявлення нових змін у наявному клоні клітин або нових клонів є маркером прогресії ГЛ і сигналізує про необхідність модифікації режиму лікування. Повторна поява клітин із аномальним каріотипом після досягнення цитогенетичної ремісії є однією з ознак рецидиву ГЛ. Тому дуже важливе проведення цитогенетичного дослідження під час встановлення діагнозу перед початком лікування, оскільки пізніше не буде відомо, чи аномалії виявлені первинно, чи вони виникли під час еволюції хвороби або індуковані лікуванням. За допомогою цитогенетичних методів також можна оцінити ефективність трансплантації КМ у хворих на ГЛ за співвідношенням клітин донора і реципієнта (якщо вони відрізняються за статтю) [3, 6, 8].

Метою роботи було з'ясувати спектр цитогенетичних і молекулярно-генетичних аномалій лейкомічних клітин на різних етапах перебігу ГЛ та визначити їхнє діагностичні прогностичне значення.

Матеріали та методи

Цитогенетичні дослідження лейкомічних клітин на різних етапах перебігу ГЛ проведено у 11 хворих віком від 18 до 47 років (6 чоловіків і 5 жінок). Серед обстежених хворих у 2 осіб діагностовано ГМЛ, у 7 – ГЛЛ та у 2 – білінійну ГЛ. Діагноз у хворих встановлено на основі клініко-гематологічних, цитологічних та імунофенотипових досліджень. Хворих на ГМЛ розділено на варіанти за Франко-американсько-британською (FAB) класифікацією: М2 (1 хворий), М3 (1 хворий). У свою чергу, при ГЛЛ виділено В-клітинну (5 хворих) і Т-клітинну (2 хворих) лейкомію (табл. 1).

Зразки лейкомічних клітин від хворих отримували шляхом аспіраційної біопсії кісткового мозку (КМ). Якщо ж одержати клітини КМ не вдавалося, то аналізували лейкомічні клітини периферичної крові (ПК), отримані під час венепункції. Використовували загальноприйнятий метод 24- та 48-годинного культивування клітин КМ та/або ПК *in vitro*. Обробку клітин проводили за загальноприйнятою методикою, яка включала дію колхцину, гіпотонізацію, фіксацію і приготування препаратів. Аналіз метафазних хромосом проводили із застосуванням G-методики диференційного забарвлення фарбою Райта [1, 13]. Забарвлені препарати аналізували на збільшенні $\times 1000$ під світловим мікроскопом Olympus BX41 (Olympus, Японія) з використанням системи для хромосомного аналізу CytoVision (Applied Imaging, Великобританія). Проводили аналіз не менше 20 метафазних пластинок. Під час аналізу й опису каріотипу дотримувалися критеріїв *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* – ISCN, 2016 [11]. За відсутності придатних до аналізу метафазних пластинок додатково застосовували молекулярно-цитогенетичний метод FISH із від-

повідними зондами. Підготовку препаратів і процедуру гібридизації здійснювали за Pinkel et al. [14] з урахуванням рекомендацій виробника зонда. Аналізували не менше 200 клітин.

Результати і їхнє обговорення

Цитогенетичні дослідження (аналіз каріотипу та FISH) зляксічних клітин виконано у 11 пацієнтів на різних етапах перебігу ГЛ: під час встановлення діагнозу, під час ремісії хвороби та у разі рецидиву. Результати цитогенетичного аналізу представлені в табл. 1.

Таблиця 1

Результати цитогенетичних досліджень лейкомічних клітин у хворих на ГЛ

№ п/п	Стать	Варіант ГЛ	Етап перебігу ГЛ	Вік, років	Каріотип	Дослідження FISH
1	Ч.	ГМЛ М2	Встановлення діагнозу	45	46,XY[20]	Не проводили
2	Ч.	ГМЛ М3 (ГПЛ)	Рецидив I	47	46,XY[20]	Не проводили
			Встановлення діагнозу	18	46,XY[20]	<i>PML/RARA</i> (+) (97%)
3	Ж.	В-ГЛЛ	Рецидив I	19	46,XY[20]	<i>PML/RARA</i> (+) (92,5%)
			Встановлення діагнозу	33	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[20]	<i>BCR/ABL</i> (+) (33,3%)
4	Ж.	В-ГЛЛ	Рецидив I	34	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[7]/46,XX[14]	Не проводили
			Встановлення діагнозу	45	46,XX,i(7)(q10)[14]/46,XX[6]	Не проводили
5	Ж.	В-ГЛЛ	Рецидив I	47	54~55,XX,+2,+6,+8,+10,+11,+12,+17,+18,+21[8]/46,XX[14]	Не проводили
			Ремісія	30	46,XX[20]	Не проводили
6	Ч.	В-ГЛЛ	Рецидив II	30	46,XX[20]	Не проводили
			Рецидив I	31	46,XX[20]	Не проводили
7	Ж.	В-ГЛЛ	Рецидив I	24	46,XY[20]	Не проводили
			Ремісія	24	46,XY[20]	Не проводили
8	Ж.	Т-ГЛЛ	Рецидив I	27	46,XY[20]	Не проводили
			Рецидив I	20	60~61,XX,+X,+1,+3,+4,+6,+8,+9,+10,+11,+14,+15,+17,+18,+21,+mar[3]/46,XX[18]	<i>BCR/ABL</i> (-), с-МYC (3 копії) (82%)
9	Ч.	Т-ГЛЛ	Ремісія	20	46,XX[20]	Не проводили
			Рецидив II	22	60~61,XX,+X,+1,+3,+4,+6,+8,+9,+10,+11,+14,+15,+17,+18,+21,+mar[3]/46,XX[17]	Не проводили
10	Ч.	Білінійна ГЛ	Рецидив I	36	48,XX,+8,t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22)[9]/46,XX[11]	Не проводили
			Ремісія II	37	46,XX[20]	Не проводили
11	Ч.	Білінійна ГЛ	Рецидив II	37	46~52,XX,del(1)(q24),+1,+3,+6,+8,t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22)x1~2,+mar[cp15]/46,XX[5]	Не проводили
			Рецидив III	38	Відсутні метафазні пластинки	<i>BCR/ABL</i> (-) <i>BCR/ABL</i> (+) (15%)
12	Ч.	Білінійна ГЛ	Рецидив IV	38	46~48,XX,del(1)(q24),+1,+8,t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22),+mar[cp7]/46,XX[23]	Не проводили
			Ремісія	22	46,XY[20]	Не проводили
13	Ч.	Білінійна ГЛ	Рецидив I	25	46~47,XY,der(17)t(17;?)(p11;?),-18,+1~2mar[cp14]/46,XY[6]	Не проводили
			Встановлення діагнозу	21	46,XY,t(9;22)(q34;q11),+21[20]	Не проводили
14	Ч.	Білінійна ГЛ	Рецидив I	21	79~92,XXYY[cp5]/46,XY[18]	Не проводили
			Встановлення діагнозу	21	46,XY,t(8;21)(q22;q22),del(9)(q21-22)[5]/46,XY[15]	Не проводили
15	Ч.	Білінійна ГЛ	Рецидив I	23	46,XY,t(8;21)(q22;q22),del(9)(q21-22)[4]/46,XY,-C,+mar[2]/46,XY[12]	Не проводили

У 2 пацієнтів із ГМЛ (варіанти М2 (№ 1) та М3 (№ 2) за FAB-класифікацією) первинні цитогенетичні дослідження проведено під час встановлення діагнозу та виявлено нормальний каріотип без цитогенетично видимих змін. Однак у хворого з ГПЛ (варіант М3) дослідження FISH показало наявність химерного гена *PML/RARA* у 97 % проаналізованих клітин, що свідчило про наявність транслокації $t(15;17)(q22;q11-21)$, яка є діагностичною (маркерною) перебудовою при ГПЛ і спостерігається у 91–95 % хворих [3]. Наступні цитогенетичні дослідження у цих хворих проведено під час рецидиву хвороби та відзначено наявність аналогічного результату: при аналізі каріотипу виявлено нормальний набір хромосом, однак у хворого з ГПЛ дослідження FISH показало наявність химерного гена *PML/RARA* у 92,5 % проаналізованих клітин.

У групі хворих на ГЛЛ (5 пацієнтів з В-клітинною та 2 пацієнти з Т-клітинною) цитогенетичні дослідження проведено на різних етапах перебігу ГЛЛ: під час встановлення діагнозу, під час рецидиву та в період ремісії. Під час встановлення діагнозу у 2 первинних пацієнтів з В-клітинною ГЛЛ виявлено по одній перебудові в каріотипі. У однієї хворої (№ 3) це була філадельфійська хромосома (Ph), виявлена у всіх проаналізованих клітинах і утворена внаслідок транслокації $t(9;22)(q34;q11)$, наявність фузійного гена *BCR/ABL* підтверджено дослідженням FISH. Ph-хромосома діагностична (маркерна) перебудова при хронічній мієлоїдній лейкемії (ХМЛ), проте спостерігається і у 15–30 % хворих на ГЛЛ [2, 3]. Наступне цитогенетичне дослідження у цієї пацієнтки проведено під час рецидиву хвороби та відзначено наявність Ph-хромосоми у 33 % проаналізованих клітин, тобто клональної еволюції у цієї хворої не відзначено. В іншій хворій (№ 4) виявлено ізохромосому $7-i(7)(q10)$ у 70 % проаналізованих клітин. Під час рецидиву лейкемії у згаданій пацієнтки виявлено клональну еволюцію у вигляді появи нового субкласу клітин із гіпердиплоїдним набором хромосом (54–55 хромосом), трисомією 2, 6, 8, 10, 11, 12, 17, 18 та 21 у 36 % проаналізованих клітин.

Під час першого рецидиву хвороби у 3 пацієнтів з В-клітинною ГЛЛ, які до рецидиву перебували в довготривалій повній ремісії, виявлено: у 2 випадках (№ 5 та № 6) – нормальний каріотип без цитогенетично видимих змін, в 1 випадку (№ 7) – масивну гіпердиплоїдію у 14 % проаналізованих клітин (60–61 хромосом, трисомії X, 1, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 17, 18, 21 та додаткова маркерна хромосома (+mar) невстановленого походження). Наступні цитогенетичні дослідження у цих хворих проведено під час ремісії хвороби й у всіх виявлено нормальний каріотип без цитогенетичних перебудов у 100 % проаналізованих клітин. Під час другого рецидиву у вищезгаданих пацієнтів відзначено наявність аналогічного результату, як при першому обстеженні: у 2 випадках виявлено нормальний каріотип, у 1 випадку – масивну гіпердиплоїдію в 15 % проаналізованих клітин.

У однієї пацієнтки з Т-клітинною ГЛЛ (№ 8) було проведено 6 цитогенетичних обстежень. Первинне цитогенетичне дослідження виконано під час першого рецидиву після короткотривалої ремісії, яке показало наявність у каріотипі хворої двох копій Ph-хромосоми та трисомії 8 (+8) у 45 % проаналізованих клітин. Під час другого рецидиву у цієї хворої виявлено клональну еволюцію у вигляді появи, крім двох копій Ph та +8, додаткових структурних і кількісних хромосомних аномалій у 75 % проаналізованих клітин, а саме: трисомій 1, 3, 6, додаткової маркерної хромосоми (+mar) невстановленого походження, термінальної делеції довгого плеча 1 хромосоми ($del(1)(q24)$) та ще однієї додаткової копії Ph. Під час третього рецидиву у зв'язку з відсутністю метафазних пластинок у дослідному матеріалі проведено лише дослідження FISH, яке показало наявність 15 % Ph-позитивних клітин. Під час четвертого рецидиву у хворої під час аналізу каріотипу виявлено дві копії Ph-хромосоми, трисомії 1 та 8, делецію $del(1)(q24)$ та маркерну хромосому невстановле-

ного походження у 23 % проаналізованих клітин. Ще два цитогенетичні обстеження у цієї хворої було проведено у період ремісії та виявлено нормальний набір хромосом, а відсутність химерного гена *BCR/ABL* підтверджено дослідженням FISH.

Ще у одного хворого на Т-клітинну ГЛЛ (№ 9) первинне цитогенетичне дослідження проведено під час ремісії хвороби, яке показало наявність нормального каріотипу без хромосомних змін. Наступне цитогенетичне дослідження у цього хворого проведено під час першого рецидиву та виявлено такі перебудови каріотипу: *der(17)t(17;?)(p11;?)*, моносомію 18 хромосоми (-18) та 1–2 додаткові маркерні хромосоми невстановленого походження у 70 % проаналізованих клітин.

У пацієнтів із білінійною ГЛ (2 хворих на В-клітинну ГЛЛ з мієлоїдними маркерами) первинні цитогенетичні дослідження проведено під час встановлення діагнозу та виявлено аномальний каріотип. У одного хворого (№ 10) в усіх проаналізованих клітинах встановлено наявність Ph-хромосоми та трисомії 21. У іншого хворого (№ 11) у 25 % проаналізованих клітин виявлено транслокацію *t(8;21)(q22;q22)*, яка найчастіше (у 40 % хворих) спостерігається при ГМЛ з дозріванням (варіант М2 за FAB-класифікацією) [3]. Також у цього пацієнта, крім *t(8;21)(q22;q22)*, виявлено додаткову перебудову – термінальну делецію довгого плеча 9 хромосоми (*del(9)(q21-q22)*). Наступні цитогенетичні дослідження у цих хворих проведено під час рецидиву хвороби та виявлено клональну еволюцію у вигляді появи додаткових аномалій і нових субклонів клітин.

Таким чином, загалом було проведено 29 цитогенетичних (аналіз каріотипу) та 6 молекулярно-цитогенетичних досліджень (FISH) бластних клітин 11 хворих на різних етапах перебігу ГЛ: під час встановлення діагнозу, під час ремісії хвороби та у разі рецидиву. Зазвичай під час цитогенетичного аналізу клітин КМ хворих на ГЛ, крім аномального клону клітин, переважно також виявляють і клон клітин із нормальним каріотипом, причому відсоток аномальних клітин зазвичай корелює з відсотком бластів у КМ, що спостерігалось і в нашому дослідженні. Під час дослідження клітин ПК такої кореляції не виявлено.

Загалом, було виявлено такі діагностичні (маркерні) аномалії – транслокації *t(15;17)(q22;q11-21)*, *t(8;21)(q22;q22)*, *t(9;22)(q34;q11)* та/або відповідні фузійні гени *PML/RARa*, *AML1/ETO*, *BCR/ABL* і підтверджено підтип ГЛ відповідно до класифікації BOO3, 2016 [5, 16].

Химерний ген *PML/RARa* виявлено в одного хворого (№ 2) (рис. 1), однак під час аналізу каріотипу цитогенетично видимих змін у цього пацієнта не спостерігали. Транслокація *t(15;17)(q22;q11-21)* та відповідний химерний ген *PML/RARa* строго специфічні для ГПЛ (М3 варіант ГМЛ за FAB класифікацією), їх виявляють у 91–95 % усіх хворих. Утворення химерного гена *PML/RARa* та відповідного химерного білка *PML/RARa* відіграє ключову роль у патогенезі ГПЛ. Унаслідок цього зупиняється нормальне дозрівання промієлоцитів. У 29–37 % випадків, крім *t(15;17)(q22;q11-21)*, спостерігають додаткові хромосомні аномалії, а саме – трисомію 8, *del(9q)*, ізодериват хромосоми 17. Описано, що наявність таких додаткових аномалій, як трисомія 8 та ізодериват 17 хромосоми, на прогноз перебігу хвороби не впливає, тоді як *del(9q)* – погіршує прогноз [3, 4, 18].

Транслокацію *t(8;21)(q22;q22)* виявлено в одного хворого (№ 11) (рис. 2). Цю перебудову знаходять у 7 % випадків ГМЛ і у 40 % пацієнтів з М2 варіантом ГМЛ. Унаслідок вказаної транслокації утворюється химерний ген *AML1/ETO* й відповідний химерний білок *AML1/ETO*, який блокує процес транскрипції та зупиняє нормальне дозрівання клітин. У 40 % випадків, крім *t(8;21)(q22;q22)*, спостерігають додаткові аномалії, а саме – втрату X- або Y-хромосоми, делецію довгого плеча 9 хромосоми *del(9q)*, додаткові копії хромосом 8

і 21 та ін. [3, 10]. Так, у нашому випадку, окрім $t(8;21)(q22;q22)$, ми спостерігали додаткову аномалію – делецію довгого плеча 9 хромосоми $del(9)(q21-22)$ (рис. 2). За повідомленнями літератури, відсутність Y-хромосоми не впливає на прогноз перебігу захворювання. У групі хворих з делецією $del(9q)$ відзначено збільшену у 2 рази частоту рецидивів [3, 10].

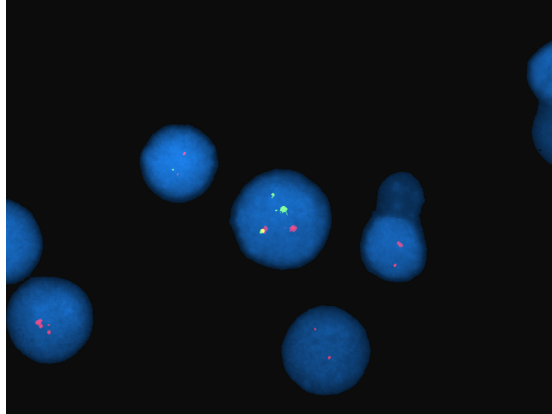
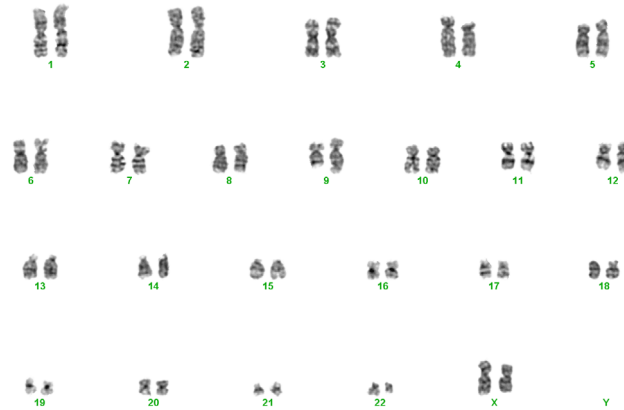


Рис. 1. Результат FISH-аналізу на інтерфазних ядрах для виявлення гена *PML/RARA* із застосуванням флуоресцентної мітки *PML/RARa DC SF* (Cytocell) у хворого № 2



Рис. 2. Транслокація $t(8;21)(q22;q22)$, делеція $del(9)(q21-22)$ у хворого № 11

Філадельфійську хромосому (Ph), утворену внаслідок транслокації $t(9;22)(q34;q11)$, виявлено у 3 пацієнтів (№№ 3, 8, 10) (рис. 3). Ця аномалія спостерігається у 15–30 % хворих на ГЛЛ та у 2–3 % хворих на ГМЛ, вона характерна і для біфенотипових ГЛ. У результаті цієї аберації утворюється химерний ген *BCR/ABL*, білковий продукт якого характеризується сильною тирозинкіназною активністю й відіграє ключову роль у патогенезі, як і ХМЛ, так і Ph-позитивних ГЛ [2]. У 50 % хворих, крім $t(9;22)(q34;q11)$, виявляють додаткові перебудови каріотипу – $del(22q)$, -7 , $del(7q)$, $+8$ та інші [2, 3, 19]. Так, у 2 із 3 обстежених пацієнтів з Ph-позитивними ГЛ ми спостерігали додаткові аномалії різного характеру – трисомії 8 та 21, додаткові копії Ph. У хворій № 8 з Ph-позитивною ГЛЛ під час повторного цитогенетичного дослідження в ході рецидиву хвороби було виявлено Ph-позитивний клон клітин із множинними структурними та кількісними перебудовами каріотипу, що свідчить про клональну еволюцію та прогресію хвороби.

Рис. 2. Транслокація $t(9;22)(q34;q11)$ у хворої № 3

З урахуванням виявлених цитогенетичних маркерів хворих на ГЛ класифіковано на групи ризику відповідно до рекомендацій European LeukemiaNet [7, 12, 15]: група хворих з несприятливими цитогенетичними маркерами, група проміжного ризику без прогностично значущих маркерів і група зі сприятливими факторами прогнозу (табл. 2).

Таблиця 2

Розподіл пацієнтів з ГЛ на групи ризику відповідно до виявлених цитогенетичних маркерів

Гостра мієлоїдна лейкемія	Гостра лімфобластна лейкемія
Прогностично несприятливі аберації:	
перебудови 3q, 17p, -5/del(5q), -7/del(7q), $t(v;11)(v;q23)$, $t(6;9)(p23;q34)$, $t(9;22)(q34;q11)$, моносомний каріотип, комплексний каріотип (≥ 3 аномалій)	$t(4;11)(q21;q23)$, $t(9;22)(q34;q11)$, гіподиплоїдний набір хромосом (26-44), комплексний каріотип (≥ 3 аномалій)
Аберації з проміжним прогнозом:	
рідкісні або нетипові аномалії, нормальний каріотип	рідкісні або нетипові аномалії, нормальний каріотип
Прогностично сприятливі аберації:	
$t(8;21)(q22;q22)$, $t(15;17)(q22;q11-21)$, $inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)$	$t(12;21)(p13;q22)$, масивна гіпердиплоїдія (>50 хромосом)

До першої групи хворих із несприятливими цитогенетичними маркерами включено 4 випадки ГЛ з $t(9;22)(q34;q11)$ та/або відповідним химерним геном *BCR/ABL*, перебудовами 17p, множинними кількісними і структурними аномаліями каріотипу (№№ 3, 8, 9, 10). Загалом, несприятливими прогностичними чинниками вважають транслокації $t(v;11)(v;q23)$, $t(6;9)(p23;q34)$, $t(9;22)(q34;q11)$, моносомії 5 і 7, делеції 5q і 7q, перебудови 3q, 17p, моносомний каріотип (відсутність двох чи більшої кількості автосом або ж відсутність однієї автосоми у поєднанні хоча б з однією структурною перебудовою) та інші при ГМЛ; гіподиплоїдію (24-44 хромосом), транслокації $t(9;22)(q34;q11)$, $t(4;11)(q21;q23)$, перебудови 17p та інші при ГЛЛ; а також наявність двох і більше клонів патологічних клітин, каріотипи із множинними хромосомними абераціями при усіх типах ГЛ (табл. 2). Зазвичай пацієнти з такими змінами погано відповідають на лікування або не відповідають узагалі, тривалість їхнього життя значно скорочується, а якість погіршується [3, 7, 12, 15].

До другої групи хворих з маркерами проміжного прогнозу включено 4 випадки ГЛ із рідкісними або нетиповими хромосомними перебудовами ($i(7)(q10)$) та з нормальним

каріотипом (№№ 1, 4, 5, 6). Відомості літератури щодо прогностичного значення нормального каріотипу та рідкісних перебудов у хворих на ГЛ суперечливі. Результати лікування цих хворих значно відрізняються один від одного, тому ця проблема потребує подальшого вивчення. До прикладу, у хворих на ГМЛ із нормальним каріотипом виявлення мутацій генів *RUNX1*, *FLT3*, *RAS*, *c-KIT*, тандемних повторів гена *MLL* змінюють прогноз хвороби із проміжного на несприятливий, а наявність мутацій гена *CEBRA*, *NPM1* – визначає чутливість до хіміотерапії та відносно сприятливий прогноз [3, 7, 12, 15].

До останньої групи включено 3 хворих із прогностично сприятливими цитогенетичними маркерами – випадки масивної гіпердиплоїдії при ГЛЛ, транслокації $t(8;21)(q22;q22)$, $t(15;17)(q22;q11-21)$ та/або відповідні химерні гени *AML1/ETO*, *PML/RARa* при ГМЛ (№№ 2, 7, 11). Загалом, сприятливими прогностичними чинниками вважають $t(8;21)(q22;q22)$, $t(15;17)(q22;q11-21)$, $inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)$ при ГМЛ; $t(12;21)(p13;q22)$, масивну гіпердиплоїдію (>50 хромосом) при ГЛЛ (табл. 2) [3, 7, 12, 15].

Розподіл хворих на групи ризику відповідно до виявлених прогностичних маркерів дав змогу підібрати оптимальну тактику їхнього лікування, а саме: інтенсивність терапії, необхідність проведення трансплантації кісткового мозку вже у ремісії I, доцільність призначення інгібіторів тирозинкінази при ГЛ з $t(9;22)(q34;q11)$ або диференціувального агента – повної транс-ретиноєвої кислоти (АТРА) при ГМЛ з $t(15;17)(q22;q11-21)$. Застосування препаратів цільової дії (АТРА й інгібіторів тирозинкінази) у лікуванні хворих на ГЛ значно покращило його результат.

Цитогенетичні та молекулярно-генетичні дослідження лейкемічних клітин у хворих необхідно проводити на всіх етапах перебігу ГЛ: під час встановлення діагнозу, під час ремісії хвороби та у разі рецидиву. Цитогенетичні дослідження дали змогу виявити асоційовані з ГЛ аномалії-маркери, наприклад, $t(15;17)(q22;q11-21)$ при ГЛЛ, $t(8;21)(q22;q22)$ при ГМЛ M2, $t(9;22)(q34;q11)$ при ГЛЛ та інші. Деякі з них можуть бути одночасно і діагностичними, і прогностичними маркерами. З урахуванням виявлених маркерів хворих класифіковано на групи ризику: група високого ризику з несприятливими цитогенетичними маркерами, група середнього ризику без прогностично значущих маркерів і група зі сприятливими факторами прогнозу. Розподіл пацієнтів із ГЛ на прогностичні групи дав змогу підібрати оптимальну тактику їхнього лікування. За допомогою цитогенетичних і молекулярно-генетичних методів також можна оцінити повноту ремісії та мінімальну залишкову хворобу. Таким чином, цитогенетичні та молекулярно-генетичні методи мають бути включені у стандарти обстеження хворих не тільки з ГЛ, а й з усіма гематологічними неоплазіями.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Андреева С. В., Дроздова В. Д. Стандарти аналізу препаратів хромосом при неоплазіях кровотворення: метод. рекомендації. К., 2007. 44 с.
2. Зотова Е. В., Лукьянова А. С., Вальчук М. А. и др. Диагностическое и прогностическое значение филадельфийской хромосомы у пациентов с острыми лейкозами // Гематология. Трансфузиология. Восточная Европа. 2019. Т. 1. № 2. С. 18–29.
3. Ольшанская Ю. В., Домрачева Е. В. Хромосомные перестройки при острых лейкозах. М.: МЕДпресс-информ, 2006. 112 с.
4. Andersen M. K., Larson R. A., Mauritzson N. et al. Balanced chromosome abnormalities $inv(16)$ and $t(15;17)$ in therapy-related myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia: report from an International Workshop. Gen. Chromosom // Cancer. 2002. Vol. 33. N 4. P. 395–400.

5. *Arber D. A., Orazi A., Hasserjian R.* et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia // *Blood*. 2016. Vol. 127. N 20. P. 2391–2405.
6. *Bain B. J.* Leukaemia diagnosis. 4th ed. NJ: Wiley-Blackwell, 2010. 403 p.
7. *Haferlach C., Rieder H., Lillington D. M.* et al. Proposals for standardized protocols for cytogenetic analyses of acute leukemias, chronic lymphocytic leukemia, chronic myeloid leukemia, chronic myeloproliferative disorders, and myelodysplastic syndromes // *Genes Chromosomes Cancer*. 2007. Vol. 46. N 5. P. 494–499.
8. *Heim S., Mitelman F.* Cancer cytogenetic. 3rd ed. NY: Wiley-Blackwell, 2009. 736 p.
9. *Jongen-Lavrencic M., Grob T., Hanekamp D.* et al. Molecular minimal residual disease in acute myeloid leukemia // *N. Engl. J. Med.* 2018. Vol. 378. N 13. P. 1189–1199.
10. *Linggi B., Muller-Tidow C., van de Locht L.* et al. The t(8;21) fusion protein, AML1/ETO, specifically represses the transcription of the p14ARF tumor suppressor in acute myeloid leukemia // *Nature Medicine*. 2002. Vol. 8. N 7. P. 743–750.
11. *McGowan-Jordan J., Simons A., Schmid M.* ISCN, 2016. An international system for human cytogenetic nomenclature. Basel: S. Karger, 2016. 140 p.
12. *Mrózek K., Marcucci G., Nicolet D.* et al. Prognostic significance of the European Leukemia-Net standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute myeloid leukemia // *J. Clin. Oncol.* 2012. Vol. 30. P. 4515–4523.
13. *Pienkowska-Grela B., Brycz-Witkowska J., Chmarzynska-Mróz E.* i wsp. Analiza cytogenetyczna w nowotworach hematologicznych: Poradnik // Warszawa: Centrum Onkologii, 2004. 59 s.
14. *Pinkel D., Straume T., Gray J. W.* Cytogenetic analysis using quantitative high sensitivity, fluorescence hybridization // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1986. Vol. 83. N 9. P. 2934–2938.
15. *Rack K. A., van den Berg E., Haferlach C.* Cytogenetics and molecular genetics European recommendations and quality assurance for cytogenomic analysis of haematological neoplasms // *Leukemia*. 2019.
16. *Swerdlow S. H., Campo E., Pileri S. A.* et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms // *Blood*. 2016. Vol. 127. N 20. P. 2375–2390.
17. *Van Dongen, Van der Velden V. H., Bruggemann M.* et al. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies // *Blood*. 2015. Vol. 125. N 26. P. 3996–4009.
18. *Vasquez-Palacio G., Botero O., Sierra M.* et al. Cytogenetic analysis and FISH of terminal deletion of the long arm of chromosome 9 in a patient with acute promyelocytic leukemia // *Medicina Universitaria*. 2009. Vol. 11. N 44. P. 193–197.
19. *Wetzler M., Dodge R. K., Mrózek K.* et al. Additional cytogenetic abnormalities in adults with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia: A study of the Cancer and Leukaemia Group B // *Br. J. Haematol.* 2004. Vol. 124. N 3. P. 275–288.

Стаття надійшла до редакції 30.05.19

доопрацьована 29.07.19

прийнята до друку 03.09.19

**CYTOGENETIC INVESTIGATIONS OF LEUKEMIC CELLS
AT DIFFERENT STAGES OF ACUTE LEUKEMIA**

**O. Zotova¹, A. Lukianova², M. Valchuk¹, Y. Karol³, N. Horon³,
O. Shalay¹, V. Loginsky¹**

*¹SI «Institute of Blood Pathology and Transfusion Medicine, NAMS of Ukraine»
45, General Chuprynka St., Lviv 79044, Ukraine*

*²Medical Biology Centre «Genom»
23, Kopernik St., Kyiv 04216, Ukraine*

*³5th Clinical City Hospital
45, General Chuprynka St., Lviv 79044, Ukraine
e-mail: lnkzotova@gmail.com*

Cytogenetic investigations of bone marrow (BM) and/or peripheral blood (PB) cells from 11 patients (range: 18–47 years, 6 males and 5 females) were performed at different stages of acute leukemia (AL): in newly diagnosed patients, in remission and at relapse. The methods of conventional cytogenetics (GTG) and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) were used. Cytogenetic methods were performed using standard techniques and karyotypes were described according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN, 2016). Structural (del(1)(q24), i(7)(q10), t(8;21)(q22;q22), del(9)(q21-q22), t(9;22)(q34;q11), t(15;17)(q22;q11-21), der(17)t(17;?)(p11;?), marker chromosomes) and numerical (trisomies, monosomies) chromosomal abnormalities were found. Some genetic abnormalities (BCR/ABL and PML/RARA fusion genes) were detected by molecular genetic methods (FISH). Spectrum of cytogenetic abnormalities had an important diagnostic and prognostic significance. Diagnosis of AL is possible due to the presence of specific genetic markers that can confirm some types of AL, namely t(8;21)(q22;q22) detect in patients with acute myeloid leukemia M2 (AML M2), t(15;17)(q22;q11-21) – in patients with acute promyelocytic leukemia (APL), t(9;22)(q34;q11) – in patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL). Taking into consideration the identified cytogenetic abnormalities AL patients were classified by risk groups: the group of patients with adverse prognosis factors, the intermediate-risk group without significant prognostic markers and the group of patients with favorable cytogenetic markers. Distribution of patients into risk groups according to the identified prognostic markers allows to choose the most appropriate treatment approach for them, namely the intensity of therapy, the necessity of bone marrow transplantation in the first remission, the necessity of the prescription of tyrosine kinase inhibitors for patients with AL with t(9;22)(q34;q11) or differentiating agent – all-trans retinoic acid (ATRA) for patients with AML with t(15;17)(q22;q11-21). Thus, cytogenetic investigations should be included in the standard examination of patients with AL for diagnosis, prognosis and selection the optimal treatment strategy. Besides the analysis of differential banding pattern chromosomes it is necessary for patients with AL to apply molecular genetic studies, namely FISH and polymerase chain reaction (PCR).

Keywords: acute leukemia, karyotype, cytogenetic abnormalities, diagnosis, prognosis

ВПЛИВ ШТУЧНИХ ЛІСОНАСАДЖЕНЬ НА ЕЛЕКТРОФІЗИЧНІ ПОКАЗНИКИ ЧОРНОЗЕМУ ЗВИЧАЙНОГО

В. Горбань

*Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара
просп. Гагаріна, 72, Дніпро 49010, Україна
e-mail: vad01@ua.fm*

Досліджено вплив штучних лісових насаджень на електричний опір, питому електропровідність, мінералізацію, солоність і діелектричну проникність чорнозему звичайного в умовах П'ятихатського лісництва (Дніпропетровська область, Україна). Визначення електричного опору ґрунтової пасти виконували з використанням чотирьохелектродної установки з площинними електродами. Визначення електрофізичних показників ґрунтової суспензії (питомої електропровідності, мінералізації та солоності) виконували з використанням кондуктометра-солеміра-термометра Ezodo-7021. Визначення діелектричної проникності ґрунтів виконували з використанням цифрового вимірювача ємності СМ-9601А. Встановлено, що верхні генетичні горизонти чорноземів під степовою рослинністю та насадженням робінії характеризуються збільшеним електричним опором порівняно з верхніми горизонтами чорнозему під насадженням дуба. Верхні горизонти чорноземів під степовою рослинністю і насадженням робінії також відрізняються від верхніх горизонтів чорнозему під насадженням дуба меншими величинами питомої електропровідності, мінералізації та солоності. Такий характер розподілу досліджуваних показників може свідчити про вилучення водорозчинних і поживних сполук із чорноземів під степовою рослинністю (застосовується для вирощування сільськогосподарських рослин) та насадженням робінії, тоді як під насадженням дуба спостерігається їхня акумуляція. Верхні горизонти чорнозему під степовою рослинністю відрізняються збільшеними величинами діелектричної проникності порівняно з верхніми горизонтами чорноземів під насадженнями робінії та дуба. Це свідчить про ущільнення чорнозему під степовою рослинністю, яке відбувається внаслідок його збіднення на вміст органічних речовин, і погіршення структурно-агрегатного стану. Отримані результати дають змогу стверджувати, що штучні лісонасадження позитивно впливають на властивості чорноземів звичайних, а електрофізичні показники цілком справедливо можна використовувати як певні «маркери» стану чорноземів.

Ключові слова: чорнозем, електричний опір, питома електропровідність, мінералізація, солоність, діелектрична проникність, насадження робінії та дуба

Ґрунтовий покрив степової зони України характеризується проявом різноманітних деградаційних процесів, найголовнішими з яких є втрата гумусу та поживних речовин, переущільнення, підкислення, водна та вітрова ерозія, аридизація ґрунтів [2, 24]. Одним із найголовніших заходів для подолання цих процесів, який характеризується комплексним позитивним впливом на стан ґрунтів, є створення системи полезахисних лісонасаджень [21–23, 26].

Зростання штучних лісонасаджень на степових ґрунтах призводить до змін їхніх властивостей, які проявляються у збільшенні вмісту гумусу [6, 10], покращенні структурного стану [13, 15], зростанні величини ємності поглинання [1, 19], зменшенні щільності

[14], покращенні водопроникності [8, 20], зниженні межі закипання [19] та ін. Разом з тим, досліджень, які детально аналізують особливості впливу лісонасаджень на електрофізичні показники чорноземних ґрунтів, за окремими винятками (наприклад, [7, 11, 12]), практично немає.

Необхідно зазначити, що сьогодні під час ґрунтових досліджень визначення електрофізичних властивостей виконують дуже рідко. Однак висока швидкість виконання цих визначень і їхня відносна простота, значний діапазон показників, пов'язаний зі змінами фізичних особливостей середовища, свідчать про актуальність дослідження електрофізичних показників ґрунтів [16].

Електрофізичні показники доречно використовувати під час комплексної оцінки фізичних властивостей ґрунтів, які тісно пов'язані з іншими ґрунтовими властивостями (якісний склад органічних речовин, мінералогічний склад та ін.) [3, 25]. До найголовніших електрофізичних показників ґрунтів можна віднести електропровідність, питому опірність, діелектричну проникність і низку магнітних властивостей [9, 18].

Поява сучасних приладів забезпечує полегшене проведення електрофізичних досліджень ґрунтів і збільшення їхньої швидкості, що дає змогу активно використовувати їх у процесі ґрунтознавчих досліджень [1, 11].

Мета нашої роботи – встановити особливості впливу штучних лісових насаджень на електрофізичні показники чорнозему звичайного.

Матеріали та методи

Для реалізації поставленої мети було закладено 3 пробні площі на території Комісарівського заказника, розташованого в межах П'ятихатського р-ну Дніпропетровської обл. Заказник лежить на південний захід від с. Новоукраїнка і на північ від с. Лозуватка. Комісарівський заказник розміщений на території П'ятихатського лісництва (Верхньодніпровський держлісгосп, Дніпропетровське обласне управління лісового та мисливського господарства) у верхів'ях балок Довжик і Тетяниної (ліві притоки р. Лозуватки) та на вододільному просторі між ними. На кожній пробній площі було закладено по ґрунтовому розрізу.

Пробна площа 1 закладена на ділянці агроценозу, ґрунтовий покрив якого під час відбору ґрунтових зразків був вільний від рослинного покриву.

Макроморфологічна характеристика ґрунтового профілю

Нор 0–10 см. Перегнійно-акумулятивний, орний, темно-сірий, сухий, грудкуватий, суглинковий, пухкий, корененасичений, у верхній частині заорані залишки трав'яної рослинності. Перехід поступовий за кількістю коренів і щільністю.

Н1 10–23 см. Гумусовий, темно-сірий, сухуватий, грудкуватий, суглинковий, більш щільний, ніж попередній, корененасиченість менша, ніж у попередньому. Перехід поступовий за щільністю й забарвленням.

Н2 23–35 см. Гумусовий, темно-сірий, сухуватий, грудкуватий, суглинковий, щільніший за попередній, коренів практично немає. Перехід різкий за щільністю й забарвленням.

НРк 35–81 см. Перехідний, сірий з палевим відтінком, сухуватий, грудкуватий, суглинковий, щільний. Перехід поступовий за забарвленням. Закипання з 72 см.

Рк 81–150 см. Ґрунтоутворююча порода – лесоподібний суглинок палевого кольору з включенням білоочки.

Ґрунт – чорнозем звичайний середньовилугований середньогумусовий середньосуглинковий на лесоподібних суглинках.

Пробна площа 2 закладена в насажденні *Robinia pseudoacacia* L.

Макроморфологічна характеристика ґрунтового профілю

H1 0–10 см. Перегнійно-аккумулятивний, темно-сірий, сухий, дрібногрудкуватий, суглинковий, пухкий, багато коренів деревної рослинності. Перехід поступовий за кількістю коренів і щільністю.

H2 10–38 см. Гумусовий, темно-сірий, сухий, грудкуватий, суглинковий, щільніший, ніж попередній, коренів менше, однак вони товстіші, ніж у попередньому. Перехід поступовий за забарвленням.

Hр 38–57 см. Перехідний, сірий, сухуватий, грудкуватий, суглинковий, щільний, трапляються окремі корені. Перехід різкий за забарвленням.

Phk 57–78 см. Світло-сірий із палевим відтінком, сухуватий, грудкуватий, суглинковий, щільний, трапляються окремі товсті корені. Перехід поступовий за забарвленням. Закипання з 66 см.

Pk 78–150 см. Ґрунтоутворююча порода – лесоподібний суглинок палевого кольору з включенням білоочки.

Ґрунт – чорнозем звичайний лісопокращений середньовилугований середньогумусовий середньосуглинковий на лесоподібних суглинках.

Пробна площа 3 закладена в насадженні *Quercus robur* L.

Макроморфологічна характеристика ґрунтового профілю

H1 0–12 см. Перегнійно-аккумулятивний, темно-сірий, сухий, дрібногрудкуватий, суглинковий, пухкий, багато дрібних коренів трав'яної рослинності. Перехід поступовий за кількістю коренів, щільністю й забарвленням.

H2 12–44 см. Гумусовий, темно-сірий, сухий, грудкуватий, суглинковий, щільніший, ніж попередній. Перехід поступовий за забарвленням.

Hр 44–65 см. Перехідний, сірий, сухуватий, грудкуватий, суглинковий, щільний, трапляються окремі корені. Перехід різкий за забарвленням.

Phk 65–87 см. Світло-сірий із палевим відтінком, сухуватий, грудкуватий, суглинковий, щільний. Перехід поступовий за забарвленням. Закипання з 75 см.

Pk 87–150 см. Ґрунтоутворююча порода – лесоподібний суглинок палевого кольору з включенням білоочки.

Ґрунт – чорнозем звичайний лісопокращений середньовилугований середньогумусовий середньосуглинковий на лесоподібних суглинках.

Ґрунтові зразки відбирали зі всієї товщі кожного генетичного горизонту.

Визначення електричного опору ґрунту виконували з використанням чотирьохелектродної установки з площинними електродами. Для дослідження використовували ґрунтову пасту, яку готували шляхом додавання до ґрунту дистильованої води для його насичення понад величину найменшої вологості. Вимірювання в пастах необхідні для того, щоби стабілізувати фактор зволоження та гомогенізувати ґрунтовий зразок, що дає можливість отримати електричний опір з усуненням фактора вологості, температури й неоднорідності зразка. Значення електричного опору в такому випадку найбільш точно характеризують текстурно-хімічну та генетичну особливості ґрунтів [17].

Визначення електрофізичних показників (питомої електропровідності, мінералізації та солоності) виконували з використанням кондуктометра-солеметра-термометра Ezodo-7021, за допомогою якого вимірювали зазначені показники у ґрунтовій витяжці (у співвідношенні 1 частина ґрунту до 5 частин дистильованої води). Детальну методику визначення цих показників наведено в роботах Ю.В. Дегтярьова [11, 12].

Визначення діелектричної проникності ґрунтів виконували з використанням цифрового вимірювача ємності СМ-9601А з одночасним встановленням щільності ґрунтового

зразка. Детальну методику визначення цього показника наведено в нашій попередній роботі [5].

Результати і їхнє обговорення

У результаті визначення електричного опору чорнозему звичайного пробної площі 1, який сформувався під степовою рослинністю та під дією його сільськогосподарського використання, встановлено, що верхні горизонти Н_{ор}, Н1 та Н2 відрізняються збільшеними величинами порівняно з двома нижніми горизонтами НР_к та Р_к (рис. 1, а). Це свідчить, що верхні горизонти порівняно з нижніми є збідненими на водорозчинні сполуки, наявність солей яких забезпечує зменшення електричного опору ґрунтів. Такі особливості можна пояснити вилученням сполук із верхніх горизонтів ґрунту сільськогосподарськими рослинами, які на ньому культивуються.

Генетичні горизонти Н1 та Н2 чорнозему під насадженням робінії на пробній площі 2 характеризуються збільшеними величинами електричного опору порівняно з горизонтами Н_р, Р_{hk} та Р_к (рис. 1, б). Це також свідчить про збіднення гумусових горизонтів порівняно з нижніми, можливо, в результаті активного поглинання водорозчинних сполук робінією і травостаном даного насадження.

Чорнозем під насадженням дуба пробної площі 3 відрізняється мінімальними значеннями електричного опору гумусових горизонтів Н1 та Н2 (рис. 1, в). Нижні горизонти Н_р, Р_{hk} та Р_к характеризуються збільшеними величинами електричного опору порівняно з двома гумусовими, що свідчить про збільшений вміст водорозчинних сполук у верхніх горизонтах Н1 та Н2.

Таким чином, вплив вирощування сільськогосподарських рослин і росту насадження робінії сприяє вилученню водорозчинних сполук із верхніх горизонтів чорнозему, в той час як насадження дуба, навпаки, сприяє накопиченню цих речовин у верхніх горизонтах чорнозему, де вони можуть бути найбільш ефективно використані рослинністю.

Дослідженнями електрофізичних показників чорнозему пробної площі 1 встановлено, що їхні мінімальні значення пов'язані з горизонтом Н2. Догори та донизу за профілем від цього горизонту відбувається зростання питомої електропровідності, мінералізації та солоності. Отримані результати свідчать, що горизонт Н2 є найменш забезпеченим водорозчинними сполуками, порівняно з іншими горизонтами. При цьому максимальні значення електрофізичних показників виявлено в горизонті Р_к (табл. 1).

Генетичні горизонти Н2 в чорноземах під насадженням робінії та дуба також відрізняються мінімальними значеннями електрофізичних показників. Догори та донизу за профілем від цього горизонту спостерігається збільшення їхніх значень. При цьому максимальні значення питомої електропровідності, мінералізації та солоності також виявлено в горизонті Р_к.

Отримані результати свідчать, що найбільший вміст водорозчинних сполук спостерігається в материнській породі (горизонт Р_к). За збільшення відстані від цього горизонту вміст водорозчинних сполук зменшується. Незначне збільшення електрофізичних показників у верхніх горизонтах можна пояснити процесами імпульверизації [2, 4], які забезпечують надходження до поверхневого горизонту продуктів вітрової ерозії ґрунтів, що забезпечує його збагачення різними сполуками, в тому числі й водорозчинними. Найбільш інтенсивні процеси імпульверизації характерні для ґрунту дубового насадження, верхній горизонт якого відрізняється найвищими електрофізичними показниками порівняно з чорноземами під степовою рослинністю і насадженням робінії, верхні горизонти яких за значеннями досліджуваних показників майже не відрізняються між собою.

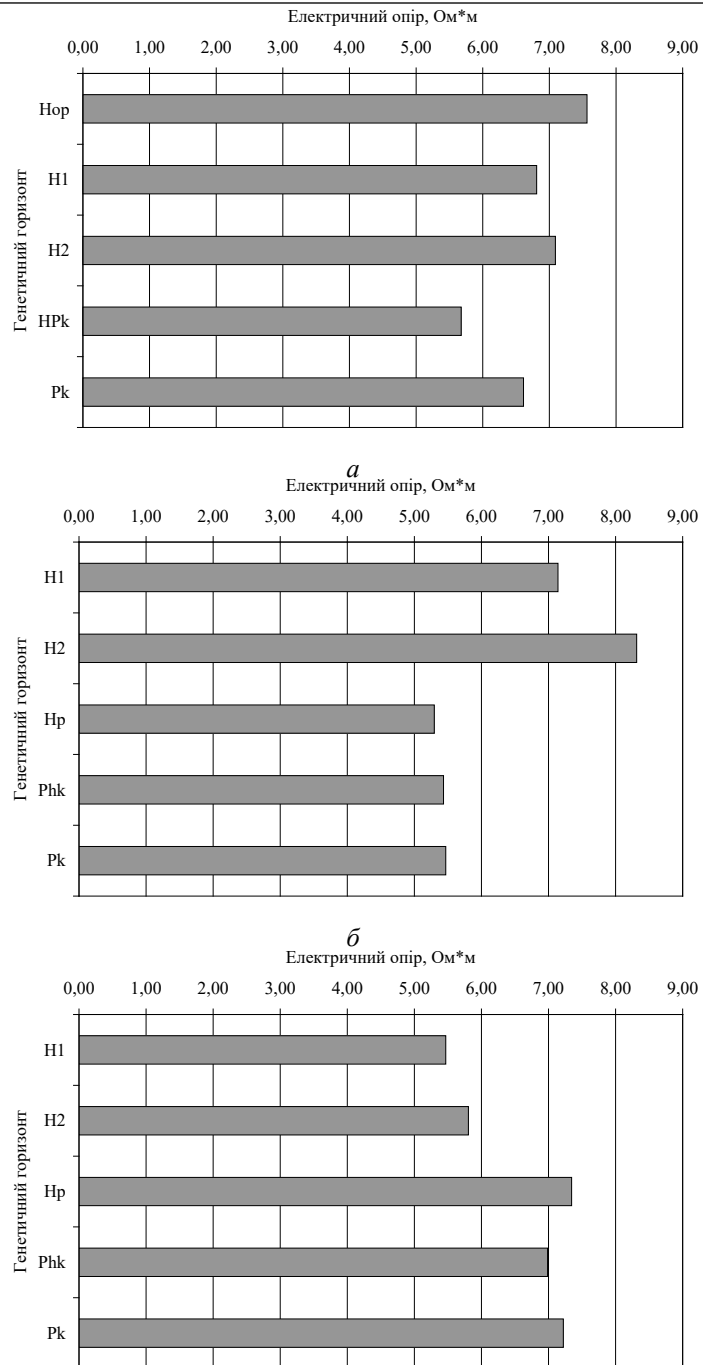


Рис. 1. Електричний опір чорноземів під різними типами рослинності: *a* – чорнозем під степовою рослинністю (ПП 1); *б* – чорнозем під насадженням робінії (ПП 2); *в* – чорнозем під насадженням дуба (ПП 3)

Таблиця 1

Електрофізичні показники чорноземів під різними типами рослинності			
Генетичний горизонт	Питома електропровідність, мкСм/см	Мінералізація, мг/кг	Солоність, мг/кг
Пробна площа 1 – Чорнозем звичайний під степовою рослинністю			
Нор	70±2,0	45±1,5	44±1,5
Н1	40±2,0	28±1,0	31±1,0
Н2	33±1,5	23±1,0	25±1,0
НРк	83±2,1	60±2,0	59±2,0
Рк	96±2,0	76±2,1	67±2,1
Пробна площа 2 – Чорнозем під насадженням робінії			
Н1	71±2,1	56±2,5	47±2,5
Н2	27±1,5	28±1,0	30±2,0
Нр	86±3,0	72±2,5	70±2,5
Phk	99±2,5	82±3,0	72±3,0
Рк	110±3,0	86±3,0	74±3,0
Пробна площа 3 – Чорнозем під насадженням дуба			
Н1	91±3,0	60±2,0	53±2,1
Н2	33±2,0	29±1,0	32±2,0
Нр	84±2,1	66±2,5	60±2,0
Phk	101±3,0	77±2,5	70±2,1
Рк	112±3,0	81±3,0	73±3,0

Дослідженнями діелектричної проникності чорнозему під степовою рослинністю встановлено, що її найменше значення пов'язане з горизонтом Нор, яке майже не відрізняється від значень горизонтів Н1 та Н2 (рис. 2, а). Максимальне значення діелектричної проникності спостерігається в горизонті НРк.

У чорноземах під насадженнями робінії та дуба мінімальні значення діелектричної проникності виявлено в горизонтах Н1, з глибиною спостерігається зростання її значень (рис. 2, б, в).

Порівнянням середніх арифметичних електрофізичних показників чорнозему під степовою рослинністю і чорноземів під насадженнями робінії та дуба виявлено, що лише за значенням електричного опору досліджені ґрунти суттєво не відрізняються один від одного. За іншими показниками чорнозем під степовою рослинністю й чорноземи під насадженнями робінії та дуба суттєво відрізняються між собою (при 5 %-ному рівні значимості).

Для встановлення характеру мінливості значень електрофізичних показників чорноземів під різними типами рослинності було розраховано її відносний показник – коефіцієнт варіації (табл. 2).

Таблиця 2

Коефіцієнт варіації електрофізичних показників чорноземів під різними типами рослинності, %

Показник	Чорнозем під		
	степовою рослинністю	насадженням робінії	насадженням дубу
Електричний опір	10	21	14
Питома електропровідність	42	41	36
Мінералізація	48	37	33
Солоність	39	33	29
Діелектрична проникність	58	75	64

Найбільш мінливим серед електрофізичних показників виявилася діелектрична проникність (див. рис. 2), найменш мінливим – електричний опір (див. рис. 1). Серед ґрунтів найбільшою мінливістю електрофізичних показників характеризується чорнозем під акацієвим насадженням, найменшою – чорнозем під насадженням дуба.

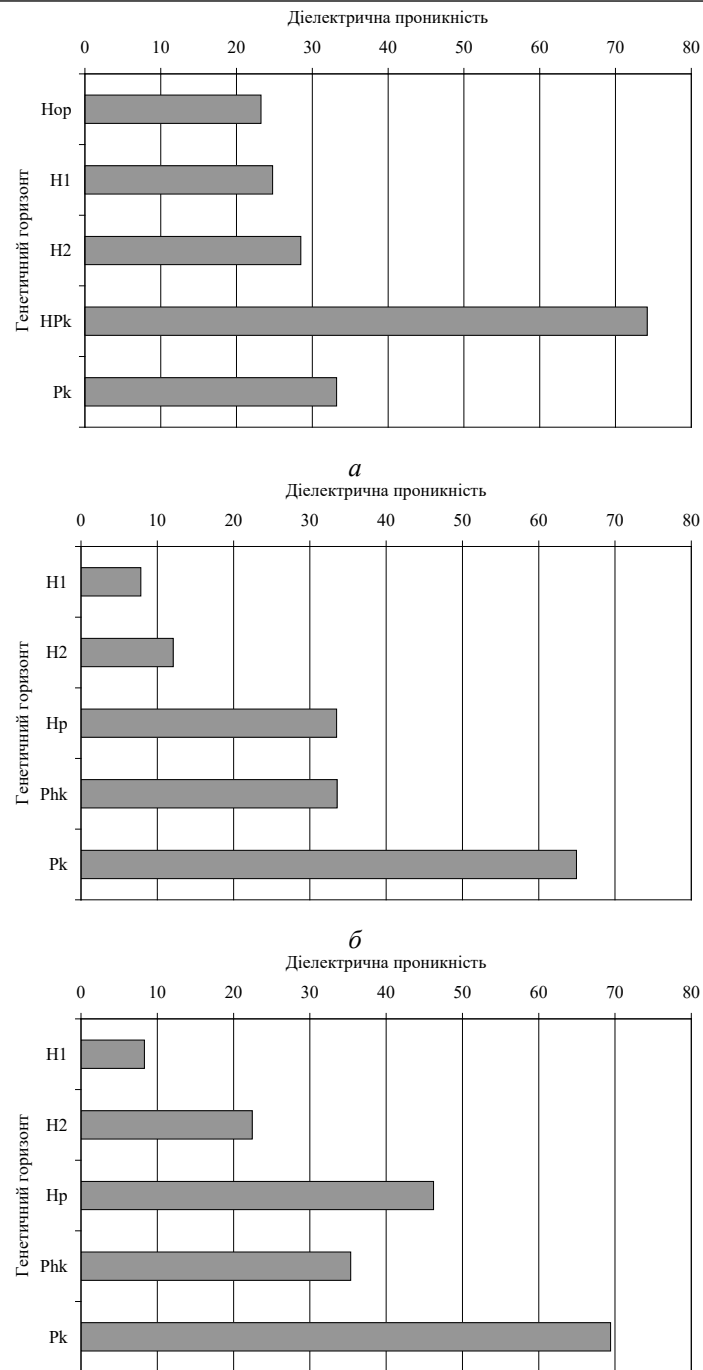


Рис. 2. Діелектрична проникність чорноземів під різними типами рослинності: *a* – чорнозем під степовою рослинністю (ПП 1); *б* – чорнозем під насадженням робінії (ПП 2); *в* – чорнозем під насадженням дуба (ПП 3)

Отримані результати дають змогу припустити, що генетичні горизонти Нор, Н1 та Н2 чорнозему під степовою рослинністю, яким властиві збільшені значення діелектричної проникності, характеризуються зменшеним вмістом органічної речовини та погіршеним структурно-агрегатним станом порівняно з горизонтами Н1 і Н2 чорноземів під насадженнями робінії та дуба, що є цілком логічним висновком. У результаті проведених досліджень встановлено, що верхні генетичні горизонти чорноземів під степовою рослинністю (рис. 1, а) та насадженням робінії (рис. 1, б) характеризуються збільшеним електричним опором порівняно з верхніми горизонтами чорнозему під насадженням дуба (рис. 1, в). Верхні горизонти чорноземів під степовою рослинністю і насадженням робінії також відрізняються зменшеними значеннями питомої електропровідності, мінералізації та солоності порівняно з верхніми горизонтами чорнозему під насадженням дуба (див. табл. 1). Такий характер розподілу досліджуваних показників може свідчити про вилучення водорозчинних і поживних сполук із чорноземів під степовою рослинністю (використовується для вирощування сільськогосподарських рослин) та насадженням робінії, тоді як під насадженням дуба спостерігається їхня акумуляція. Верхні горизонти чорнозему під степовою рослинністю відрізняються від верхніх горизонтів чорноземів під насадженнями робінії та дуба збільшеними значеннями діелектричної проникності. Це свідчить про ущільнення чорнозему під степовою рослинністю, яке відбувається внаслідок його збіднення на вміст органічних речовин і погіршення структурно-агрегатного стану. Отримані результати дають змогу стверджувати, що штучні лісонасадження сприятливо впливають на властивості чорноземів звичайних, а електрофізичні показники цілком справедливо можна використовувати як певні «маркери» стану ґрунтів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Бедернічек Т. Ю., Копій С. Л., Партика Т. В., Гамкало З. Г. Електропровідність як експрес-індикатор йонної активності едафотопу лісових екосистем // Біологічні системи. 2009. Т. 1. Вип. 1. С. 85–89.
2. Белова Н. А., Травлев А. П. Естественные леса и степные почвы (экология, микроморфология, генезис). Д.: ДГУ, 1999. 348 с.
3. Гамкало З. Г., Бедернічек Т. Ю., Партика Т. В., Партем Ю. П. Питома електропровідність водних суспензій ґрунту як експрес-критерій ґрунтової діагностики // Біологічні системи. 2012. Т. 4. Вип. 1. С. 16–19.
4. Горбань В. А. Еолово-ґрунтові відклади та їх вплив на формування едафотопів лісових культурбіогеоценозів степової зони України: монографія. Дніпро: Свідлер А. Л., 2017. 200 с.
5. Горбань В. А. К методике изучения диэлектрической проницаемости почв (на примере почв байрачных лесов северного варианта степной зоны Украины) // Ґрунтознавство. 2016. Т. 17. № 3–4. С. 90–97.
6. Горбань В. А., Гуслистий А. О. Деякі особливості впливу насаджень *Robinia pseudo-acacia* L. на ґрунти в посушливих умовах // Екологія та ноосферологія. 2018. Т. 29. № 1. С. 47–51.
7. Горбань В. А., Гуслистий А. О., Мандригеля М. В., Погрібняк В. О. Вплив лісової рослинності на діелектричну проникність та електрофізичні показники чорноземів // Ґрунтознавство. 2017. Т. 18. № 1–2. С. 38–45.
8. Горбань В. А. Зв'язок водопроникності ґрунтів з іншими їхніми фізичними властивостями у лісових угрупованнях Присамар'я // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2007. Вип. 43. С. 161–165.

9. Горбань В. А. Фізичний стан ґрунтів як екологічний фактор // Ґрунтознавство. 2006. Т. 7. № 3–4. С. 102–111.
10. Дегтярьов В. В. Гумус чорноземів лівобережного Лісостепу і Степу України: Монографія. Х.: Майдан, 2011. 360 с.
11. Дегтярьов Ю. В. Електропровідність водних суспензій чорноземів типових під різними фітоценозами // Вісн. ХНАУ ім. В.В. Докучаєва. Сер. Ґрунтознавство, агрохімія, землеробство, лісове господарство. 2014. № 1. С. 42–48.
12. Дегтярьов Ю. В. Електрофізичні показники чорноземів типових під різними фітоценозами // Вісн. ХНАУ ім. В.В. Докучаєва. Сер. Ґрунтознавство, агрохімія, землеробство, лісове господарство. 2015. № 2. С. 18–23.
13. Іванько І. А. Екологічна роль світлової структури у формуванні штучних лісових насаджень у степовій зоні України // Біогеоценологічні дослідження лісів степової зони України. Дніпро: Свідлер А. Л., 2016. С. 155–171.
14. Медведєв В. В. Структура ґрунту (методи, генезис, класифікація, еволюція, географія, моніторинг, охорона). Х.: 13 типографія, 2008. 406 с.
15. Медведєв В. В., Лындина Т. Е., Лактионова Т. Н. Плотность сложения почв (генетический, экологический и агрономический аспекты). Х.: 13 типографія, 2004. 244 с.
16. Поздняков А. И. Полевая электрофизика почв. М.: МАИК «Наука/Интерпериодика», 2001. 187 с.
17. Поздняков А. И. Электрофизические методы исследования почв: метод. пособие. М.: МГУ, 2009. 39 с.
18. Теории и методы физики почв / под ред. Е.В. Шеина и Л. О. Карпачевского. М.: Гриф и К, 2007. 616 с.
19. Травлев А. П., Белова Н. А. Лес как фактор почвообразования // Ґрунтознавство. 2008. Т. 9. № 3–4. С. 6–26.
20. Щербина Ю. Г. Влияние физических характеристик почвы и полноты древостоя на состояние лесных биогеоценозов Черноморского побережья Кавказа // Ґрунтознавство. 2002. Т. 3. № 3–4. С. 21–26.
21. An S., Mentler A., Mayer H., Blum W. E. H. Soil aggregation, aggregate stability, organic carbon and nitrogen in different soil aggregate fractions under forest and shrub vegetation on the Loess Plateau, China // Catena. 2010. Vol. 81. N 3. P. 226–233.
22. Gu C., Mu X., Gao P. et al. Influence of vegetation restoration on soil physical properties in the Loess Plateau, China // J. Soil. Sediment. 2019. Vol. 19. N 2. P. 716–728.
23. Lal R. Soil carbon sequestration impacts on global climate change and food security // Science. 2004. Vol. 304 (5677). P. 1623–1627.
24. Medvedev V. V., Plisko I. V., Bigun O. N. Comparative characterization of the optimum and actual parameters of Ukrainian chernozems // Eurasian Soil Sci. 2014. Vol. 47. N 10. P. 1044–1057.
25. Pozdnyakov A. I., Eliseev P. I., Pozdnyakov L. A. Electrophysical approach to assessing some cultivation and fertility elements of light soils in the humid zone // Eurasian Soil Sci. 2015. Vol. 48. N 7. P. 726–734.
26. Ritter E., Vesterdal L., Gundersen P. Changes in soil properties after afforestation of former intensively managed soils with oak and Norway spruce // Plant and Soil. 2003. Vol. 249. N 2. P. 319–330.

INFLUENCE OF ARTIFICIAL FOREST PLANTATIONS ON ELECTROPHYSICAL INDEX OF ORDINARY CHORNOZEM

V. Gorban

*Oles Honchar Dnipro National University
72, Gagarin Ave., Dnipro 49010, Ukraine
e-mail: vad01@ua.fm*

The effect of artificial forest plantations on electrical resistance, electrical conductivity (Cond), mineralization (TDS), salinity (Salt) and dielectric constant of ordinary chernozem in the conditions of Pyatikhatsky forest range (Dnipropetrovsk region, Ukraine) was studied. Determination of the electrical resistance of the soil paste was performed using a four-electrode installation with planar electrodes. The determination of the electrophysical index of the soil suspension (conductivity, mineralization and salinity) was performed using an Ezodo-7021 –conductometer-salimeter-thermometer. Determination of the dielectric constant of the soil was performed using a CM-9601A – digital capacitance meter. It has been established that the upper genetic horizons of chernozem under the steppe vegetation and the planting of robinia are characterized by increased electrical resistance as compared with the upper horizons of the chernozem under the oak plantation. The upper horizons of chernozem under steppe vegetation and robinia plantation are also distinguished by reduced values of electrical conductivity, mineralization and salinity compared to the upper horizons of chernozem under oak plantation. This pattern of distribution of the studied parameters may indicate the removal of water-soluble and nutritive compounds from chernozem under the steppe vegetation (used for growing agricultural plants) and robinia plantation, while their accumulation is observed under the oak plantation. The upper horizons of the chernozem under the steppe vegetation are distinguished by increased values of the dielectric constant compared with the upper horizons of chernozem under the plantations of robinia and oak. This indicates the compaction of chernozem under the steppe vegetation, which occurs as a result of its depletion on the content of organic substances and the decline of the structural-aggregative state. The results obtained suggest that artificial forest plantations have a favorable effect on the properties of ordinary chernozem, and the electrophysical index can quite fairly be used as certain «markers» of the state of chernozem.

Keywords: chernozem, electrical resistance, electrical conductivity, mineralization, salinity, dielectric constant, plantations of robinia and oak

ВПЛИВ КЛІМАТИЧНИХ ЗМІН НА ПОПУЛЯЦІЇ ВИДІВ ТРАВ'ЯНИХ РОСЛИН У СУЧАСНИХ УМОВАХ ВИСОКОГІР'Я УКРАЇНСЬКИХ КАРПАТ

Р. Дмитрах

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

Установлено, що природні популяції рослин в Українських Карпатах протягом останніх років зазнали значних змін унаслідок впливу кліматичних чинників і зростання активності сукцесійно-демутаційних процесів. На фоні поступового відновлення корінної рослинності в гірських екосистемах відбуваються характерні зміни у структурній і просторовій організації популяцій багатьох видів трав'яних рослин, зміщення їхньої висотної поясності та збільшення участі у процесі сукцесій чагарників і адвентивних представників високогір'я. Це зумовлює неоднакові можливості адаптації та функціонування популяцій видів трав'яних рослин високогір'я у змінених умовах середовища. Тривалий моніторинг у популяціях видів, які належать до різних рослинних угруповань у різних еколого-ценотичних умовах і приурочені до різних гіпсометричних рівнів високогір'я, показав, що в одних випадках зростає участь видів, які вирізняються активною стратегією відновлення та її спрямуванням на подальше розширення меж, а в інших – мають протилежний характер, що пов'язано з неспроможністю адаптуватися й виживати у змінених умовах. Установлено, що вегетаційний розвиток популяцій видів трав'яних рослин тісно пов'язаний із режимом температурних умов високогір'я, який впливає на характер проходження фенофаз, динаміку чисельності особин і ритміку їхнього цвітіння. Зростання температурних показників стимулює активацію генерування популяцій і їхню здатність до відновлення. З пришвидшенням темпів фенологічного розвитку спостерігаються зміни, які зумовлюють збільшення відсотка квітучих особин, їхньої насінневої продуктивності й поширення на значно вищих гіпсометричних рівнях високогір'я. Виявлено, що розселення та поява нових популяційних локусів у популяціях видів трав'яних рослин є характерною для відкритих із достатньою інсоляцією ділянок і відсутністю заростей деревно-чагарникової рослинності. У разі негативного впливу затінення та заростання популяції набувають ознак деградації, що призводить до зниження їхніх просторово-демографічних показників і репродуктивної здатності. Основною причиною змін у структурі популяцій є неспроможність конкурувати в умовах інвазії видів деревно-чагарникового ярусу й адаптуватися до змінених умов середовища. Відповідно, у відновленні популяцій видів спостерігаються процеси, пов'язані як із висхідним їхнім поширенням на різних гіпсометричних рівнях, так і з посиленням позицій популяцій видів, характерних для нижчих висот. В одних випадках динамічні тенденції в популяціях супроводжуються збільшенням чисельності особин і розширенням їхніх меж, а в інших зміни мають протилежний характер, що пов'язано зі зменшенням чисельності та їхньою фрагментацією.

Ключові слова: кліматичні зміни, фенологія цвітіння, генеративна здатність, динамічні тенденції, відновлення популяцій

У високогір'ї Українських Карпат протягом останнього десятиліття спостерігається активне відновлення рослинного покриву та, зокрема, на заповідних територіях, які в умовах сучасних кліматичних змін і прискорення демутаційних процесів зазнають значних

трансформацій. Дослідження впливу цих чинників на популяції трав'яних видів рослин є особливо актуальними в гірських екосистемах, що зумовлює різні можливості їхнього функціонування та здатність до відновлення [3, 14, 29, 32, 35]. На тлі природно-відновних процесів відбуваються характерні зміни у структурі популяцій багатьох гірських видів, зміщення їхньої висотної поясності, перебудови ценозів і збільшення участі в процесі сукцесій чагарників, адвентивних представників високотрав'я й дерновинних злаків [28, 37].

Зважаючи на посилення активності кліматично-демутаційних процесів у рослинних угрупованнях високогір'я важливою є оцінка сучасного стану популяцій видів, їхніх динамічних тенденцій і особливостей поведінки в екологічно змінених умовах. Попередніми дослідженнями доведено, що популяції високогірних видів мають неоднакову здатність до самовідновлення під дією різних чинників зовнішнього середовища та збереження на необхідному рівні комплексу структурно-функціональних ознак [7, 15, 16]. Будь-яка зміна еколого-ценотичних умов існування популяцій визначає індивідуальний характер їхньої поведінки, адаптації та виживання [1, 12, 17, 22, 30]. За умов трансформації середовища значних змін зазнає структурна організація популяцій видів і специфіка їхнього функціонування в неоднорідних умовах навколишнього середовища.

Відтак, метою роботи є встановлення характерних змін у популяціях видів трав'яних рослин високогір'я, зокрема, їхньої реакції на зміну умов середовища, особливостей прояву динамічних тенденцій і здатності до відновлення унаслідок посилення впливу кліматичних чинників і активації сукцесійно-демутаційних процесів. Поведінкові ознаки популяцій видів, зокрема, фенологічні (тривалість і темпи проходження фенофаз, ритміка цвітіння), демографічні (чисельність, щільність, просторова диференціація), репродуктивні (генеративне розмноження, насіннева продуктивність, приживання насінневих проростків) тощо дають можливість з'ясувати їхні адаптаційні можливості та здатність до існування в неоднорідних умовах високогір'я. Отримані результати є важливими у вирішенні низки практичних завдань, спрямованих на збереження й охорону рідкісних та ендемічних видів високогір'я Українських Карпат.

Матеріали та методи

З метою встановлення змін у структурній організації популяцій високогірних видів і у їхній здатності до відновлення на різних етапах сукцесійно-демутаційних процесів використано загальноприйняті стаціонарні й маршрутно-польові методи досліджень [2, 13, 21, 31]. Вихідними ознаками діагностики стану популяцій є їхня здатність до відновлення й особливостей прояву динамічних тенденцій у змінених умовах середовища [9, 10, 18, 23]. З цією метою застосовано довготривалі багаторічні спостереження в різних типах оселищ популяцій, що передбачає облік основних параметрів і ознак на постійних пробних площах [4, 8, 20]. Динамічні тенденції й адаптацію популяцій оцінено з урахуванням індивідуальних показників їхньої репродуктивної здатності, зокрема, генеративної як важливої індикаційної ознаки, якою забезпечується відновлення та самопідтримання [5, 6, 23–25]. Хід сезонного розвитку популяцій і характер проходження фенофаз, зокрема, ритміки їхнього цвітіння, відображають зміну чисельності особин та залежність цього показника від метеоумов [19, 27, 32, 36]. Фенологічні спостереження є одним із комплексних досліджень змін клімату щодо циклічності біоритмів у видів і закономірностей проходження вегетації [11, 26, 33, 34, 38]. З цією метою використано дані кліматичних показників сніголавинної метеостанції "Пожижевська" (1450 м н. р. м.) Івано-Франківського центру з гідрометеорології Державної служби з надзвичайних ситуацій у Чорногірському масиві Українських Карпат. Враховано й проаналізовано показники середньомісячної температури повітря,

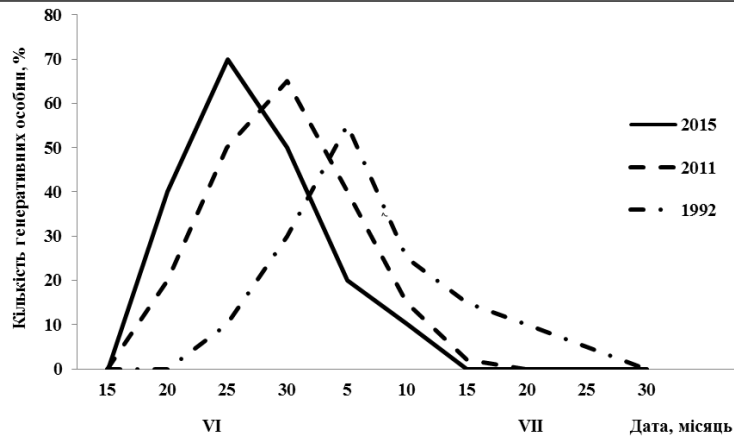
сумарної кількості атмосферних опадів, тривалості сонячної інсоляції та інші показники упродовж різних періодів вегетації.

Об'єктами досліджень є популяції високогірних трав'яних видів, які трапляються в різних рослинних угрупованнях і перебувають на різних гіпсометричних рівнях високогір'я (*Achillea carpatica* Bloki ex Dubovik, *Antennaria dioica* (L.) Gaertn., *Astrantia major* L., *Dianthus carpaticus* Wołoszcz., *D. compactus* Kit., *Doronicum carpaticum* (Griseb. et Schenk) Nym., *Euphorbia carniolica* Jacq., *Hieracium aurantiacum* L., *Hypericum alpigenum* Kit., *Knautia dipsacifolia* (Host) Gren. et Godr.), *Laserpitium krapfii* Crantz, *Leucanthemum rotundifolium* (Waldst et Kit ex Willd.) DC, *Silene dioica* (L.) Clairv., *Ptarmica lingulata* (Willd. et Kit.) DC, *Rumex carpaticus* Zapal., *Senecio subalpinus* Koch, *Solidago alpestris* Waldst. Et Kit, *Thymus alpestris* Tausch, *Valeriana transsilvanica* Schur, *V. tripteris* L., *V. simplicifolia* (Reichenb.) Kabath та ін.). За особливостями просторового поширення переважна більшість із них є локальними та ізольованими популяціями верхнього лісового, субальпійського й альпійського поясів. Основні дослідження проведено в Черногірському та Свидовецькому масивах як на заповідних територіях, так і поза ними.

Результати і їхнє обговорення

Сучасні кліматичні зміни, які спостерігаються у високогір'ї за останній період досліджень, активно впливають на процеси відновлення популяцій багатьох видів рослин. Вплив тепла і, зокрема, збільшення температурних показників зумовлюють різні можливості їхньої адаптації та виживання в сучасних умовах високогір'я. Багаторічні спостереження, проведені в популяціях трав'яних видів, показали, що в сезонній динаміці їхнього розвитку відбуваються зміни, тісно пов'язані з режимом температурних умов упродовж різних періодів вегетації. На основі аналізу метеоданих встановлено, що в річних циклах вегетаційного розвитку за останні десятиліття зросла тенденція до підняття температурних показників повітря і, зокрема, максимальної в липні-серпні, що сягнули позначок понад 25 °С. Порівняння метеорологічних даних попередніх років (1985–1999 рр.) з періодом сучасних (2000–2017 рр.) показали, що середньомісячна температура повітря за вегетаційні сезони (травень–вересень) збільшилася на 1,4 °С, температурний максимум місяця липня – на 3,5 °С, сумарна кількість опадів – на 114,9 мм, а тривалість сонячного сйва – на 166,2 год. Кількість опадів суттєво не змінилася, однак вони частішали та зросла їхня інтенсивність. Переважаючи раніше у високогір'ї північно-західні румби вітрів змінилися на різновекторні.

Веgetаційний розвиток популяцій починається в період, коли середньомісячні показники температури повітря перебувають у межах 7–10 °С. Початок цвітіння спостерігається зі збільшенням середньодобової температури повітря вище 10 °С. Дослідження, проведені в популяціях видів трав'яних рослин, показали, що з потеплінням, ініційованим підвищенням температури повітря, у фенологічному розвитку спостерігаються зміни, які зумовлюють пришвидшення темпів цвітіння та зміщення їхніх фаз на більш ранні періоди вегетації. За таких умов зростає рясність цвітіння, інтенсивність проходження фенофаз і скорочення їхньої тривалості в середньому на 10–15 днів. Хід сезонного розвитку популяцій відображає їхню адаптацію до сучасних умов і проявляється в характері циклічних змін чисельності особин і активації їхнього генерування. Сезонна динаміка цвітіння та ритм розвитку генеративних особин представлені на прикладі популяцій *Rumex carpaticus* (рис. 1). Криві цвітіння генеративних особин за вегетаційні періоди 1992, 2011 і 2015 рр. показали, що найбільші зміни в чисельності та зміщенні ритмів їхнього цвітіння спостерігались у 2011 і 2015 рр., коли середньомісячна температура повітря порівняно з 1992 р. зросла з 9,8 °С до 12,2 °С.

Рис. 1. Сезонна динаміка цвітіння генеративних особин у популяціях *Rumex carpaticus* Zapał.

Відтак, активація генерування популяцій видів зумовлена їхньою реакцією на зміну температурних умов упродовж різних періодів вегетації. Про істотний вплив потепління на процеси сезонного розвитку популяцій і рясність їхнього цвітіння свідчить збільшення чисельності генеративних особин, частка яких зросла у 2-3 рази. Це позитивно вплинуло на розселення та розширення популяційних меж значної низки різнотравно-лучних видів високогір'я. Динаміка чисельності генеративних особин показана на прикладі популяцій *Valeriana tripteris*, *V. simplicifolia*, *Thymus alpestris*, *Antennaria dioica* (рис. 2). Характерною ознакою є поява нових популяційних локусів, насамперед на відкритих ділянках високогір'я з достатньою інсоляцією та відсутністю чагарниково-деревних заростей. Формування новоутворених локусів зумовлено ефективним розселенням насіння та його проростанням у сприятливих мікрооселищах на значно вищих гіпсометричних рівнях високогір'я (1600–2000 м н. р. м.).

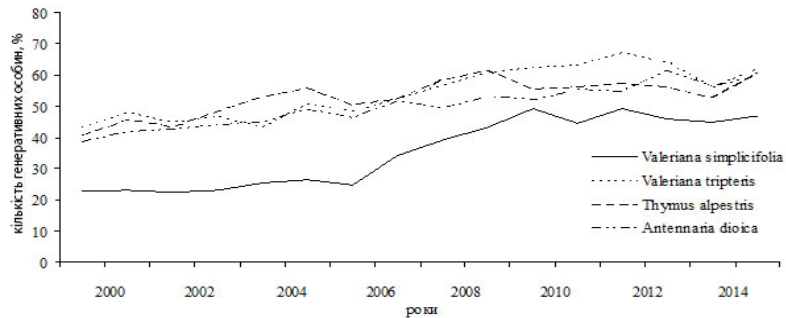


Рис. 2. Динаміка чисельності генеративних особин у популяціях різнотравно-лучних видів

Поява нових популяційних осередків відображає позитивну тенденцію відновлення популяцій, спрямовану на розширення їхніх площ. Дослідженнями, проведеними на моніторингових ділянках, виявлено значне зростання ефективності приживання насінневих проростків. Зокрема, в популяціях *Valeriana simplicifolia*, *V. tripteris*, *V. transsilvanica*, *Rumex carpaticus*, *Thymus alpestris*, *Euphorbia carniolica*, *Laserpitium krapfii*, *Silene dioica* упродовж останнього періоду досліджень (2013–2018 рр.) їхня чисельність зросла від 10 (15) екз./м² до 35 (40) екз./м². Важливою рисою активного відновлення популяцій є розвиток їхніх локальних осередків на верхніх рослинних поясах високогір'я. Наприклад, новоутво-

рені оселища популяції *Valeriana simplicifolia*, які зазвичай трапляються в нижніх гірських котлах (1200–1340 м н. р. м.), виявлено на значно вищих рівнях високогір'я (1400–1500 м н. р. м.) в урочищах гір Данцера, Пожижевської, Брескула та ін. Чорногірського масиву. Динаміка розвитку одного з таких локусів в урочищі Брескул-Пожижевська представлена на рис. 3. Багаторічні спостереження новоутвореного в 2010 р. локусу площею 3,6 м² показали позитивну динаміку чисельності генеративних особин і поступове розширення меж за рахунок їхнього відцентрового розростання. Рясність цвітіння генеративних особин характеризується найбільшим піком у 2013 р., трохи меншим – у 2012 і 2016 рр. Відтак, динаміка флуктуаційних змін у чисельності особин чітко скорельована з показниками температурного режиму в різні сезони вегетації. Активність їхнього розвитку зумовлена кількістю бруньок відновлення, які закладаються восени попереднього сезону, зокрема, в період, коли середньомісячна температура повітря у 2012 р. піднялася до 12,7 °С, а максимальна липня – до 26,0 °С.

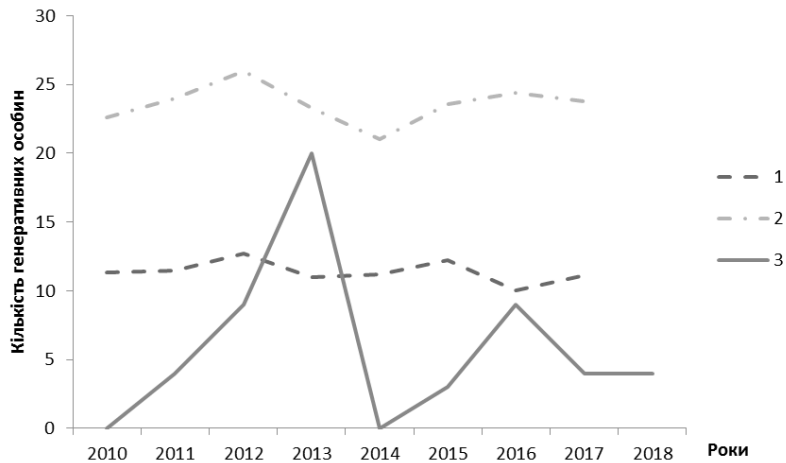


Рис. 3. Динаміка чисельності генеративних особин в новоутвореному локусі *Valeriana simplicifolia* (Reichenb.) Kabath.: 1 – середньомісячна температура повітря, °С; 2 – максимальна температура повітря (липень), °С; 3 – кількість генеративних особин

Подібна тенденція до появи нових популяційних осередків та їхнього поширення у високогір'ї на різних ділянках висотного профілю є характерною для популяцій *Astrantia major*, *Silene dioica*, *Senecio subalpinus*, *Rumex carpaticus*, *Valeriana transsilvanica*, *V. tripteris*, *Doronicum carpaticum*, *Cardamine amara* L., *Epilobium hirsutum* L. та ін. Зокрема, деякі локуси популяцій *Silene dioica* і *Astrantia major* виявлено на раніше не заселених ними ділянках лучних угруповань верхнього субальпійського поясу (1500–1600 м н. р. м.), а у видів приджерельних угруповань *Valeriana transsilvanica*, *Doronicum carpaticum*, *Cardamine amara* L., *Epilobium hirsutum* та ін. – на верхній межі альпійського поясу (1800–1900 м н. р. м.).

Однак із пришвидшенням відновних процесів, що підсилюються кліматичними змінами у високогір'ї, зростає активність поширення й деревно-чагарникової рослинності (*Alnus viridis* (Chaix) Opiz, *Pinus mugo* Turra, *Salix silesiaca* Willd., *Juniperus sibirica* Bungs., *Picea abies* (L.) Karst. тощо), чагарничків (*Vaccinium myrtillus* L., *Vaccinium vitis-idaea* L., *Rubus idaeus* L.) й адвентивних представників високотрав'я. Відтак, в оселищах популяцій багатьох видів трав'яних рослин і, зокрема, в субальпійському поясі та на верхній межі лісового мають місце значні процеси заростання, внаслідок яких відбувається поступове

витіснення видів, характерних для лучних угруповань. Зміна еколого-ценотичних умов у різних рослинних угрупованнях уздовж висотного градієнта високогір'я зумовлюють різну специфіку існування популяцій видів трав'яних рослин і їхню неоднакову просторову диференціацію. Наприклад, у популяціях *Valeriana transsilvanica*, *V. tripteris*, *V. simplicifolia*, *Doronicum carpaticum*, *Euphorbia carniolica*, *Rumex carpaticus* та ін., які за сприятливих еколого-ценотичних умов (зокрема, за достатньої вологості й інсоляції) відзначалися високою щільністю особин через активне заростання *Alnus viridis*, зазнали значних змін. Чисельність і щільність особин порівняно з попередніми роками (1992–2000) зменшилась у два рази. Унаслідок зростання фітоценотичної ролі конкурентних видів і погіршення умов існування видів значно знизилася показники репродуктивної здатності популяцій і посилюється тенденція до їхньої просторової фрагментації. Через щільне заростання оселищ деревно-чагарниковою рослинністю і зменшення інсоляції найбільших змін зазнає генеративна сфера. Диференціація популяційних локусів і чисельність генеративних особин у різних еколого-ценотичних умовах та на різних гіпсометричних рівнях високогір'я показані на прикладі *Valeriana transsilvanica* (див. таблицю).

Зміна показників генеративної здатності
в локусах популяцій *Valeriana transsilvanica* Schur

Умови	Кількість генеративних особин, шт./м ²	Кількість квітів на особині, шт.	Насіннєва продуктивність, шт./ос.
Відкриті лучні ділянки (1700–1800 м н. р. м.)	9,8±0,5	244	105,3
Частково зарослі <i>Alnus viridis</i> лучні ділянки (1500–1600 м н. р. м.)	7,5±0,4	198	89,5
Зарості <i>Alnus viridis</i> (1300–1400 м н. р. м.)	3,0±0,2	160	62,0
Під наметом смерекового лісу (<i>Picea abies</i>), (1100–1200 м н. р. м.)	0,8±0,1	75	13,0

Найнижчі показники в популяціях *Valeriana transsilvanica* спостерігаються в умовах суцільних заростей *Alnus viridis* (1300–1400 м н. р. м.) та під наметом смерекового лісу (1000–1200 м н. р. м.). Зокрема, *Alnus viridis* активно вклинюється з лісового й нижнього субальпійського поясів у популяції лучних видів і проявляє тенденцію до розширення своїх площ. Характерною ознакою є активне заростання лучних угруповань високогір'я представниками більш конкурентоздатних високотравних видів (*Chamaenerion angustifolium* (L.) Holub, *Senecio nemorensis* Moench, *Filipendula denudate* (L. et C. Presl) Fritsch, *Cirsium waldsteinii* Ronu, *Rumex alpinus* L., *Urtica dioica* L. та ін.). Назагал, така ситуація є особливо негативною для популяцій лучних геліофільних видів майже в усіх районах високогір'я, внаслідок якого посилюється просторова диференціація популяцій і поступова їхня деградація. Негативні тенденції зумовлюють поступове зникнення популяційних осередків в оселищах, що раніше слугували місцем їхнього трапляння. В умовах суцільних чагарникових заростей популяції видів втрачають здатність до генерування та подальшого відновлення. Характерною рисою є деградація популяцій видів трав'яних рослин, які мають вигляд фрагментів із незначною кількістю особин. Процеси заростання, зумовлені незакінченою відновною сукцесією у високогір'ї, є особливо характерними для заповідних територій після припинення випасу. Найбільше це стосується популяцій видів лучних фітоценозів, які містяться в нижніх рослинних поясах високогір'я та зазнають значних змін унаслідок заростання й збільшення щільності високотравних і чагарникових ценозів, що має безпосередній вплив на їхню демографічну й просторову структури та, в першу чергу, на здатність до розселення і відновлення.

Таким чином, встановлено, що сучасні трансформаційні процеси, які відбуваються в популяціях видів трав'яних рослин високогір'я, мають неоднозначний вплив на їхню здатність до відновлення та характер змін у структурній організації. У кожному конкретному випадку динаміку популяцій визначають вплив кліматично-демутаційних змін і їхня приуроченість до конкретних еколого-ценотичних умов існування вздовж висотного градієнта поясності високогір'я. Здатність популяцій до відновлення, ініційованого кліматичними змінами в умовах потепління, є можливою лише за умов перебування їхніх оселищ у сприятливих еколого-ценотичних умовах. За сприятливих еколого-ценотичних умов спостерігається позитивна динаміка популяцій, зумовлена збільшенням чисельності генеративних особин, інтенсивністю їхнього цвітіння та зростанням ролі насінневого розмноження у їхньому самопідтриманні. Пришвидження темпів фенологічного розвитку внаслідок потепління зумовлює в популяціях багатьох видів активацію генеративного розмноження та їхню здатність до розселення. Багаторічна динаміка чисельності генеративних особин характеризує сучасний стан популяцій і їхню залежність від метеоумов, що є важливим інформаційним показником змін умов існування. У відновленні популяцій видів спостерігаються процеси, пов'язані як із висхідним їхнім поширенням на різних гіпсометричних рівнях, так і з посиленням позицій популяцій видів, характерних для нижчих висот. В одних випадках динамічні тенденції в популяціях супроводжуються збільшенням чисельності особин і розширенням їхніх меж, а в інших зміни мають протилежний характер, що пов'язано зі зменшенням чисельності популяцій та їхньою фрагментацією.

Відтак, заходи охорони та збереження популяцій мають бути диференційованими залежно від приуроченості популяційних локалітетів до різних умов середовища існування. Для природного відновлення популяцій необхідно забезпечити збереження тих популяційних локусів, які перебувають у зоні ризику та вирізняються ознаками деградації. Заходами з оптимізації та регулювання стану популяцій могло би бути використання біотехнічних методів (викошування трав і розрідження деревно-чагарникового ярусу). Це дало би змогу покращити еколого-ценотичну ситуацію в їхніх оселищах і підвищити здатність до поновлення.

Матеріали містять результати досліджень грантової підтримки державного фонду фундаментальних досліджень за конкурсними проектами № Ф 76/81 – 2017 і № Ф76/9 – 2018.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Бигон Н. М., Харпер Дж., Траунсенд К.* Екологія. Особи, популяції, сообщества. М.: Мир, 1989. Т. 1. 477 с.
2. *Грейг-Смит П.* Количественная экология растений. М.: Мир, 1967. 359 с.
3. *Дідух Я. П.* Екологічні аспекти глобальних змін клімату: причини, наслідки, дії // Вісн. НАН України. 2009. № 2. С. 34–44.
4. Динаміка ценопопуляцій трав'янистих рослин: сб. науч. тр. / К.А. Малиновский (отв. ред.) и др. К.: Наук. думка, 1987. 128 с.
5. *Дмитрах Р. І.* Завдання і методи досліджень статеві диференціації популяцій трав'яних видів рослин // Наукові основи збереження біотичної різноманітності: наук. щорічн. зб. ін-ту екології Карпат НАН України. Львів. 2003. Т. 4 (11). № 1. С. 21–28.
6. *Дмитрах Р. І.* Генеративне розмноження високогірних видів рослин та особливості насінневого відновлення їх популяцій в Українських Карпатах // Наук. вісн. НЛТУ України. 2009. Вип. 20. № 9. С. 45–51.

7. Дмитрах Р. І. Самовідновлення популяцій різностатевих видів рослин у мінливих умовах природного й антропогенного середовища // Наук. вісн. НЛТУ України. 2012. Вип. 22. № 13. С. 76–81.
8. Злобин Ю. А. Принципы и методы изучения ценопопуляций растений. Казань: Казанский гос. ун-т, 1984. 146 с.
9. Злобин Ю. А. Популяционная экология растений: современное состояние, точки роста. Сумы: Университетская книга, 2009. 263 с.
10. Злобин Ю. А., Скляр В. Г., Клименко А. А. Популяции редких видов растений: теоретические основы и методика изучения. Сумы: Университетская книга, 2013. 49 с.
11. Єремєєв В. М. Регіональні аспекти глобальної зміни клімату // Вісн. НАН України. 2003. № 2. С. 24–28.
12. Казначеев В. П. Современные аспекты адаптации. Новороссийск: Наука, 1980. 192 с.
13. Клейн Р. М., Клейн Д. Г. Методы исследований растений. М.: Колос, 1974. С. 190–192.
14. Кобів Ю. Й. Глобальні кліматичні зміни як загроза видовій біорізноманітності високогір'я Українських Карпат // Укр. ботан. журнал. 2009. Т. 60. № 4. С. 451–465.
15. Малиновський К. А., Царик Й. В., Жилияєв Г. Г. та ін. Структура популяцій рідкісних видів флори Карпат / за ред. К.А. Малиновського. К.: Наук. думка, 1998. 176 с.
16. Механізми самовідновлення популяцій / за ред. Й.В. Царика. Львів: СПОЛОМ, 2014. 216 с.
17. Миркин М. О. О типах эколого-ценотических стратегий у растений // Журн. общ. биологии. 1983. Т. 44. № 5. С. 603–613.
18. Одум Ю. Экология. М.: Мир, 1986. Т. 2. 376 с.
19. Работнов Т. А. Изучение флуктуаций (разногодичной изменчивости) фитоценозов // Полевая геоботаника. Л., 1972. Т. 4. С. 95–136.
20. Работнов Т. А. Фитоценология. М.: Изд-во МГУ, 1983. 296 с.
21. Работнов Т. А. Экспериментальная фитоценология. М.: Изд-во МГУ, 1987. 160 с.
22. Риклефс Р. Основы общей экологии. М.: Мир, 1979. 424 с.
23. Царик Й., Жилияєв Г., Кияк В. та ін. Внутрішньопопуляційна різноманітність рідкісних, ендемічних і реліктових видів рослин Українських Карпат. Львів: Поллі, 2004. 198 с.
24. Царик Й., Кияк В., Дмитрах Р., Білонога В. Генеративне розмноження популяцій рослин високогір'я Карпат як ознака їх життєздатності // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2004. Вип. 36. С. 50–56.
25. Царик Й., Жилияєв Г., Кияк В. та ін. Життєздатність популяцій рослин високогір'я Українських Карпат / за ред. Й. Царика. Л.: Меркатор, 2009. 172 с.
26. Шульц Т. Э. Общая фитоценология. Л.: Наука, 1981. 188 с.
27. Baeten L., De Frenne P., Verheyen K. et al. Forest herbs in the face of global change: a single-species-threats approach for *Anemone nemorosa* // Plant Ecol. Evol. 2010. Vol. 143. N 1. P. 19–30.
28. Gynda L., Bilonoga V., Dmytrakh R. et al. Impact of climate of climate change on the biodiversity of rare and protected vascular plant occurring in high mountain areas of the Ukrainian Carpathians. Biogeography of the Carpathians: Ecological and evolutionary facets of biodiversity // Studia Universitatis Babeş-Bolyai (Romania). Biologia, 2017. Vol. 62 (LXII), Sp. Iss. P. 117–118.
29. Grabbherr G., Gottfried M., Pauli H. Climate effects on mountain plants // Nature. 1994. 369. P. 443–448.
30. Grime J. P. Plant strategies and vegetation processes. N.Y., 1979. 222 p.

31. *Harper J. L.* Population biology of plants. L.; N. Y.: Acad. Press, 1977. 892 p.
32. *Hedl R., Buřivalova L.* Alpínska vegetace v karech Popa Ivana. Liva, 2008. Vol. 56. P. 210–213.
33. *Herben T., Krahulec F., Hadinbcova V., Pecháčková S.* Climatic variability and grassland community composition over 10 years: separating effects on module biomass and number of modules // *Funct. Ecol.* 1995. Vol. 9. P. 767–773.
34. *Hughes L.* Biological consequences of global warming: is the signal already apparent? // *Trends Ecol. Evol.* 2000. Vol. 15. P. 56–61.
35. *Kobiv Y.* Response of rare alpine plant species to climate change in the Ukrainian Carpathians // *Folia Geobot.* 2017. Vol. 52. P. 217–226.
36. *Körner C.* Alpine plant life: functional ecology of high mountain ecosystems. 2nd ed. Berlin; Heidelberg, 2003. 344 p.
37. *Кычак В., Билонга В., Дмитрах Р.* et al. Trends in plant population pattern changes under natural and man-induced ecosystem transformations of the high mountain zone in the Ukrainian Carpathians // *Біологічні студії / Studia Biologica.* 2015. Т. 9. № 2. С. 169–180.
38. *Rees M., Kelly D., Bjornstand O. N.* Show tussocks, chaos and the evolution of mast seeding // *Am. Nat.* 2002. Vol. 160. N 1. P. 44–59.

Стаття: надійшла до редакції 26.02.19

доопрацьована 27.06.19

прийнята до друку 04.07.19

THE INFLUENCE OF CLIMATIC CHANGES ON HERBACEOUS PLANTS SPECIES' POPULATIONS IN CURRENT CONDITIONS OF HIGH-MOUNTAIN ZONE OF THE UKRAINIAN CARPATHIANS

R. Dmytrakh

Institute of Ecology of the Carpathians, NAS of Ukraine

4, Kozelnytska St., Lviv 79026, Ukraine

e-mail: ecotusika@gmail.com

It has been established that natural plant populations in the Ukrainian Carpathians have undergone significant changes in recent years due to the influence of climatic factors and the growth of the activity of restorative processes. Investigation of the influence of these factors on the population of species of herbaceous plants is particularly relevant in mountain ecosystems and, in particular, in protected areas. As a result of the gradual regeneration of indigenous vegetation, mountain ecosystems undergo characteristic changes in the structural and spatial organization of populations of many types of herbaceous plants, their displacement of high-altitude zonation and increased participation in successions of shrubs and adventitious representatives of grassland. This leads to different possibilities of adaptation and functioning of populations of species of herbaceous plants in high mountains under changed environmental conditions and their ability to recover. Long-term monitoring in species populations has shown that, in some cases, the growing number of species characterized by an active recovery strategy and its direction for further expansion of borders, while in others, have the opposite character, which is associated with the inability to adapt and survive in changed conditions the environment. It has been established that the vegetative development of populations of species of herbal plants is closely related to the regime of temperature conditions in highlands, which affects the nature of the passage of phenophases,

the dynamics of the number of individuals and the rhythm of their flowering. The growth of temperature indices stimulates the activation of population generation and their ability to recover. With the acceleration of phenomenal development, there are changes that determine the increase in the percentage of flowering individuals, their seed productivity and distribution at significantly higher hypsometric levels of highlands. However, it has been found that the settlement and the emergence of new population loci in populations of herbaceous species are characteristic of open-plots with insolation and insects that are not overgrown with woody shrub species. In the case of a negative effect of shading and overgrown population, signs of degradation are acquired, which leads to a decrease in their spatial and demographic characteristics and the ability to recover. The main reason for the changes in the structure of the populations is the inability to compete in the conditions of invasion of the species of the shrub-tree, the adventitious representatives of the grassland and to adapt to changing environmental conditions. Accordingly, in the restoration of species populations there are processes that are associated with ascending their spread at different hypsometric levels, and with the strengthening of the positions of populations of species that are characteristic of lower heights. In some cases, the dynamic trends in populations are accompanied by an increase in the number of individuals and the expansion of their boundaries, while in others, the changes have the opposite character, which is associated with a decrease in the number and fragmentation.

Keywords: climatic changes, phenology of flowering, generative ability, dynamic trends, restore in populations

НАКОПИЧЕННЯ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ РОСЛИНАМИ *S. VIMINALIS* ЗА РОСТУ НА СУБСТРАТІ ЗІ СТЕБНИЦЬКОГО ХВОСТОСХОВИЩА

А. Фецюх, Л. Буньо, О. Пацула, О. Терек

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

На північно-східній околиці м. Стебника розташоване хвостосховище, яке містить 22 млн т відходів, серед них і важкі метали (ВМ). Відходи спричиняють засолення підземних вод, водоймищ і прилеглих територій. У статті розглянуто питання забруднення території Стебницького хвостосховища хімічними елементами різного класу небезпеки. Визначено вміст ВМ у субстраті до та після 30-добового росту *Salix viminalis* L. Показано перевищення вмісту кадмію, стронцію та феруму щодо ГДК. Перевищення кларку помічено у свинцю, міді, цинку, цирконію (лише в контролі), стронцію та мангану. Вирощування *S. viminalis* впливало на вміст деяких ВМ у субстратах. Помічено значне зменшення вмісту феруму в дослідному субстраті, порівняно з початковим вмістом, тобто перед висадженням рослин. Екологічну інформативність вмісту ВМ оцінювали за еколого-геохімічними коефіцієнтами. Найвищий коефіцієнт концентрації був у кадмію, який значно перевищував середній вміст елемента в орних землях України, та молібдену. Небезпека забруднення ґрунту тим більша, чим суттєвіше значення коефіцієнта безпеки перевищує 1. Для таких елементів як кадмій і залізо у субстраті з дослідної та контрольної ділянок дані коефіцієнта безпеки перевищували 1. За сумарним показником забруднення субстрат зі Стебницького хвостосховища за вмістом ВМ належить до III категорії забруднення. Поліелементне забруднення субстрату зі хвостосховища, згідно з індексом забруднення ґрунту (ІЗГ), було однаковим до росту рослин, а після – показник зменшився у досліді.

Найбільша кількість ВМ акумулювалась у коренях рослин. Особливо активно рослини *S. viminalis* акумулювали молібден, стронцій, хром і цинк. Дослідження біогеохімічної активності рослин виявили, що вони мають високу здатність накопичувати ВМ. Найменший показник накопичення був у стеблах і коренях контрольних рослин порівняно з дослідними. Слід звернути увагу, що дані мають вищі значення, ніж 5-10, що свідчить про те, що територія Стебницького хвостосховища характеризується техногенним навантаженням. Незважаючи на підвищені концентрації ВМ, рослини *S. viminalis* проявили високу стійкість до умов вирощування.

Ключові слова: важкі метали, *Salix viminalis* L., коефіцієнт біологічного накопичення, забруднення, токсичність

Важкі метали – одні з найшкідливіших забруднювачів навколишнього середовища, бо, на відміну від забруднювачів органічної природи, вони не розкладаються, а трансформуються та перерозподіляються між компонентами екосистеми [30]. Забруднення ґрунтів ВМ викликає глобальний інтерес у зв'язку з підвищенням техногенного впливу на навколишнє природне середовище [16]. Видобуток і переробка корисних копалин – одні з найбільш потужних видів техногенезу. За відсутності надійної технології або недотримання технологічного циклу частину цінного компонента скидають у хвости збагачення. В Україні використовується єдиний спосіб утилізації відходів – складування. Площі, які зайняті відвалами порід і відходами первинного збагачення, досить значні. На цих ділянках формуються особливі техногенні ландшафтно-геохімічні системи – гірничопромислові ланд-

шафти [15]. Хвостосховища – техногенні родовища корисних копалин [19]. При цьому виникає небезпека міграції ВМ зі хвостосховищ у ґрунт і водойми.

У Прикарпатському регіоні України розташоване родовище полімінеральних калійних руд сульфатного типу [18]. Нераціональна переробка руд у калійні добрива спричинила утворення 22 млн т відходів на 140 га землі. У хвостосховище скидали неперероблену руду, пісок, глинисті матеріали, ропу, яка містила залишки калійних солей, у тому числі й важкі метали [23]. Більш ніж двохсотрічний розвиток видобувної та гірничо-переробної промисловості зумовив істотне забруднення екосистем ВМ [51].

Забруднення ґрунту ВМ негативно впливає на фізіолого-біохімічні процеси, що відбуваються у рослинах [4]. На сьогодні актуальним є вивчення впливу ВМ на адаптаційні можливості рослин [22]. Для дослідження використовують дерева різних родів: *Salix*, *Betula*, *Populus*, *Alnus* та *Acer*. Проте з метою фітомеліорації більшість уваги приділяють швидкоростучим видам, наприклад, таким як *Salix* sp. [55]. Відомо, що ці рослини здатні акумулювати значні кількості ВМ за рахунок високого відсотка сірковмісних білків [46]. ВМ спричиняють зниження біомаси у багатьох деревних рослин, проте рослинам верби прутоподібної (*Salix viminalis* L.) притаманно зберігати темпи росту за умов наявності цих поллютантів у середовищі [39].

На сьогоднішній день вивчено накопичення ВМ у стеблах і коренях рослин *S. viminalis* [32, 40, 44, 47, 49, 50], вплив ВМ на листки рослин *S. viminalis* [39], продуктивність біомаси *S. alba* та *S. viminalis* [48] і фітореMediaційну функцію рослин *S. viminalis* [37, 38, 41]. Ці дослідження проводилися під час вирощування рослин на сміттєзвалищах, на ґрунтах, забруднених ВМ, стічними водами, а також на вапнякових і кислих ґрунтах.

Досліджень нагромадження ВМ рослинами *S. viminalis* за росту на хвостосховищі м. Стебник не проводили. Тому метою наших досліджень було вивчити накопичення ВМ органами рослин *S. viminalis* за росту на субстраті Стебницького хвостосховища.

Матеріали та методи

Дослідження проводили в лабораторних умовах. У посудини об'ємом 3 л насипали по 2,5 кг субстрату, відібраного зі хвостосховища м. Стебник. В екологічних дослідженнях як контроль прийнято вважати той самий тип ґрунту, але без забруднень. Оскільки ми використовували не ґрунт, а засолений субстрат, то для контролю відбирали субстрат у місцях відновлення біоценозу (49°18'39.8"N 23°33'59.3"E; 49°18'40.0"N 23°34'00.7"E; 49°18'41.1"N 23°33'57.7"E). Субстрат, де росли тільки піонерні глікогалофіти, використовували як дослідний (49°18'45.0"N 23°34'07.7"E; 49°18'43.8"N 23°34'07.8"E; 49°18'43.3"N 23°34'07.4"E). Відбір субстрату здійснювали згідно з ГОСТ 17.4.4.02-84. В одну посудину висаджували по 5 вкорінених живців завдовжки 25±2 см і діаметром 0,8±0,2 см з довжиною коренів 2±0,5 см. Субстрат поливали дистильованою водою. Живці вирощували протягом 30 дб. Повторюваність дослідів 5-кратна.

Екологічну інформативність отриманих значень фонового вмісту важких металів оцінювали за еколого-геохімічними коефіцієнтами, які висвітлюють особливості ландшафтних процесів міграції важких металів кларками концентрації (КК) і коефіцієнтами концентрації (Кс) [17].

Оцінку техногенного навантаження проводили за Ю.Є. Састом, визначаючи коефіцієнти безпеки (K_0) та концентрації (Кс) і сумарний показник забруднення (Z_c) [24].

Коефіцієнт безпеки (K_0) визначали за формулою:

$$K_0 = C / \text{ГДК},$$

де С – фактичний рівень вмісту речовин у ґрунті;

ГДК – гранично допустима концентрація.

Коефіцієнт концентрації металу (Кс) визначали за відношенням реального вмісту хімічного елемента у ґрунті (Са) до фонового вмісту цього ж елемента (Сф) в середовищі:

$$K_c = C_a / C_f$$

Кс свідчить про активність процесів вилуговування ($K_c < 1$) і накопичення ($K_c > 1$) хімічних елементів у ґрунті.

Сумарний показник забруднення Z_c обчислювали за формулою:

$$Z_c = \sum_{i=1}^n K_{c_n}$$

де Кс – коефіцієнт концентрації металу,

n – число елементів.

Оцінювали рівень забруднення за Z_c (табл.1).

Таблиця 1

Орієнтовна шкала оцінки небезпеки забруднення ґрунтів за сумарним показником забруднення (Z_c) [5]

Категорія забруднення ґрунтів, R	Значення, Z_c
I категорія (допустима)	<16
II категорія (помірно небезпечна)	16-32
III категорія (небезпечна)	32-132
IV категорія (надзвичайно небезпечна)	>128

Нормування поелементного забруднення ґрунту ВМ проводили за методикою В.В. Снакіна [25] та ґрунтово-екологічних принципів, які відкидають імовірність знаходження поодиноких значень для всіх ґрунтів [8]. Поліелементне нормування здійснювали за оцінкою індексу забруднення ґрунту (ІЗГ). Показник ІЗГ дає змогу порівнювати результати, отримані на різних територіях.

Розрахунок ІЗГ здійснювали за спрощеною схемою, запропонованою М.О. Богдановим [6]:

$$I_{3G} = \sum_{i=1}^n \left(\frac{C_i}{C_{ГДК}} \right) / n = \sum_{i=1}^n (K_{Б}) / n$$

де C_i – концентрація ВМ у ґрунті конкретно взятої ділянки, мг/кг;

$C_{ГДК}$ – ГДК ВМ у ґрунті, мг/кг;

n – число елементів.

Вміст ВМ визначали на спектрометрі СТЭ-1 з вугільними електродами у полум'ї суміші ацетилен-повітря [2]. Тип ВМ – згідно з ГОСТ 17.4.1.02-83 [12]. Вміст ВМ у рослинах визначали в середній пробі. Середню пробу утворювали з 15 рослин. Проби повітряно-сухого рослинного матеріалу озолляли за температури 450 °С. Одержану золу після зважування розчиняли розведеною HNO_3 [20].

Для кількісної оцінки надходження токсичних мікроелементів із ґрунту в рослини застосовували коефіцієнт біологічного накопичення (КБН), який визначали за співвідношенням вмісту металу в одиниці маси акцептора (рослини) до донора (ґрунту):

$$K_n = \frac{C_p C_r}{C_r C_g}$$

де K_n – коефіцієнт біологічного накопичення;

C_p – вміст металу в рослині, мг/кг;

C_r – вміст металу в ґрунтовому покриві, мг/кг.

Для групування ВМ у рядах за інтенсивністю БН використано п'ять градацій [1].

Елементи біологічного накопичення (КБН > 1):

I група – КБН – 10n і більше – елементи енергійного накопичення (Cd, Cs, Rb);

II група – КБН – 10 – n – елементи сильного накопичення.

Елементи біологічного захвату (КБН < 1):

III група – КБН – 0,n – елементи слабого накопичення і середнього захвату (Zn, Mo, Cu, Pb, As, Co);

IV група – КБН – 0,0n – елементи слабого захвату (Mn, Ni, Cr);

V група – КБН – 0,00n і менше – елементи дуже слабого захвату (Se, Fe, Ba, Te).

Для кількісного виразу загальної здатності виду рослин до концентрації ВМ використовували біогеохімічний показник активності (БХА) виду [1], що являє собою сумарну величину, яку отримують від складання КБН окремих ВМ:

$$БХА = \sum КБН$$

Обробку отриманих результатів здійснювали з використанням методів математичної статистики.

Результати і їхнє обговорення

У результаті досліджень було виявлено, що в дослідному субстраті був більший вміст свинцю (на 33 %), міді (на 34 %), хрому (на 23 %), стронцію (на 60 %) і титану (на 20 %), порівняно з контролем (табл. 2). Як у контролі, так і в досліді спостерігали перевищення ГДК кадмію та заліза, а стронцію – лише у дослідному варіанті до вирощування рослин. Перевищення кларку помічено у свинцю, міді, цинку, цирконію (лише в контролі), стронцію та мангану.

Важливим є те, що *S. viminalis* є рослиною-ремедіантом і здатна поглинати деякі ВМ, а саме кадмій, нікель, цинк і мідь із ґрунту [29]. Вміст деяких ВМ у субстраті за росту верби знижувався, зокрема, вміст ванадію в дослідному варіанті зменшився в 1,6 разу, міді у 3 рази, цинку в 11 разів, цирконію в 1,3 разу, стронцію в 1,5 разу, титан в 1,7 разу, хрому та заліза в 1,3 і в 1,7 разу відповідно, а також помічено зниження вмісту нікелю в 1,5 разу, цирконію у 2 рази, стронцію в 1,2 разу в контрольному субстраті, порівняно з вихідним субстратом.

Таблиця 2

Вміст важких металів у субстраті з хвостосховища м. Стебник
(до і після вирощування рослин *S. viminalis*), мг/кг

Проба	Sn ²⁺	Cd ²⁺	Mo ³⁺	V ²⁺	Pb ²⁺	Cu ²⁺	Zn ²⁺	Zr ²⁺	Cr ³⁺	Ni ²⁺	Sr ²⁺	Mn ²⁺	Ti ⁴⁺	Fe ³⁺
К	9,22	19,63	6,17	40,25	10,29	20,16	70,43	600	8,11	15,24	600	1000	1600	50000
К+	±0,12 ±0,98	±0,45 ±2,31	±1,09 ±1,25	±1,87 ±20,36	±0,32 ±0,47	±45,16 ±6,23	±38,52 ±152,33							
Д	9,12	19,24	6,21	40,16	10,56	30,72	70,34	300	8,23	10,17	500	1000	1600	50000
Д+	±0,42 ±1,02	±0,94 ±1,57	±1,02 ±1,68	±1,46 ±32,48	±0,64 ±0,65	±56,32 ±22,68	±42,94 ±230,38							
ГДК ВМ, мг/кг [14]	Н.д.	3	н.д.	150	30	100	300	н.д.	100	85	1000	1500	н.д.	1500
Кларк, мг/кг [9, 11]	Н.д.	0,5	н.д.	100	10	20	50	300	75	40	300	850	4600	н.д.

Примітки: Н.д. – немає даних, К – контроль, Д – дослід, К+ – контроль після росту рослин, Д+ – дослідний субстрат після росту рослин

Різницю вмісту ВМ у субстратах Стебницького хвостосховища можна пояснити фітореMediaційними властивостями рослин *S. viminalis*. Отримані нами дані також свідчать про певні коливання фоновому вмісту ВМ у контрольному та дослідному субстратах зі хвостосховища.

Зважаючи на динамічні особливості розподілу і збалансування хімічних елементів у геохімічних ландшафтах, процеси міграції та відповідність екологічним нормам ранжовано за трьома категоріями: збалансованим станом і відповідністю екологічним нормам фоновому вмісту ВМ за КК і Кс від 0,5 до 1,5; інтенсивним розсіюванням за КК і Кс менше 0,5; інтенсивною концентрацією за КК і Кс понад 1,5. Кларки концентрації (табл. 3) розраховано щодо кларків ґрунтів світу [34] і кларків ґрунтів Європи [17]; коефіцієнт концентрації (табл. 4) – до ГДК та статистичних оцінок регіонального фону для орних земель України [33].

Таблиця 3

Кларки концентрації вмісту важких металів у субстраті зі хвостосховища м. Стебник
(до і після вирощування рослин *S. viminalis*)

Проба	Кларки концентрації фоновому вмісту важких металів у субстратах щодо кларків ґрунтів світу (чисельник) і Європи (знаменник)													
	Sn ²⁺	Cd ²⁺	Mo ³⁺	V ²⁺	Pb ²⁺	Cu ²⁺	Zn ²⁺	Zr ²⁺	Cr ³⁺	Ni ²⁺	Sr ²⁺	Mn ²⁺	Ti ⁴⁺	Fe ³⁺
К	2,31	56,09	5,14	0,45	0,86	0,67	0,78	1,50	0,12	0,30	2,40	1,00	0,32	1,25
К+	4,61	н.д.*	6,17	0,58	0,48	1,49	1,14	2,34	0,13	0,76	6,19	1,68	0,44	2,03
<i>S. viminalis</i>	2,28	54,97	5,18	0,45	0,88	1,02	0,78	0,75	0,12	0,20	2,00	1,00	0,32	1,25
Д	4,56	н.д.	6,21	0,57	0,49	2,27	1,13	1,17	0,13	0,51	5,15	1,68	0,44	2,03
Д+	2,33	54,69	5,35	0,45	1,28	1,01	0,78	0,53	0,15	0,20	6,00	1,00	0,40	1,25
<i>S. viminalis</i>	4,66	н.д.	6,42	0,58	0,71	2,25	1,13	0,82	0,16	0,51	15,46	1,68	0,55	2,03
Грунти світу [34]	2,23	55,89	5,28	0,28	1,72	0,34	0,08	0,40	0,12	0,20	4,00	1,00	0,24	0,75
Грунти Європи [17]	4,57	н.д.	6,33	0,36	0,96	0,75	0,11	0,63	0,13	0,51	10,31	1,68	0,33	1,22
Кларки ґрунтів, мг/кг														
Грунти світу [34]	4	0,35	1,2	90	12	30	90	400	70	50	250	1000	5000	40 000
Грунти Європи [17]	2	н.д.	1	70	21,5	13,5	62	256	63,5	20	97	597	3655	24 650

Примітки: Н.д. – немає даних, К – контроль, Д – дослід, К+ – контроль після росту рослин, Д+ – дослідний субстрат після росту рослин

Значення кларків концентрації, розрахованих нами фонових оцінок для субстрату зі Стебницького хвостосховища, свідчать про незрівноважений геохімічний стан і невідповідність екологічним нормам фоновому вмісту важких металів. Процеси інтенсивної концентрації (КК > 1,5) фіксуються до та після росту рослин у вмісті кадмію, молібдену і стануму, порівняно із фоновими оцінками зі світовими та європейськими кларками. Слід наголосити на значному перевищенні фоновому вмісту кадмію на 99 % щодо ґрунтів світу. Також помічено процеси інтенсивної концентрації міді, цинку, мангану та феруму щодо ґрунтів Європи. Решта даних відповідає збалансованому стану й екологічним нормам фоновому вмісту ВМ у субстраті хвостосховища.

Виявлено, що найвищий коефіцієнт концентрації (Кс) був у кадмію, який значно перевищував середній вміст елемента в орних землях України, та молібдену – на 59 %. Зважаючи на це, помічено інтенсивну концентрацію, оскільки спостерігається перевищення даних більш ніж у півтора разу. Усі розраховані фонові значення ВМ, для яких відоме ГДК, були нижчими. Це важливо, оскільки небезпека забруднення ґрунтів є тим вищою, чим вищий фактичний рівень вмісту речовин перевищує ГДК. Тобто небезпека забруд-

нення ґрунту тим вища, чим більше значення коефіцієнта безпеки (K_6) перевищує 1. Для таких елементів як кадмій і залізо у субстраті з дослідної та контрольної ділянок дані перевищували 1 (табл. 5). Коефіцієнт безпеки (K_6) для кадмію у контрольному субстраті дорівнював 6,54, а для дослідного – 6,38; для заліза у контролі та досліді він був однаковим і становив 33,33; K_6 стронцію у дослідному варіанті становив 1,50, у контрольному – 0,60. Також меншим 1 K_6 був і для ванадію, свинцю, міді, цинку, хрому, нікелю та мангану.

Таблиця 4

Коефіцієнт концентрації фонового вмісту важких металів відносно ГДК у субстраті з хвостосховища м. Стебник (до і після вирощування рослин *S. viminalis*)

Проба	Коефіцієнти концентрації фонового вмісту важких металів у ґрунтах ландшафтів щодо ГДК (чисельник) і орних земель України (знаменник)													
	Sn ²⁺	Cd ²⁺	Mo ³⁺	V ²⁺	Pb ²⁺	Cu ²⁺	Zn ²⁺	Zr ²⁺	Cr ³⁺	Ni ²⁺	Sr ²⁺	Mn ²⁺	Ti ⁴⁺	Fe ³⁺
К	Н.д.*	Н.д.	Н.д.	0,27	0,51	Н.д.	0,83	Н.д.	0,08	0,61	Н.д.	0,67	Н.д.	Н.д.
К+	2,56	115,47	3,86	0,59	0,59	1,39	1,39	1,49	0,11	0,58	6,12	1,59	0,42	2,21
Д	Н.д.	Н.д.	Н.д.	0,27	0,53	Н.д.	0,83	Н.д.	0,08	0,41	Н.д.	0,67	Н.д.	Н.д.
Д+	2,53	113,18	3,89	0,58	0,61	2,12	1,39	0,74	0,11	0,39	5,09	1,59	0,42	2,21
ГДК ґрунтів [26]	Н.д.	Н.д.	Н.д.	0,27	0,77	Н.д.	0,83	Н.д.	0,10	0,40	Н.д.	0,67	Н.д.	Н.д.
Середній вміст у ґрунтах орних земель України [17]	Н.д.	Н.д.	Н.д.	0,17	1,03	Н.д.	0,08	Н.д.	0,08	0,41	Н.д.	0,67	Н.д.	Н.д.
	2,54	115,06	3,96	0,37	1,19	0,69	0,14	0,39	0,11	0,39	10,19	1,59	0,32	1,33
ГДК ґрунтів [26]	Н.д.	Н.д.	Н.д.	150	20	Н.д.	85	Н.д.	100	25	Н.д.	1500	Н.д.	Н.д.
Середній вміст у ґрунтах орних земель України [17]	3,6	0,17	1,6	68,8	17,3	14,5	50,7	403,3	74,7	26,1	98,1	628,3	3772,1	22576,2

Примітки: Н.д. – немає даних, К – контроль, Д – дослід, К+ – контроль після росту рослин, Д+ – дослідний субстрат після росту рослин

За сумарним показником забруднення (Z_c) субстрат зі Стебницького хвостосховища за вмістом ВМ належить до III категорії забруднення у контролі (47,35) та досліді (64,44).

Під час оцінки екологічного стану ґрунтів перевищення значення ГДК можна розглядати як показник ступеня їхньої хімічної деградації. У результаті досліджень помічено перевищення ГДК таких елементів як кадмій, стронцій і ферум. Нормування поелементного забруднення ґрунту ВМ за методикою В.В. Снакіна свідчить про те, що ступінь деградації субстрату хвостосховища через забруднення кадмієм – 4, стронцієм – контрольний субстрат 0 ступінь, а дослідний – 1, ферумом – 3.

Таблиця 5

Коефіцієнти безпеки (K_6) Стебницького хвостосховища

	Cd ²⁺	V ²⁺	Pb ²⁺	Cu ²⁺	Zn ²⁺	Cr ³⁺	Ni ²⁺	Sr ²⁺	Mn ²⁺	Fe ³⁺
К	6,54	0,26	0,34	0,20	0,23	0,08	0,18	0,60	0,67	33,32
К+	6,41	0,27	0,35	0,31	0,23	0,08	0,12	0,50	0,67	33,32
Д	6,38	0,27	0,51	0,30	0,23	0,10	0,12	1,50	0,67	33,32
Д+	6,52	0,17	0,69	0,10	0,02	0,08	0,12	1,00	0,67	20,00

Примітки: К – контроль, Д – дослід, К+ – контроль після росту рослин, Д+ – дослідний субстрат після росту рослин

Нормування поелементного забруднення субстрату зі хвостосховища важких металів згідно з ґрунтово-екологічними принципами щодо кларків валової форми у ґрунтах і ГДК подано у табл. 6.

Показник ІЗГ дає змогу порівнювати результати, отримані на різних територіях, він фактично є інтегральним рівнем ГДК [31]. Поліелементне забруднення субстрату зі

хвостосховища згідно з ІЗГ (рис. 1) було однаковим у контрольних варіантах і дослідному варіанті до росту рослин, а після росту рослин показник зменшився на 32 % у дослідному варіанті.

Таблиця 6

Забруднення ВМ субстрату зі Стебницького хвостосховища
згідно із ґрунтово-екологічними принципами

Проба	Cd ²⁺		V ²⁺		Pb ²⁺		Cu ²⁺		Zn ²⁺		Zr ²⁺	Cr ³⁺		Ni ²⁺		Sr ²⁺		Mn ²⁺		Ti ⁴⁺	Fe ³⁺		
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Контроль	К	К	Б	Б	Б	Б	Б	Б	Б	Б	ПК	Б	Б	Б	Б	Б	3	Б	3	Б	К	К	К
К+	К	К	Б	Б	Б	Б	Б	Б	Б	Б	3	Б	Б	Б	Б	Б	Б	Б	3	Б	К	К	К
Дослід	К	К	Б	Б	Б	Б	Б	Б	Б	Б	3	Б	Б	Б	Б	ПК	3	Б	3	Б	К	К	К
Д+	К	К	Б	Б	Б	3	Б	Б	Б	Б	3	Б	Б	Б	Б	3	3	Б	3	Б	К	К	К

Примітки: 1 – щодо кларків валової форми у ґрунтах, 2 - валові форми у ґрунтах щодо ГДК, К – катастрофічна екологічна ситуація, Б – благополучна, ПК – передкризова, 3 – задовільна

Важкі метали під час надходження в організм верби поводять себе по-різному. Свинець, хром і мідь переважно нагромаджуються в коренях, а кадмій, нікель і цинк є більш мобільними та легко переміщуються в надземну частину [47]. Результати наших досліджень накопичення ВМ органами *S. viminalis* наведені у табл. 7. Серед досліджуваних ВМ найбільша кількість їх акумулювалась у коренях дослідних рослин, порівняно з іншими органами. У високій кількості акумулювалися молібден, мідь, манган і залізо, а також зріс вміст таких елементів як цирконій, хром і нікель щодо контролю. У стеблах верби підвищився вміст кадмію, молібдену, ванадію, свинцю, цирконію. Більшою мірою накопичувалися мідь (у 3 рази), стронцій (у 5 разів), титан і залізо (у 2 рази) щодо контролю. У листках рослин нагромаджувалися тільки молібден, цинк, цирконій, хром і титан. У роботі бельгійських науковців [45] представлено дані про сезонні коливання вмісту важких металів безпосередньо в біомасі рослин верби.

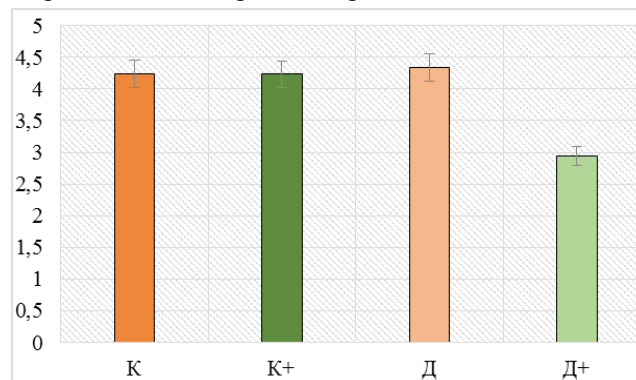


Рис. 1. Поліелементне нормування субстрату із Стебницького хвостосховища за оцінкою індексу забруднення ґрунту (ІЗГ): К – контроль, Д – дослід, К+ – контроль після росту рослин, Д+ – дослідний субстрат після росту рослин

Ступінь поглинання металів залежить від їхньої кількості, форми сполук, складу та властивостей ґрунту, виду рослин [3]. За швидкістю проникнення металів їх розподіляють таким чином: Cd>Pb>Zn>Cu>Mn>Fe, а за мобільністю в рослинах – Fe>Cu>Mn>Cd>Zn>Pb [7]. Найбільше ВМ накопичується у кореневій системі рослин, менше у стеблах і найменше – в репродуктивних органах. Ця закономірність зберігається і за збільшення концентрацій ВМ у ґрунті [11].

Надлишковий або токсичний рівень акумуляції міді, хрому та кадмію був у всіх органах рослин, свинцю – у листках контрольних рослин і стеблах дослідних рослин, цинку – в листках і стеблах двох варіантів, нікелю – в коренях дослідних рослин. Достатній або нормальний рівень акумуляції свинцю був у листках і коренях дослідних рослин *S. viminalis* та у стеблах і коренях контрольних рослин, цинку – в коренях двох варіантів рослин, нікелю – в листках і стеблах як контрольних, так і дослідних рослин.

Попередньо М.Л. Sander та Т. Ericsson (1998) показали збільшення концентрації цинку, міді, нікелю та кадмію у стеблах *S. viminalis*. В.П. Бессонова й І.А. Зайцева (2008) також відмітили зростання заліза, цинку, молібдену, міді та свинцю у листках цих рослин за умов техногенного забруднення різного походження. Було встановлено [47], що деревина рослин *S. viminalis* містила кадмію на порядок більше, ніж у ґрунті. Компартиментизація ВМ саме у деревині дає змогу використовувати її для довготривалої ремедіації ґрунту.

Таблиця 7

Вміст ВМ у органах рослин *S. viminalis* на 30-ту добу росту, мг/кг

Проба	Sn ²⁺	Cd ²⁺	Mo ³⁺	V ²⁺	Pb ²⁺	Cu ²⁺	Zn ²⁺	Zr ²⁺	Cr ³⁺	Ni ²⁺	Sr ²⁺	Mn ²⁺	Ti ⁴⁺	Fe ³⁺	
Листки	К	20,2	19,4	9,4	7,7	20,1	70,5	250,3	370,4	10,3	9,2	6000	1000	200	3000
	Д	±1,4	±1,6	±1,3	±0,6	±1,0	±4,3	±21,3	±43,6	±0,9	±0,4	±47,6	±56,3	±46,2	±124,6
Стебла	К	9,2	19,3	20,3	7,4	10,2	70,4	400,2	380,2	80,3	7,1	1500	1000	500	3000
	Д	±0,9	±1,4	±1,8	±0,5	±0,9	±5,1	±45,6	±23,8	±1,2	±0,06	±89,6	±78,2	±64,3	±473,2
Корені	К	17,6	19,2	8,6	7,6	6,8	40,6	200,2	30,1	6,2	4,3	1000	400	400	2000
	Д	±1,2	±1,7	±0,9	±0,4	±0,6	±3,2	±58,7	±2,6	±0,3	±0,6	±67,8	±73,2	±21,3	±211,8
ГДК	К	9,4	19,7	6,5	10,4	6,2	40,3	70,6	150,6	15,6	4,4	3000	90	2000	30000
	Д	±1,1	±1,6	±0,6	±0,3	±0,6	±2,8	±8,1	±124,6	±0,8	±0,3	±43,7	±12,3	±28,7	±231,2
ГДК	К	9,7	19,2	70,1	10,3	6,4	100,7	70,2	200,3	20,4	30,1	1000	1000	1200	50000
	Д	±1,0	±1,3	±1,8	±0,8	±0,7	±8,4	±7,3	±48,7	±0,4	±0,8	±97,5	±36,8	±23,4	±652,3
ГДК		≤0,5		≤10	≤10	≤100		≤10	≤30						

Примітки: К – контроль, Д – дослід

Фітотоксичність цинку відмічається багатьма авторами, особливо на кислих ґрунтах [35]. Появу ознак токсичності цинку в рослин відмічають за його вмісту у тканинах 200–500 мкг/кг сухої речовини [53]. У листках дослідних рослин вміст елемента сягав 400 мг/кг, у контрольних рослин 250 мг/кг, у стеблах контрольних рослин 200 мг/кг, а у дослідних рослин – 330 мг/кг. Але в коренях контрольних і дослідних рослин вміст був лише 70 мг/кг, що не перевищує даних ГДК (100 мг/кг).

Під час дослідження впливу іонів кадмію та цинку на різні клони рослин верби було встановлено, що деякі клони толерантні до обидвох металів, інші – лише до одного. Толерантні клони нагромаджували ВМ у діапазоні від 1 до 72 % [42]. Помічено значне нагромадження кадмію у стеблах дослідних рослин *S. viminalis* на 43 % щодо контролю.

Кількість міді, яка надходить до рослини, залежить від виду, можливостей материнської породи, а також від забруднення довкілля [43]. Мідь відіграє важливу роль у функціонуванні рослинних ферментів. Вміст міді, нижчий, ніж 2 мг/кг, є несприятливим для більшості рослин [52]. Надлишок міді шкідливий, як і його нестача. Отруєння рослин трапляється в місцях постійної фумігації для потреб захисту рослин. Це особливо стосується кислих ґрунтів [43]. У наших дослідженнях вміст міді в органах рослин значно перевищував ГДК. У листках контрольних і дослідних рослин вміст елемента був у 7 разів більшим за ГДК, у стеблах і коренях контрольних рослин – у 4 рази. Значний вміст міді помічено у стеблах дослідних рослин, що у 12 разів перевищує дані ГДК, та в коренях дослідних рослин – у 10 разів.

Якщо необхідність нікелю для рослин до теперішнього часу є дискусійним питанням, то токсичність високих його концентрацій очевидна. Для різних видів рослин діапазон токсичних концентрацій нікелю варіює у широких межах, а концентрації від надлишкового й токсичного його рівня змінюються від 10 до 100 мг/кг ґрунту. У рослин верби за росту на субстраті хвостосховища помічено надлишковий вміст елемента у стеблах дослідних рослин. Найбільша його концентрація була в коренях і становила в середньому $30,1 \pm 0,8$ мг/кг сухої маси. Це перевищувало контрольні показники на 85,4 %. Проте ці дані не перевищували рівень ГДК. Різними авторами показано, що вміст нікелю в різних видах рослин становить від 0,1–1,0 [15] до 81,1 мг/кг за критичної концентрації 3,0 мг/кг [28]. ГДК нікелю для рослин встановлена в межах 20,0–30,0 мг/кг сухої речовини, фітотоксична концентрація – 80,0–100,0 мг/кг [54].

Для рослин нормальна концентрація свинцю лежить у межах від 0,1 до 5,0 мг/кг сухої речовини, критична – 10 мг/кг [28]. Вміст свинцю у стеблах рослин *S. viminalis* на 79,6 % перевищував контрольні показники.

Концентрація хрому в рослинах корелює із вмістом його розчинних форм у ґрунті. Незважаючи на високий вміст у ґрунті, доступність хрому для рослин невелика [27]. Найбільше хрому накопичено у листках дослідних рослин *S. viminalis*, що перевищувало контрольні показники у 8 разів. Загалом результати досліджень показали, що вміст деяких ВМ (цинк, хром, мідь, свинець, кадмій) у рослинній сировині перевищує ГДК, а це свідчить про високий рівень акумуляції іонів металів. Нормування поелементного забруднення ВМ, згідно з ґрунтово-екологічними принципами щодо ГДК у *S. viminalis*, висвітлено у табл. 8.

Таблиця 8

Валові форми ВМ щодо ГДК у рослинних органах *S. viminalis*
згідно із ґрунтово-екологічними принципами

Проба		Cd ²⁺	Pb ²⁺	Cu ²⁺	Zn ²⁺	Cr ³⁺	Ni ²⁺
Листки	Контроль	К	К	К	К	Кр	Б
	Дослід	К	Кр	К	К	К	Б
Стебла	Контроль	К	Пк	К	К	К	Б
	Дослід	К	К	К	К	К	Б
Корені	Контроль	К	Пк	К	К	Кр	Б
	Дослід	К	Пк	К	К	К	К

Примітки: Кр – кризова екологічна ситуація, К – катастрофічна, Б – благополучна, Пк – передкризова, З – задовільна

Підсумовуючи дані, можемо стверджувати, що рослини *S. viminalis* за росту на засоленому субстраті з хвостосховища м. Стебник у найбільшій кількості акумулювали молібден, на другому місці стронцій, на третьому хром, а на четвертому – цинк (табл. 9). Згідно зі шкалою І.А. Авессаламова та В.В. Добровольського [1, 13], до елементів сильного накопичення (КБН>1) рослин *S. viminalis*, за росту на субстраті з хвостосховища були станум, кадмій, молібден, свинець, мідь, цинк, цирконій, хром, нікель, стронцій і титан. Елементами слабого накопичення (КБН<1) були ванадій, манган і залізо.

Здатність рослин акумулювати у своїй біомасі значну кількість ВМ пов'язана зі значним вмістом специфічних клітин, здатних надійно пов'язувати ці елементи, послаблюючи тим самим їхню токсичну дію та зберігаючи можливість репродукції інших клітин рослин.

У польових умовах дослідження *S. viminalis* встановлено коефіцієнт акумуляції ВМ на рівні 3,4. Таке значення коефіцієнта акумуляції дає позитивний результат очищення за умов невисокого рівня забруднення ґрунту. За високих концентрацій ВМ для того, щоб повністю очистити ґрунт до допустимих норм із такою акумуляцією необхідно 77 років,

а це практично неможливо, оскільки продуктивний вік верби становить близько 30 років [36].

Таблиця 9

Коефіцієнт біологічного накопичення ВМ рослин *S. viminalis*, вирощених на забрудненому субстраті з хвостосховища м. Стебник (30-та доба росту)

Проба	Sn ²⁺	Cd ²⁺	Mo ³⁺	V ²⁺	Pb ²⁺	Cu ²⁺	Zn ²⁺	Zr ²⁺	Cr ³⁺	Ni ²⁺	Sr ²⁺	Mn ²⁺	Ti ⁴⁺	Fe ³⁺	
Листки	К	2,19	0,99	1,52	0,19	1,95	3,49	3,55	0,62	1,27	0,60	10,00	1,00	0,13	0,06
	Д	±0,65	±0,23	±0,09	±0,52	±0,95	±0,22	±1,00	±0,24	±0,02	±0,03	±0,56	±0,72	±0,43	±0,25
Стебла	К	0,98	1,01	3,16	0,18	0,66	2,31	5,70	1,81	7,75	0,70	1,00	0,25	0,06	
	Д	±0,23	±0,42	±0,22	±0,07	±0,02	±1,01	±0,75	±0,24	±0,05	±0,15	±0,67	±0,34	±0,04	±0,45
Корені	К	1,03	0,98	1,39	0,19	0,66	2,01	2,84	0,05	0,76	0,28	1,67	0,40	0,25	0,04
	Д	±0,25	±0,45	±0,65	±0,01	±0,23	±0,98	±0,23	±0,01	±0,34	±0,07	±2,02	0±0,24	±0,53	±0,56
Корені	К	1,89	1,76	2,07	0,34	2,17	3,69	4,71	0,38	1,68	1,21	5,00	0,67	0,40	0,08
	Д	±0,33	±0,19	±0,09	±0,06	±0,57	±0,05	±0,41	±0,23	±0,57	±0,34	±0,85	±0,65	±0,22	±0,02
Корені	К	1,02	1,00	1,05	0,26	0,60	1,99	1,00	1,75	1,92	0,29	5,00	0,09	1,25	0,60
	Д	±0,80	±0,57	±0,25	±0,02	±0,06	±0,19	±0,04	±0,13	±0,24	±0,12	±0,12	±0,01	±0,32	±0,22
		±0,90	±0,72	±0,43	±0,04	±0,42	±0,07	±0,64	±0,82	±0,67	±0,06	±0,18	±0,20	±0,35	

Примітки: К – контроль, Д – дослід

На підставі отриманих даних про коефіцієнти біологічного накопичення для кількісного вираження загальної здатності рослинності до концентрації ВМ розраховано показник біогеохімічної активності (БХА) досліджуваних рослин. БХА, що характеризує інтенсивність поглинання елементів рослинами, становить 5–10 [10]. Чим вищі значення цього показника, тим більшим техногенним навантаженням характеризується територія. Оцінювання якості рослин за впливу ВМ тісно пов'язане з оцінюванням фізіолого-генетичних механізмів їхньої стійкості до ВМ [21].

Отримані значення показника БХА наведено на рис. 2. Найменший показник біогеохімічної активності мали стебла та корені контрольних рослин, на 52,68 % та 35,08 % відповідно щодо дослідних стебел і коренів. Решта варіантів мали вищі показники і були рівними. Слід звернути увагу, що дані мають вищі значення, ніж 5–10, а це свідчить про те, що територія Стебницького хвостосховища характеризується техногенним навантаженням.

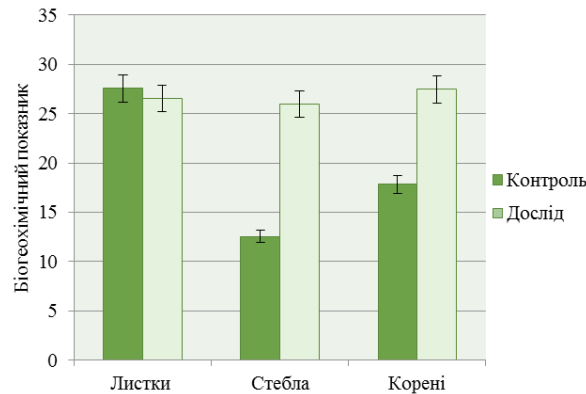


Рис. 2. Показник біогеохімічної активності рослин *S. viminalis* за росту на субстраті з хвостосховища м. Стебник

Кінцевий результат вирощування верби – біопаливо. Єдиного Європейського стандарту на тверде паливо з біомаси немає, тому ми у своїй роботі орієнтувалися на вимоги

німецького стандарту DIN 51731. Стандарт DIN 51731 регламентує вміст мікроелементів і ВМ. Стандартом регламентовано лише вміст свинцю (менш ніж 10 мг/кг), міді (менш ніж 5 мг/кг), хрому (менш ніж 8 мг/кг), нікелю (менш ніж 10 мг/кг), цинку (менш ніж 100 мг/кг) і кадмію (менш ніж 0,5 мг/кг). Вміст мангану та заліза стандартом не регламентовано.

Деякі наші показники виходили за ці норми. Вміст свинцю у стеблах дослідних рослин становив $33,4 \pm 1,4$ мг/кг. Це у 3,34 разу більше щодо стандарту. Вміст міді був перевищений у контролі на 87,68 % ($40,6 \pm 3,2$ мг/кг) і досліді на 95,85 % ($120,5 \pm 6,9$ мг/кг). Вміст хрому в дослідних рослинах дорівнював $17,4 \pm 0,6$ мг/кг і перевищував дані на 54 % щодо стандарту. Вміст нікелю в дослідному варіанті – $12,2 \pm 0,7$ мг/кг, що на 18 % більше стандарту. Контрольні показники вмісту свинцю були більші на 97,39 % ($19,2 \pm 1,7$ мг/кг), а дослідні – на 98,52 % ($33,7 \pm 1,7$ мг/кг) щодо стандарту. Дані щодо вмісту цинку в контрольних і дослідних стеблах рослин не перевищували стандарт.

Про фітореMediaційні властивості *S. viminalis* на даному етапі дослідження говорити ще рано, але, незважаючи на підвищені концентрації ВМ (кадмію, свинцю, міді, цинку, хрому), ця культура проявила високу стійкість до умов вирощування.

Аналіз вмісту важких металів у субстратах є репрезентативним показником екологічного стану території. У субстраті було виявлено перевищення ГДК кадмію, заліза та стронцію. Дослідженням виявлено поліелементне забруднення на території Стебницького хвостосховища, яке було однаковим у контролі та досліді до росту рослин, після росту рослин показник забруднення зменшувався. Збільшення вмісту важких металів у ґрунті призводить до підвищення їхньої концентрації в рослинах. Найбільшу їхню кількість акумулювали стебла дослідних рослин, порівняно з іншими органами. Елементами сильного накопичення рослин *S. viminalis* за росту на субстраті з хвостосховища були станум, кадмій, молібден, свинець, мідь, цинк, цирконій, хром, нікель, стронцій і титан. Елементами слабого накопичення були ванадій, манган і залізо. Дослідження біогеохімічної активності рослин виявили, що вони мають високу здатність накопичувати важкі метали. Це дає змогу рекомендувати дані рослини для фітореMediaції ґрунтів, забруднених ВМ.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Авессаламов И. А. Геохимические показатели при изучении ландшафтов. М.: Изд-во МГУ, 1987. 108 с.
2. Александрова Э. А., Гайдукова Э. А., Кошеленко Н. А. и др. Тяжелые металлы в почвах и растениях и их аналитический контроль. Краснодар, 2001. 167 с.
3. Алексеев Ю. В. Тяжелые металлы в почвах и растениях. Л.: Агропромиздат. Ленингр. отд. 1987. 142 с.
4. Бессонова В. П. Влияние тяжелых металлов на фотосинтез. Днепропетровск: ДДАУ, 2006. 208 с.
5. Блінова Н. К., Мохонько В. І., Саломахіна С. О., Суворін О. В. Екологічна стандартизація і сертифікація: навч. посіб. Луганськ: Вид-во СНУ ім. В. Даля, 2009. 124 с.
6. Богданов Н. А. Метод оценки состояния земель по индексу загрязнения почв // Астрахан. вестн. экол. образования. 2013. № 1(23). С. 102–112.
7. Буожис Г. О. Екотоксикологічна оцінка фосфоритів місцевих родовищ України при використанні їх як добрив: автореф. дис. ... канд. с.-г. наук. К., 1999. 18 с.
8. Вальков В. Ф., Казеев К. Ш., Колесников С. И. Экология почв. Ч. 3. Загрязнение почв. Ростов-на-Дону: УПЛ РГУ, 2004. 54 с.
9. Войткевич Г. В., Мирошников А. Е., Поваренных А. С., Прохоров В. Г. Краткий справочник по геохимии. М.: Недра, 1970. 280 с.

10. *Войтюк Ю. Ю.* Поглинання важких металів із ґрунту рослинністю зони техногенезу // Вісн. Дніпропетр. ун-ту. Сер. геол., геогр. 2016. № 24 (2). С. 11–17. Doi: 10.15421/111626
11. *Городній М. М., Бикін А. В., Нагаєвська Л. М.* Агрохімія: підручник. К.: Альфа, 2003. 786 с.
12. ГОСТ 17.4.1.02-83 [Електронний ресурс] / Охрана природы. Почвы. Классификация химических веществ для контроля загрязнения / М.: Стандартинформ, 2008. <http://vs-egost.com/Catalog/21/21047.shtml>
13. *Добровольский В. В.* Основы биогеохимии: учеб. пособ. М., 1998. 413 с.
14. *Єгорова Т. М.* Фоновий вміст важких металів та його екологічна інформативність у ґрунтах ландшафтів зони українського Полісся // Агрохімія і ґрунтознавство. 2014. № 81. С. 65–72.
15. *Ильин В. Б.* Элементарный химический состав растений. Новосибирск: Наука, 1985. 129 с.
16. *Кирпичников Н. А., Черных Н. А., Черных И. Н.* Влияние антропогенных факторов на распределение тяжелых металлов в почвах ландшафтов юга Московской области // Агрохимия. 1993. № 2. С. 93–101.
17. *Клос В. Р., Бірке М., Жовинський Е. Я.* та ін. Регіональні геохімічні дослідження ґрунтів України в рамках міжнародного проекту з геохімічного картування сільськогосподарських та пасовищних земель Європи (GEMAS) // Пошукова та екологічна геохімія. К.: ІГФМ. 2012. № 1. С. 51–67.
18. *Кузьменко Е. Д., Багрій С. М.* Про доцільність дослідження карсту на родовищах калійної та кам'яної солі електричними методами // Геодинаміка. 2011. № 2 (11). С. 134–137.
19. *Маланчук З. Р., Маланчук Є. З., Корнієнко В. Я.* Дослідження особливостей процесу розподілу важких металів в техногенних розсипах при гідровидобутку // Восточно-Европейский журнал передовых технологий. 2017. №1/10. С. 45–51.
20. Методические рекомендации по проведению полевых и лабораторных исследований почв и растений при контроле загрязнения окружающей среды металлами. М.: Гидрометеиздат, 1981. 70 с.
21. *Минкина Т. М., Мотузова Г. В., Мирошниченко Н. Н.* и др. Накопление и распределение тяжелых металлов в растениях зоны техногенеза // Агрохимия. 2013. № 9. С. 65–75.
22. *Орлов Д. С., Садовникова Л. К., Лозановская И. Н.* Экология и охрана биосферы при химическом загрязнении. М.: Высш. школа, 2002. 334 с.
23. *Ревага О.* Індукція хромосомних аберацій рідкими відходами виробництва стебницького ДГХП «Полімінерал» у *Allium* -тесті // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2006. Вип. 41. С. 46–53.
24. *Саєт Ю. Е.* Геохимия окружающей среды. М.: Недра, 1990. 335 с.
25. *Снакин В. В.* Химическое загрязнение почв и возможность его нормирования // Теоретические основы охраны почв. М.: Институт охраны природы, 1992. С. 17–21.
26. *Созінова О. О., Прістера Б. С.* Методика суцільного ґрунтово-агрохімічного моніторингу сільськогосподарських угідь України. К., 1994. 162 с.
27. *Сплодитель А. О.* Ландшафтознавче обґрунтування оптимізації діяльності національних природних парків України (на прикладі національних природних парків «Нижньосульський» та «Олешківські піски»): дис. ... канд. геогр. наук: 11.00.11. К., 2017. 495 с.
28. *Тарабрин В. П.* Физиология устойчивости древесных растений в условиях загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами // Микроэлементы в окружающей среде. К.: Наук. думка, 1980. 17 с.

29. Холодна А. С. Ґрунтові чинники заплавних ґрунтів, які лімітують зростання енергетичних культур // *Gruntoznavstvo* 17. 2016. № 3–4. С. 43–49. DOI: 10.15421/041612
30. Цветкова Н. М., Пахомов О. Є., Сердюк С. М., Якуба М. С. Біологічне різноманіття України. Дніпропетровська область. Ґрунти. Метали у ґрунтах. Дніпропетровськ: Ліра, 2016. 180 с.
31. Яковишина Т. Ф. Нормування поелементного та поліелементного забруднення ґрунту важкими металами за допомогою ГДК // *Строительство. Материаловедение. Машиностроение. Серия: Создание высокотехнологических экокомплексов в Украине на основе концепции сбалансированного (устойчивого) развития*. 2016. № 87. С. 152–158.
32. Adler A. Accumulation of elements in *Salix* and other species used in vegetation filters with focus on wood fuel quality: Doctoral Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala. 2007. P. 34.
33. Atanassov I. Background values for heavy metals, PAHs and PCBs in the soils of Bulgaria // *Assessment of the Quality of Contaminated Soils and Sites in Central and Eastern European Countries (CEEC) and New Independent States (NIS)*. Sofia: GorexPress, 2002. P. 83–103.
34. Bowen H. J. M. *Environment Chemistry of the Elements* // London; New-York; Toronto; Sydney; San-Francisco: Academic Press, 1979. 250 p.
35. Fernández S., Poschenrieder C., Marcenò C. et al. Phytoremediation capability of native plant species living on Pb-Zn and Hg-As mining wastes in the Cantabrian range, north of Spain // *J. Geochemical Exploration*. 2017. N 174. P. 10–20. doi: 10.1016/j.gexplo.2016.05.015
36. Greger M. Use of Willow in Phytoextraction // *Int. J. Phytoremediat.* 1999. Vol. 1. N 2. P. 115–123.
37. Hammer D., Kayser A., Keller C. Phytoextraction of Cd and Zn with *Salix viminalis* in field trials // *Soil Use and Management*. 2003. Vol. 19. N 3. P. 187–192.
38. Hegedus R., Kosaros T., Gal D. et al. Potential phytoremediation function of energy plants (*Tamarix tetrandra* pall and *Salix viminalis*) in effluent treatment of an intensive fish farming system using geothermal water // *Agriculture and Environment*. 2009. N 1. P. 31–37.
39. Hermle S., Günthardt-Goerg M. S., Schulin R. Effects of metal contaminated soil on the performance of young trees growing in model ecosystems under field conditions // *Environ. Pollut.* 2006. N 144. P. 703–714. doi: 10.1016/j.envpol.2005.12.040
40. Jama-Rodzeńska A., Nowak W. Nickel and lead uptake by willows (*Salix viminalis* L.) // *Polish J. Agronomy*. 2012. N 11. P. 29–33.
41. Klang-Westin E., Eriksson J. Potential of *Salix* as phytoextractor for Cd on moderately contaminated soils // *Plant and Soil*. 2003. Vol. 249. N 1. P. 127–137.
42. Landberg T., Greger M. Differences in uptake and tolerance to heavy metals in *Salix* from unpolluted and polluted areas // *Applied Geochemistry*. 1996. Vol. 11. N 1–2. P. 175–180.
43. Litynski T., Jurkowska H. *Zyznosc gleby I odzywanie sie roslin* // Warszawa: PWN, 1982. 643 s.
44. Meers E., Lamsal S., Vervaeke P., Hopgood M. et al. Availability of heavy metals for uptake by *Salix viminalis* on a moderately contaminated dredged sediment disposal site // *Environmental Pollution*. 2005. Vol. 137. N 2. P. 354–364.
45. Mertens J., Vervaeke P., Meer E., Tack F. M. G. Seasonal changes of metals in willow (*Salix* sp.) stands for phytoremediation on dredged sediment // *Environ. Sci. Technol.* 2006. Vol. 40(6). P. 1962–1968.
46. Mitton F. M., Gonzalez M., Peña A., Miglioranza K. S. B. Effects of amendments on soil availability and phytoremediation potential of aged p,p'-DDT, p,p'-DDE and p,p'-DDD residues by willow plants (*Salix* sp.) // *J. Hazard. Mater.* 2012. N 203–204. P. 62–68.

47. Mleczek M., Łukaszewski M., Kaczmarek Z. et al. Efficiency of selected heavy metals accumulation by *Salix viminalis* roots // Environ. Exp. Bot. 2009. Vol. 65. N 1. P. 48–53.
48. Mleczek M., Rutkowski P., Rissmann I. et al. Biomass productivity and phytoremediation potential of *Salix alba* and *Salix viminalis* // Biomass and Bioenergy. 2010. Vol. 34. N 9. P. 1410–1418.
49. Mundala P., Szwalec A., Kędzior R. Accumulation of selected heavy metals in willow shoots (*Salix viminalis* L.) cultivated in the neighbourhood of a coal ash and slag landfill // Infrastruktura i Ekologia Terenów Wiejskich. №3/1, Polish Academy of Sciences, Cracow Branch. 2017. P. 1043–1051. DOI: <http://dx.medra.org/10.14597/infraeco.2017.3.1.080>
50. Nylund E. Cadmium uptake in willow (*Salix viminalis* L.) and spring wheat (*Triticum aestivum* L.) in relation to plant growth and Cd concentration in soil solution. 2005. P. 33. ISSN 1651-7210.
51. Pavlychenko 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.
52. Pietrzykowski M., Socha J., van Doorn N. S. Linking heavy metal bioavailability (Cd, Cu, Zn and Pb) in Scots pine needles to soil properties in reclaimed mine areas // Sci. Total Environ. 2014. Feb 1; 470. P. 501–510.
53. Prasad M. N. V., Hagemeyer J. Heavy Metal Stress in Plants. From Molecules to Ecosystems. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg. 1999. DOI: 10.1007/978-3-662-07745-0
54. Lübben S., Sauerbeck D. The uptake and distribution of heavy metals by spring wheat // Water Air and Soil Pollution. 1991. N 57–58(1). P. 239–247. DOI: 10.1007/BF00282887
55. Watson C., Pulford I. D., Riddell-Black D. Development of a hydroponic screening technique to assess heavy metal resistance in willow (*Salix*) // Int. J. Phytoremediat. 2003. N 5(4). P. 333–349.

Стаття надійшла до редакції 03.05.19

доопрацьована 26.09.19

прийнята до друку 14.11.19

ACCUMULATION OF HEAVY METALS BY *SALIX VIMINALIS* PLANTS UNDER GROWING AT THE SUBSTRATE FROM STEBNYK TAILINGS

A. Fetsiukh, L. Bunio, O. Patsula, O. Terek

*Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: anastasiia.fetsiukh@lnu.edu.ua*

On the northeastern outskirts of Stebnyk region is a tailing dump which contain 22 million t of waste, including heavy metals (HM). The waste causes salinization of groundwater, reservoirs and surrounding areas. The article considers the issue of contamination chemical elements of different hazard class at the Stebnyk tailing. The content of heavy metals in substrates before and after 30 days of grows *Salix viminalis* L. plants growth was determined. The excess of cadmium, strontium and ferrum content relativeto the MPC is shown. Excessing of the clark was observed in lead, copper, zinc, zirconium (only in control), strontium and manganese. *S. viminalis* plants growth affected the content of some HMs in substrates. Significant reduction of the content of ferrum in the experimental substrate

was noticed, compared with the initial content (before planting). The highest coefficient of concentration was in cadmium and molybdenum. For such elements as cadmium and iron in the substrate from experimental and control sites, the data exceeded 1. By the total pollution index, the substrate from Stebnyk's tailing is classified as the third category of pollution according to the content of the HMs.

The highest amount of HMs was accumulated in the roots of plants, compared with other plants organs. *S. viminalis* plants in the largest number accumulated molybdenum, strontium, chromium and zinc. Studies on the biogeochemical activity of plants have shown that they have a high ability to accumulate heavy metals. The smallest index had the stems and roots of control plants relative to the experiment. It should be noted that the data of biogeochemical activity was higher than 5–10, which indicates that the territory of Stebnyk's tailing is characterized by technogenic load. Despite the high concentrations of HMs, *S. viminalis* plants ostended high resistance to growing conditions.

Keywords: heavy metals, *Salix viminalis* L., biological accumulation coefficient, pollution, toxicity

**ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДІВ ДИСПЕРСІЙНОГО І КЛАСТЕРНОГО АНАЛІЗУ
ДЛЯ ПОРІВНЯННЯ СТІЙКОСТІ ДО ВАЖКИХ МЕТАЛІВ
АЦИДОФІЛЬНИХ ХЕМОЛІТОТРОФНИХ БАКТЕРІЙ,
ВИДІЛЕНИХ ІЗ ТЕХНОГЕННОЇ СИРОВИНИ**

Н. Васильєва¹, І. Блайда^{1*}, Т. Васильєва¹, В. Баранов², І. Барба¹

¹Одеський національний університет імені І.І. Мечникова
вул. Дворянська, 2, Одеса 65082, Україна

²Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна

*e-mail: iblayda@ukr.net

У представленій роботі досліджена стійкість до важких металів типового штаму *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 і восьми штамів ацидофільних хемолітотрофних бактерій, виділених із відвальних продуктів паливно-енергетичного комплексу України різного типу. Для вивчення були використані «метали-замісники» (Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+}), метали «комбінованої дії» (Cu^{2+}) і метали, які не виконують біологічних функцій (Cd^{2+} , Pb^{2+}), але здатні утворювати нерозчинні комплекси на/в клітині або взаємодіяти з нуклеїновими кислотами. Встановлено, що вплив металів на виділені штами ацидофільних хемолітотрофних бактерій неоднозначний і не відповідає шкалі взаємодії металів з азотистими гетероциклічними основами ДНК (шкалою Ейхгорна). Максимальна кількість штамів виявилася стійкою до іонів кобальту (66,6 % при значенні МІС 0,09 М). До іонів міді, кадмію і цинку були резистентними 55,5 % штамів з показниками за мінімальними інгібуючими концентраціями (МІК) 0,13, 0,061 і 0,083 М відповідно. Проведено статистичний аналіз отриманих результатів оцінки стійкості ацидофільних хемолітотрофних бактерій до важких металів з використанням методів дисперсійного та кластерного аналізів у програмі R 3.4.0. Кластеризація результатів аналізу за значеннями мінімальних інгібуючих концентрацій дала змогу згрупувати досліджені метали таким чином: одиничний кластер (Pb^{2+}), кластер (Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+}) і підкластер (Cu^{2+}). Ієрархічний кластерний аналіз значень МІК дав змогу розділити вивчені штами на три групи залежно від рівня їхньої резистентності до металів. Найбільш стійкими до досліджених металів виявилися штами, ізольовані з відходів збагачення вугілля. На основі аналізу літературних даних у вивчених штамів припустимі експресовані системи транспорту металів. Різницю у рівні стійкості до металів у *A. ferrooxidans* і *A. thiooxidans* частково можна зв'язати з використанням двовалентного феруму і тіосульфату відповідно як джерел енергії. Показано неоднорідність відгуку ефлюкс-систем на дію важких металів.

Ключові слова: ацидофільні хемолітотрофні бактерії, резистентність, важкі метали, мінімальні інгібуючі концентрації, ефлюкс-системи

Відомо, що у зв'язку з високою токсичністю і мобільністю більшості металів, у першу чергу «металів-замісників» і металів «комбінованої дії», у мікроорганізмів сформувалися різноманітні способи регуляції концентрування металів у клітині та механізми їхнього транспорту. В опублікованих наукових дослідженнях цих механізмів [1, 3, 5, 8, 13, 15, 16, 24] використаний раніше термін «резистентність до важких металів» вже не є достатнім

для опису цих механізмів. Більш правильно на сьогоднішній день оперувати поняттями «гомеостаз» або «ефлюкс-системи».

Вивчення питань існування і стабільності мікробних асоціацій у субстратах з підвищеною концентрацією металів на сьогоднішній день стало ще більш актуальним, оскільки воно спрямоване на практичні цілі, зокрема, на пошук штамів, здатних до вилуговування металів зі середовищ із їхньою підвищеною концентрацією. Ацидофільні хемолітотрофні бактерії (АХБ) є найбільш перспективною групою в цьому сенсі за рахунок своєї унікальної фізіології та здатності до вилуговування металів. Саме ці мікроорганізми займають екологічну нішу з підвищеною кислотністю, високими концентраціями іонів важких металів і відіграють ведучу роль у солюбілізації металів. Висока адаптивність АХБ до мінливих умов навколишнього середовища викликає підвищений науковий інтерес до проблеми вивчення механізмів, які забезпечують функціонування подібних систем, а самі АХБ є джерелом виникнення нових штамів із більш високим рівнем резистентності і, як наслідок, із більш вираженою здатністю до біовилуговування металів.

Вивчення резистентності до важких металів мікроорганізмів різних груп дало змогу виявити у них системи стійкості, які регулюються оперонами або кластерами генів, локалізованих у хромосомах і плазмідах грам-позитивних та грам-негативних бактерій. Механізми формування стійкості бактерій до важких металів залежать від типу мікроорганізмів, місця їхнього існування, взаємодії з іншими бактеріями, а також від кількості можливих (для даного мікроорганізму) шляхів транспорту іонів металу в клітину, локалізації генів стійкості на хромосомі, плазміді або транспозоні [1, 3, 5]. Один штам може одночасно мати різні механізми захисту, зокрема, за рахунок наявності позаклітинного бар'єру, активного транспорту іонів металів з клітини (ефлюксу), позаклітинної або внутрішньоклітинної секвестрації, відновлення іонів металів [1, 3, 5]. Додаткову складність у розумінні формування систем гомеостазу вносить біологічна значущість металу для клітини, оскільки іони перехідних металів являють собою певну проблему – біологічно необхідні за низьких, вони стають токсичними за високих концентрацій, що передбачає регулювання дії системи залежно від концентрації металу в клітині [1, 3, 8, 13, 15, 16, 24]. З точки зору розвитку сучасних біотехнологій вилучення металів із природних руд і відходів особливий інтерес становлять АХБ, які виділені з мікробіоценозів техногенної сировини, що формується в екстремальних фізико-хімічних умовах із підвищеними концентраціями важких металів, що очікувано має сприяти формуванню механізмів підвищеної стійкості бактерій. Використання методів однофакторного і дисперсійного аналізу в сукупності з відомими літературними даними дає можливість виявити, які саме фактори викликають стійкість бактерій до металів, і припустити наявність у досліджених мікроорганізмів одної з відомих ефлюкс-систем.

Метою даної роботи було порівняти стійкість до важких металів ацидофільних хемолітотрофних бактерій, які були ізольовані з відвальних продуктів паливно-енергетичного комплексу України, з використанням методів дисперсійного та кластерного аналізу.

Матеріали та методи

Дослідження проводили з ацидофільними хемолітотрофними мезофільними і помірно термофільними штамми бактерій (табл. 1), які були виділені з мікробіоценозів відвальних продуктів ПЕК України: породних відвалів вуглезбагачення центральної збагачувальної фабрики (ЦЗФ) «Червоноградська» Львівсько-Волинського вугільного басейну різного терміну накопичення (24–28 місяців – чорного кольору і ті, що зберігалися по-

над 60 місяців, – червоного кольору), золошлаку і золи виносу після спалювання вугілля відповідно на Добротвірській і Ладжинській теплоелектростанціях (ТЕС). Властивості штамів описані в роботі [7]. Відповідні дослідження проводили також із типовим штамом *A. ferrooxidans* ATCC 23270, що був виділений із бурого вугілля шахт США (Американської колекції типових культур, Роквілл, штат Меріленд, США). Усі штами зберігаються в музеї кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова, яка є філією Національної колекції мікроорганізмів НАН України.

Таблиця 1

Штами ацидофільних хемолітотрофних бактерій, виділених із відвальних продуктів ПЕК

№№	Штам	Джерело виділення
1	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> Lv red 9	Червона порода ЦЗФ «Червоноградська»
2	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> Lv black 37	Чорна порода ЦЗФ «Червоноградська»
3	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> DTV 1	Золошлак Добротвірської ТЕС
4	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> Lad 5	Зола виносу Ладжинської ТЕС
5	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> Lad 27	Зола виносу Ладжинської ТЕС
6	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> ATCC 23270	Буре вугілля зі шахт США
7	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> Lv red 11	Червона порода ЦЗФ «Червоноградська»
8	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> Lv black 6	Чорна порода ЦЗФ «Червоноградська»
9	<i>Sulfobacillus sp.</i> Lad 29	Зола виносу Ладжинської ТЕС

Резистентність штамів визначали під час їхнього культивування на стандартному середовищі Сільвермана-Лундгрема 9К складу, г/дм³: K₂HPO₄ – 0,50; (NH₄)₂SO₄ – 3,00; MgSO₄·7H₂O – 0,50; KCl – 0,10; Ca(NO₃)₂ – 0,01. Як джерела енергії під час роботи з *A. ferrooxidans* і *Sulfobacillus sp.* використовували сіль FeSO₄·xH₂O у концентрації 44,5 г/дм³; під час культивування *A. thiooxidans* – Na₂S₂O₃ у концентрації 5,0 г/дм³. Солі металів у формі сульфатів розчиняли в дистильованій воді, стерилізували на киплячій водяній бані протягом 10 хв і вносили до розплавленого щільного середовища 9К. Контролем слугувало середовище без іонів металів. Посіви здійснювали штрихом; мезофільні штами культивували за 35,0±0,2 °С, помірно термофільні – за 50,0±0,2 °С протягом 7 діб. Облік результатів здійснювали візуально, порівнюючи зростання штамів у дослідних і контрольних варіантах. Усі досліди проводили в трьох повторностях. Мінімальною інгібуючою вважали концентрацію (МІК, М), за якої ще зберігається життєздатність досліджуваного штаму, але цілком немає його зростання. Концентрацію металів у розчинах визначали стандартним відомим методом атомно-абсорбційної спектроскопії на приладах ААС-1 (Німеччина) і С-115ПК Selmi (Україна) [4]. Достовірність отриманих результатів оцінювали за критерієм Стьюдента з вірогідністю P<0,05.

Для проведення статистичної обробки результатів визначення стійкості АХБ використовували метод однофакторного дисперсійного та кластерного аналізу в програмі R 3.4.0 [10].

Результати і їхнє обговорення

Мінімальні інгібуючі концентрації для штамів, ізольованих із відвальних продуктів ПЕК України, й типового *A. ferrooxidans* ATCC 23270 наведені в табл. 2.

Усереднені значення МІК для досліджених штамів (на підставі даних табл. 1) склали, М: Cu²⁺ – 0,13±0,01; Cd²⁺ – (0,61±0,03)×10⁻¹; Co²⁺ – 0,09±0,01; Zn²⁺ – 0,008±0,002; Ni²⁺ – 0,007±0,002; Pb²⁺ – (0,25±0,05)×10⁻² (рис. 1).

При цьому до іонів купруму була стійкою максимальна кількість штамів – 86,3 %.

Однофакторний дисперсійний аналіз, який було проведено, показав достовірне розходження концентраційних діапазонів МІК іонів важких металів залежно від штамів.

Таблиця 2

Штами	Іони металів					
	Cu ²⁺	Zn ²⁺	Pb ²⁺ , x10 ⁻²	Cd ²⁺ , x10 ⁻¹	Co ²⁺	Ni ²⁺
<i>A. ferrooxidans</i> Lv red 9	0,18±0,03	0,12±0,02	0,34±0,05	0,88±0,05	0,12±0,02	0,10±0,02
<i>A. ferrooxidans</i> Lv black 37	0,18±0,03	0,09±0,02	0,34±0,05	0,88±0,05	0,12±0,02	0,13±0,02
<i>A. ferrooxidans</i> Lad 5	0,08±0,02	0,06±0,01	0,17±0,02	0,66±0,04	0,06±0,01	0,06±0,01
<i>A. ferrooxidans</i> Lad 27	0,18±0,03	0,06±0,01	0,17±0,02	0,88±0,05	0,09±0,01	0,10±0,02
<i>A. ferrooxidans</i> DTV 1	0,18±0,03	0,06±0,01	0,34±0,05	0,21±0,01	0,12±0,02	0,06±0,01
<i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270	0,04±0,01	0,06±0,01	0,17±0,02	0,21±0,01	0,03±0,01	0,03±0,01
<i>A. thiooxidans</i> Lv black 6	0,08±0,02	0,09±0,02	0,17±0,02	0,44±0,02	0,06±0,01	0,06±0,01
<i>A. thiooxidans</i> Lv red 11	0,10±0,02	0,09±0,02	0,17±0,02	0,44±0,02	0,09±0,01	0,03±0,01
<i>Sulfobacillus</i> sp. Lad 29	0,16±0,03	0,12±0,02	0,34±0,05	0,88±0,05	0,12±0,02	0,10±0,02

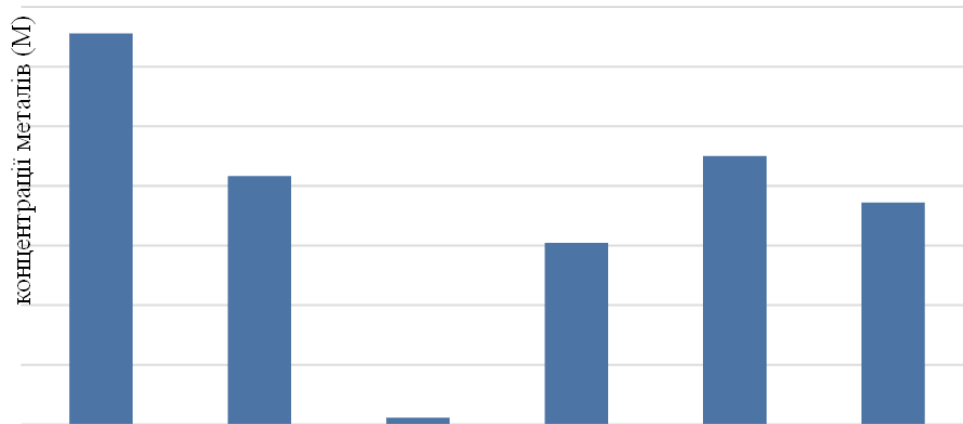
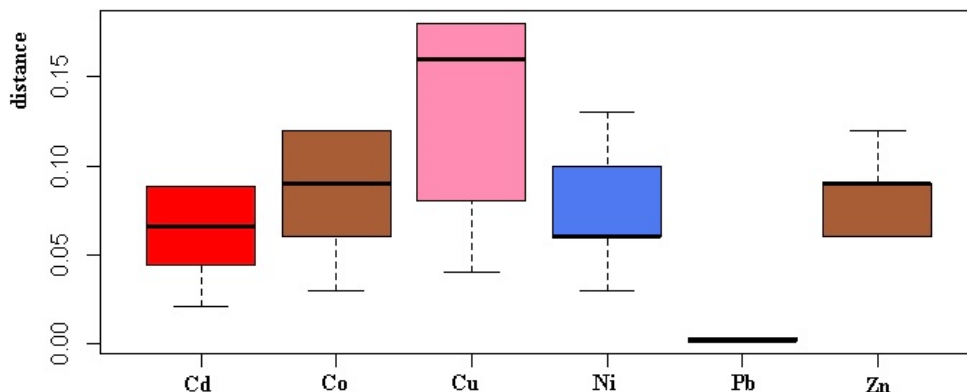
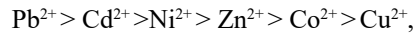


Рис. 1. Усереднені значення мінімальних інгібуючих концентрацій іонів важких металів стосовно штамів, які вивчали

Розрахунковий критерій Фішера, що дорівнює $F_{st} = 29,05$ при рівні достовірності $p=0,05$, порівняно з табличним критерієм Фішера ($F_{tab} = 2,15$), підтверджує необхідність прийняти альтернативну гіпотезу (рис. 2).

Рис. 2. Результати однофакторного дисперсійного аналізу за значеннями МІК іонів важких металів для вивчених штамів ($F_{st} = 29,05$; $F_{tab} = 2,15$; $p=0,05$). У boxplot вказано мінімальні значення концентрацій металів, значення першого (Q1) кватертя, медіани, значення третього (Q3) кватертя, максимальні значення концентрацій металів

Ранжуючи іони важких металів у напрямі зниження їхньої токсичної дії на вивчені штами АХБ (на підставі отриманих значень МІК), отримуємо такий рядок:



який не відповідає ранжуванню металів за їхньою здатністю до взаємодії з азотистими гетероциклічними основами ДНК за шкалою Ейхгорна ($\text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$) [2, 5].

Іони Cu^{2+} і Cd^{2+} вважаються найбільш токсичними, оскільки мають найбільшу спорідненість до азотистих гетероциклічних основ ДНК; вони викликають пошкодження клітинної мембрани і структури ДНК, призводять до клітинних морфологічних змін [9]. Незважаючи на це, відомо, що АХБ, такі як *Acidithiobacillus ferrooxidans*, здатні рости й акумулювати Cu^{2+} і Cd^{2+} аж до концентрацій 0,5–0,6 і 0,09–0,45 М відповідно [11]. Більше половини досліджених штамів АХБ (55,5 %) проявили стійкість до іонів купруму, кадмію та цинку (рис. 1). Трохи менше половини штамів була стійкою до дії іонів нікелю (44,4 %). Мінімальна кількість штамів була резистентною до плюмбуму (33,3 %). До дії іонів кобальту виявилися резистентними майже 66,6 % штамів. Ієрархічний кластерний аналіз показав спорідненість між впливом іонів цинку, кобальту, кадмію та нікелю на досліджувані штами АХБ (рис. 3). Показано формування одиничного кластера (Pb^{2+}) та підкластера (Cu^{2+}). Аналізуючи дані, наведені на рис. 3, та дані літератури, ми припустили, що така кластеризація показників МІС може вказувати на активацію найбільшої групи систем стійкості бактерій до іонів металів – ефлюкс-системи, які активуються за наявності високих концентрацій металів та існують у більшості мікроорганізмів [5]. При цьому можна зауважити відмінності в системі транспорту залежно від низьких і високих концентрацій металу [8].

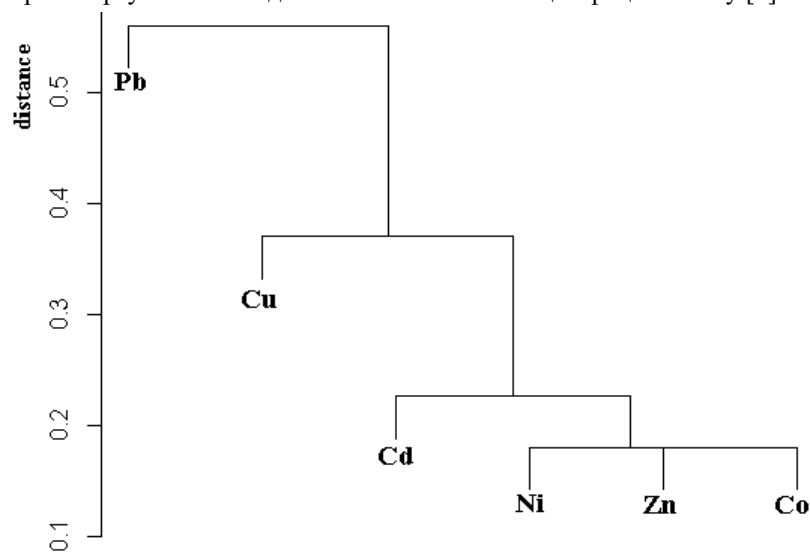


Рис. 3. Дендрограма результатів кластеризації токсичності іонів важких металів щодо штамів ацидофільних хемоліотрофних бактерій, які вивчали (матриця відстаней – method «manhattan», спосіб агрегування – method «single»)

Ефлюксні системи можуть кодуватись як хромосомними, так і плазмідними генетичними детермінантами, а також транспозонами і бактеріофагами, а тому можуть ефективно передаватись іншим членам спільноти. Для експорту іонів металів системи ефлюксу використовують енергію АТФ або хеміосмотичного градієнта [17, 20, 23].

Усі штами АХБ, в тому числі типовий *A. ferrooxidans* ATCC 23270, мають гени, пов'язані з гомеостазом міді [6]. Насамперед це білки сімейства АТФ-ази, пов'язані з транспортом Cu^{2+} (*copA1_{AF}*, *copA2_{AF}* і *copB_{AF}*); три гени, що кодують білки сімейства RND і пов'язані зі системою ефлюксу (*cusA_{AF}*, *cusB_{AF}*, *cusC_{AF}*); а також два гени кодування периплазматичних шаперонів для Cu^{2+} (*cusF_{AF}* і *copC_{AF}*). У роботі [21] показано, що ці детермінанти стійкості до Cu^{2+} у *A. ferrooxidans* зазвичай понадекспресовані під час адаптації до іона металу у вигляді солі CuSO_4 . Слід відзначити, що АТФ-ази Р-типу транспортують в основному іони металів, які пов'язують сульфгідрильні групи білків (Cu^+/Ag^+ , $\text{Zn}^{2+}/\text{Cd}^{2+}/\text{Pb}^{2+}$). Це основні білки ефлюкс-системи, до якої, крім них, входять білки, що належать сімействам RND і CDF. АТФ-ази Р-типу і CDF-білки грамнегативних бактерій переносять специфічні для них субстрати крізь цитоплазматичну мембрану в периплазматичний простір, причому CDF-білки в основному специфічно взаємодіють з іонами двовалентних металів (Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} і Fe^{2+}), на відміну від білків АТФ-аз Р-типу. RND-білки утворюють транспортний комплекс, який переносить катіони з периплазматичного простору крізь зовнішню мембрану та займають центральне місце у процесі гомеостазу катіонів металів, який адаптований до високих концентрацій Zn^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} [20].

Найбільш вивченою RND-системою є система CzcCBA, що регулює стійкість до іонів кобальту, цинку й кадмію та складається зі субодиниць С, В і А. Є також інші хеміосмотичні ефлюкс-системи CnrCBA (стійкість до іонів Co^{2+} і Ni^{2+}), NccCBA (Ni^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+}), cus-CBA (Ag^+ , Cu^{2+}) і czrCBA (Cd^{2+} , Zn^{2+}) [12, 14, 22].

Сформовані кластери можна пояснити активацією різних систем: система CzcCBA, або системи гомеостазу – АТФази Р-типу cadA, що забезпечують стійкість до цих іонів, або системи cadAB, гомологічні системі cop [19]. Точніші вказівки на транспортні системи потребують додаткового аналізу з використанням молекулярно-біологічних досліджень.

Цікавим виявився факт формування окремого кластеру, який містить іон плумбуму. У *A. ferrooxidans* відома система, спільна для іонів кадмію і плумбуму, в якій регулятор транскрипції, що реагує на ці метали, кодується одним геном (cmtRAAF), ефлюксові білки кадмію кодуються чотирма генами (czcA1AF, czcA2AF, czcB1AF і czcC1AF), а передбачуваний білок катіонного каналу, пов'язаний з транспортом кадмію, кодується двома генами (cadA1AF і cadB1AF) [18]. Однак у нашому випадку ми спостерігаємо формування окремого кластеру (рис. 3).

На наступному етапі роботи було проаналізовано залежність рівня МІК від виділеного штаму. Проведений однофакторний дисперсійний аналіз по угрупованнях показав достовірне розходження рівнів резистентності до важких металів залежно від штамів (рис. 4). Для дослідження можливих угруповань отриманих даних використовували метод ієрархічного кластерного аналізу в пакеті R 3.4.0. Для перевірки достовірності отриманої дендрограми додатково використовували бутстрап, реалізований у пакеті pvclust. Як видно із даних, наведених на рис. 5, вивчені штами залежно від рівня резистентності до металів, можна розділити на дві групи. До першої входять штами з мінімальними рівнями резистентності: *A. thiooxidans* Lv red 11, *A. thiooxidans* Lv black 6, *A. ferrooxidans* Lad 5 і *A. ferrooxidans* ATCC23270. До другої групи входять штами з більш високим рівнем резистентності (рис. 5): *A. ferrooxidans* Lv red 9, *A. ferrooxidans* Lv black 37, *Sulfobacillus* sp. Lad 29, *A. ferrooxidans* Lad 27 і *A. ferrooxidans* DTV 1.

Almarcegui зі співавт. [6] відмітив, що в умовах, коли як джерело енергії під час культивування штамів ацидофільних хемолітотрофних бактерій використовували похідні сірки, а не двовалентний ферум, то рівень їхньої резистентності до Cu^{2+} знижувався. Це явище пояснювали тим, що у процесі використання як джерела енергії двовалентного феруму у

A. ferrooxidans ATCC 23270 за наявності іонів Cu^{2+} підвищується рівень регуляції систем RND-типу й різних відкачуючих насосів RND-типу і швидше за все відбувається придрушення основного поріну зовнішньої мембрани та деяких іонних переносників, що вказує на загальне зниження припливу металу до клітини [6, 8]. Оскільки ми під час культивування штамів *A. thiooxidans* використовували тиосульфат, то низький рівень резистентності цих штамів до металів і, зокрема, до Cu^{2+} також можна пов'язати з описаним процесом.

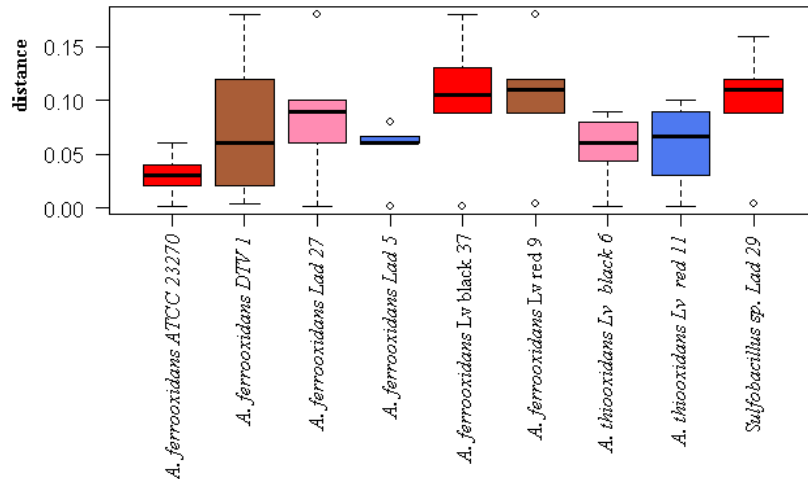


Рис. 4. Результати однофакторного дисперсійного аналізу за показниками резистентності штамів, які вивчали, до іонів металів ($F_{it}=13,136$; $F_{tab}=1,72$; $p=0,05$). У boxplot вказано мінімальні значення концентрацій металів, значення першого (Q1) кватриля, медіани, значення третього (Q3) кватриля, максимальні значення концентрацій металів

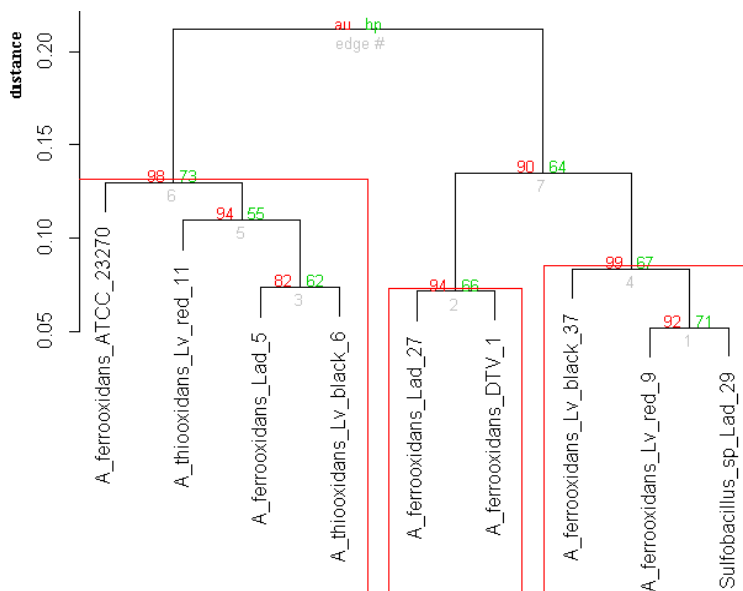


Рис. 5. Дендрограма результатів кластеризації показників резистентності штамів, які вивчали, до важких металів. Кластеризація даних з використанням функції pvcust за nboot = 1000 (матриця відстаней – method «manhattan», спосіб агрегування – method «single»)

Більш наочний розподіл штамів АХБ на групи залежно від їхнього рівня резистентності до важких металів представлено на рис. 6. Значні відмінності в показниках резистентності дають змогу розглядати штам *A. ferrooxidans* DTV 1 як окрему групу, що входить до підкластеру, який об'єднує штами *A. ferrooxidans* Lv red 9, *A. ferrooxidans* Lv black 37, *Sulfobacillus* sp. Lad 29, *A. ferrooxidans* Lad 27 і *A. ferrooxidans* DTV 1. З нього випливає, що штами *A. ferrooxidans* DTV 1 і *A. ferrooxidans* Lad 27 мають «нерівномірний» рівень стійкості. Якщо для штамів *A. ferrooxidans* Lv red 9, *A. ferrooxidans* Lv black 37 та *Sulfobacillus* sp. Lad 29 характерна максимальна стійкість до всіх металів, для *A. ferrooxidans* ATCC 23270 і *A. ferrooxidans* Lad 5 – мінімальна, то штам *A. ferrooxidans* DTV 1 проявив високу резистентність тільки до Pb^{2+} , Cu^{2+} , і Co^{2+} , а *A. ferrooxidans* Lad 27 – тільки до Cu^{2+} і Cd^{2+} (рис. 6).

Варто відзначити, що типовий штам *A. ferrooxidans* 23270 належить до кластеру, який об'єднує штами з меншою стійкістю до важких металів. Це свідчать про те, що штами, які перебувають в умовах постійного впливу іонів важких металів, набувають більшої резистентності порівняно з лабораторними штамами, а також є непрямим доказом того, що наявність важких металів у середовищі існування мікроорганізмів стимулює експресію ефлюкс-систем.

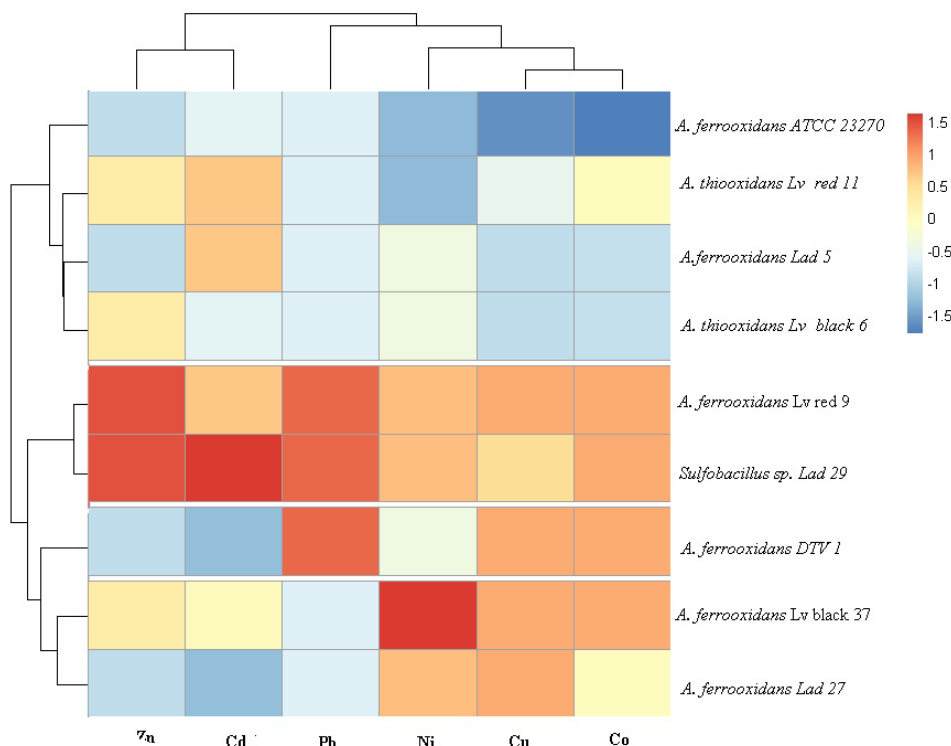


Рис. 6. Heatmap за рівнем подібності між показниками резистентності штамів АХБ залежно від металів. Схожість між змінними була розрахована за допомогою пакета heatmap у програмі R 3.4.0

Таким чином встановлено, що ізольовані з мікробіоценозів відвалів паливно-енергетичного комплексу України штами ацидофільних хемолітотрофних бактерій, як і очікувалося, мають високий рівень резистентності до ряду важких металів, причому до іонів кобаль-

ту проявила стійкість максимальна кількість штамів. Застосування статистичних методів дало змогу чіткіше згрупувати іони важких металів за рівнем їхнього впливу на штами, які досліджували. Аналіз отриманих закономірностей і літературних даних дав змогу припустити, що рівень резистентності до важких металів залежить від рівня активації систем гомеостазу виділених штамів АХБ. Використання двовалентного заліза як джерела енергії сприяє підвищенню рівня резистентності до металів, що частково пояснює різницю в рівні стійкості до металів у *A. ferrooxidans* і *A. thiooxidans* і не суперечить літературним даним [6, 11]. Показники рівня резистентності типового штаму *A. ferrooxidans* ATCC 23270 свідчать, що мікроорганізми, які перебувають в умовах постійного пресу дії важких металів у техногенних субстратах, набувають більшої резистентності до важких металів порівняно зі штамами, які зберігаються в колекціях. Показано, що резистентність залежить від джерела виділення мікроорганізмів. Можна припустити, що і рівень експресії генів, відповідальних за стійкість до іонів важких металів, також залежить від джерела виділення.

З огляду на велику кількість транспортних систем і пов'язаних із ними генів, що підтримують гомеостаз у мікроорганізмів, вивчення всіх можливих варіантів за допомогою молекулярно-генетичних методів є складним для вирішення завданням. Однак з огляду на те, що більшість таких систем є кластери генів, то і рівень їхньої регуляції має бути співрозмірний. Можливо, проводячи оцінювання реального відгуку мікроорганізмів на дію важких металів за допомогою статистичних методів із залученням додаткових факторів у вигляді фізичних або хімічних характеристик субстрату чи умов культивування, а також доповнюючи дослідження аналізом літературних даних, буде можливо виявити закономірності між реакцією мікроорганізмів і відомими ефлюкс-системами. Крім того, ми вважаємо, що більш глибоке розуміння формування системного відгуку мікроорганізмів на негативний вплив навколишнього середовища дасть змогу пояснити причини високої варіабельності показників резистентності всередині групи штамів *A. ferrooxidans*, виділених зі субстрату одного типу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Кушкевич І., Гнатуш С., Гудзь С. Вплив важких металів на клітини мікроорганізмів // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2007. Вип. 45. С. 3–28.
2. Помогайло А. Д., Уфлянд И. Е. Макромолекулярные металлохелаты. М.: Химия, 1991. 304 с.
3. Таширеві А.Б. Множественная устойчивость к токсичным металлам микроорганизмов антарктических клифов (остров Галиндез) // Укр. антаркт. журнал. 2012. № 10–11. С. 212–221.
4. Хавезов И., Цалев Д. Атомно-абсорбционный анализ. Л.: Химия, 1983. 144 с.
5. Янева О. Д. Механизмы устойчивости бактерий к ионам тяжелых металлов // Мікробіол. журнал. 2009. Т. 71. № 6. С. 54–65.
6. Almarcegui R. J., Navarro C. A., Paradela A. et al. Response to copper of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 grown in elemental sulfur // Research in Microbiology. 2014. Vol. 165. P. 761–772. doi.org/10.1016/j.resmic.2014.07.005
7. Blyada I., Vasylieva T., Sliusarenko L. et al. Isolation and study of the main properties of acidophilic chemolithotrophic bacteria isolated from the waste dumps of fuel-energy complex of Ukraine // Studia Biologica. 2018. Vol. 12. N 3–4. P. 3–16. doi: <https://doi.org/10.30970/sbi.1203.570>

8. Bruins M. R., Kapil S., Oehme F. W. Microbial resistance to metals in the environment // *Ecotoxic. Environ. Safe.* 2000. Vol. 45. P. 198–207. doi.org/10.1006/eesa.1999.1860
9. Chakravarty R., Banerjee P. C. Morphological changes in an acidophilic bacterium induced by heavy metals // *Extremophiles.* 2008. Vol. 12. N 2. P. 279–284. doi:10.1007/s00792-007-0128-4
10. Dalgaard P. *Introductory Statistics with R.* Springer Science, 2008. 370 p. doi: 10.1007/978-0-387-79054-1
11. Dopson M., Baker-Austin C., Koppineedi P., Bond P. L. Growth in sulfidic mineral environments: metal resistance mechanisms in acidophilic microorganisms // *Microbiol.* 2003. Vol. 149. P. 1959–1970. doi: 10.1099/mic.0.26296-0
12. Franke S., Grass G., Nies D. H. The product of the ybdE gene of the *Escherichia coli* chromosome is involved in detoxification of silver ions // *Microbiol.* 2001. Vol. 147. P. 965–972. doi:10.1099/00221287-147-4-965
13. Garcia-Domnguez M., Lopez-Maury L., Florencio F. J., Reyes J. C. A gene cluster involved in metal homeostasis in the cyanobacterium *Synechocystis sp.* strain PCC 6803 // *J. Bacteriol.* 2000. Vol. 182. N 6. P. 1507–1514. doi: 10.1128/JB.182.6.1507-1514.2000
14. Grass G., Fan B., Rosen B. P. et al. NreB from *Achromobacter xylosoxidans* 31A Is a Nickel-Induced Transporter Conferring Nickel Resistance // *J. Bacteriol.* 2001. Vol. 183. N 9. P. 2803–2807. doi: 10.1128/JB.183.9.2803-2807.2001
15. Honsa E. S., Johnson M. D. L., Rosch J. W. The roles of transition metals in the physiology and pathogenesis of *Streptococcus pneumoniae* // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2013. Vol. 3. N 92. P. 1–15. doi:10.3389/fcimb.2013.00092
16. Karelov E., Harichov J., Stojnev T. et al. The isolation of heavy-metal resistant culturable bacteria and resistance determinants from a heavy-metal-contaminated site // *Biologia.* 2011. Vol. 66. P.18–26. doi: 10.2478/s11756-010-0145-0.
17. Lee S.-W., Glickmann E., Cooksey D. A. Chromosomal locus for cadmium resistance in *Pseudomonas putida* consisting of a cadmium-transporting ATPase and a MerR family response regulator // *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. Vol. 67. N 4. P. 1437–1444. doi:10.1128/AEM.67.4.1437-1444.2001
18. Mergeay M., Monchy S., Vallaeys T. et al. *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal responsive genes // *FEMS Microbiol. Rev.* 2003. Vol. 27. N 2–3. P. 385–410. doi:10.1016/S0168-6445(03)00045-7
19. Nies D. H. CzcR and CzcD, gene products affecting regulation of resistance to cobalt, zinc, and cadmium (czc system) in *Alcaligenes eutrophus* // *J. Bacteriol.* 1992. Vol. 174. P. 8102–8110.
20. Nies H. D. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes // *FEMS Microbiol. Rev.* 2003. Vol. 27. N 2–3. P. 313–339. doi:10.1016/S0168-6445(03)00048-2
21. Orellana L. H., Jerez C. A. A genomic island provides *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993 additional copper resistance: a possible competitive advantage // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011. Vol. 92. P. 761–767. doi:10.1007/s00253-011-3494-x
22. Outtenb F. W., Huffman D. L., Hale J. A., O'Halloran T. V. The independent cue and cus systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli* // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276. N 33. P. 30670–30677. doi:10.1074/jbc.M104122200
23. Van Houdt R., Monchy S., Leys N., Mergeay M. New mobile genetic elements in *Cupriavidus metallidurans* CH34, their possible roles and occurrence in other bacteria // *Ant. Van Leeuwenhoek.* 2009. Vol. 96. P. 205–226. doi:10.1007/s10482-009-9345-4

24. Wakeman C. A., Skaar E. P. Metalloregulation of Gram-positive pathogen physiology // Curr. Opin. Microbiol. 2012. Vol. 15. N 2. P.169–174. doi:10.1016/j.mib.2011.11.008

Стаття: надійшла до редакції 02.05.19

доопрацьована 20.06.19

прийнята до друку 07.10.19

APPLICATIONS OF METHODS OF DISPERSION AND CLUSTER ANALYSIS TO COMPARE THE RESISTANCE OF ACIDOPHILIC CHEMOLITHOTROPHIC BACTERIA ISOLATED FROM DUMP PRODUCTS TO HEAVY METALS

N. Vasylieva¹, I. Blayda¹, T. Vasylieva¹, V. Baranov², I. Barba¹

¹I.I. Mechnikov Odesa National University

2, Dvoryanska St., Odesa, 65082, Ukraine

²Ivan Franko National University of Lviv

4, Hrushevskyyi St., Lviv 79005, Ukraine

e-mail: iblayda@ukr.net

In the present work, the resistance to heavy metals of one reference strain *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 and eight strains of acidophilic chemolithotrophic microorganisms isolated from dump products of the fuel and energy complex of Ukraine of various types was investigated. For the study were used metals that have the property of substituents (Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+}), metals of the “combined” action (Cu^{2+}), and metals that do not perform biological functions (Cd^{2+} , Pb^{2+}), but which are able to form insoluble complexes on/into the cells or interact with nucleic acids. It was established that the impact of metals on the studied strains of acidophilic chemolithotrophic bacteria is ambiguous and does not correspond to the scale of interaction of metals with nitrogenous heterocyclic bases of DNA. The maximum number of strains were resistant to cobalt ions (66.6 % with an MIC value of 0.09 M), about 55.5 % of the strains were resistant to impact of copper, cadmium and zinc ions with indicators of MIC of 0.13, 0.061, and 0.083 M, respectively. A statistic analysis of obtained results of the resistance to heavy metals of acidophilic chemolithotrophic bacteria with used using the methods of dispersion and cluster analyzes in the R 3.4.0 program was carried out. Clustering of the results according to the minimum inhibitory concentrations allowed us to group the studied metals into three clusters: a single (Pb^{2+}), a cluster (Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+}) and subcluster (Cu^{2+}). Also, hierarchical cluster analysis based on the level of resistance of strains allowed us to divide the studied strains into two groups depending on their level of resistance to metals. The strains that were isolated from coal wastes were the most resistant to the studied metals. The active systems of metal transport of studied acidophilic chemolithotrophic bacteria were theoretically predicted based on literature data analysis. The difference in the level of resistance to metals in *A. ferrooxidans* and *A. thiooxidans* was partially associated with the use of bivalent iron as an energy source. The heterogeneity of efflux systems response to the action of heavy metals within the group of microorganisms belonging to *A. ferrooxidans* was shown.

Keywords: acidophilic chemolithotrophic bacteria, resistance, heavy metals, minimal inhibitory concentrations, efflux systems

СКРИНІНГ ЦВІЛЕВИХ ГРИБІВ НА ЗДАТНІСТЬ ДО СИНТЕЗУ КРЕАТИНІНДЕІМІНАЗИ

О. Демків^{1*}, Н. Стасюк¹, А. Закальський^{1,2}, О. Закальська¹,
Т. Прокопів^{1,2}, Ю. Борецький², М. Гончар^{1,2,3}

¹Інститут біології клітини НАН України
вул. Драгоманова, 14/16, Львів 79005, Україна

²Львівський державний університет фізичної культури імені І. Боберського
вул. Костюшка, 11, Львів 79007, Україна

³Дрогобицький державний педагогічний університет імені Івана Франка
вул. Івана Франка, 24, Дрогобич 82100, Україна
e-mail: demkiv@yahoo.com

Визначення концентрації креатиніну в біологічних рідинах набуває дедалі більшої актуальності як клінічний тест. Для визначення вмісту креатиніну в біологічних зразках запропоновано різні хімічні та фізико-хімічні методи, включно з добре відомою кольоровою реакцією Яффе в різних модифікаціях. Однак її недоліками є низька специфічність і чутливість до позитивної та негативної інтерференції з боку супутніх речовин. Окрім того, наявні методи потребують значних затрат часу, тривалості та складної підготовки проб, дорогих реактивів, висококваліфікованого персоналу і, найголовніше, не дають змоги проводити аналіз у режимі реального часу.

Тому все більшу увагу приділяють ензиматичним методам визначення креатиніну, зокрема, з використанням мікробної креатиніндеїмінази. У зв'язку з цим пошук нових мікроорганізмів – ефективних продуцентів специфічних креатиніндеїміназ – є актуальним завданням мікробної ензимології та аналітичної біотехнології. Нами проведено аналіз креатиніндеїміназної активності 10 штамів різних видів грибів: *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma lignorum*, *Aspergillus glaucus*, *Trichothecium roseum*, *Fusarium* sp., *Monilinia fructicola*, *Penicillium chrysogenum*, *Chaetoniium globosum*, *Aureobasidium pullulans* та *Botrytis allii*. Серед досліджених штамів активність ферменту виявлено у таких видів: *M. fructicola*, *A. pullulans*, *B. allii*, *T. roseum* і *C. globosum*, хоча здатність використовувати креатинін як єдине джерело азоту проявляли тільки два штами – *B. allii* та *C. globosum*. Активність креатиніндеїмінази під час вирощування цих штамів у середовищі з глюкозою та креатиніном як єдиними джерелами вуглецю й азоту була у 2,5 та 1,5 рази вищою, ніж у середовищі з глюкозою та нітратом натрію, відповідно. Отже, штами *B. allii* та *C. globosum* можуть бути використані для виділення й очищення креатиніндеїмінази з метою дослідження субстратної специфічності ферменту і конструювання ензиматичних біосенсорів для аналізу креатиніну.

Ключові слова: креатинін, креатиніндеїміназа, цвілеві гриби, скринінг

В останнє десятиліття зростає попит на прості й надійні тести для виявлення важливих метаболітів, які можуть слугувати показниками стану здоров'я. Продукт розпаду креатину – креатинін – є прикладом такого метаболіту.

Креатинін є одним із найбільш значущих біоаналітів у сучасному клінічному аналізі, оскільки його концентрація у крові та сечі є важливим показником, що застосовується для оцінки функції нирок [10, 14], а також характеристики фізіологічного стану спортсменів [4]. Нормальний вміст креатиніну в крові становить: для жінок – 44–97 мкМ, для чоловіків – 62–115 мкМ. За умови функціонування тільки однієї нирки цей показник зростає

до 159–168 мкМ. Підвищена понад норму концентрація креатиніну в сироватці крові (для дітей – понад 177 мкМ, для дорослих – понад 885 мкМ) свідчить про серйозну ниркову недостатність. Гіперкреатинінемія може бути пов'язана з хронічними або гострими нирковими захворюваннями й ураженням нирок токсичними чинниками, зокрема, медикаментами (рентгеноконтрастні засоби, аміноглікозиди, цефалоспорини, статини тощо). Також підвищення рівня креатиніну в сироватці крові спостерігають у разі споживання великої кількості м'яса або застосування препаратів креатину спортсменами (крім того, має місце підвищений вміст креатиніну в сечі). Рівень креатиніну зростає також за зневоднення організму та ураження м'язів [3, 4].

Незважаючи на низьку специфічність і чутливість, реакцію із пікриною кислотою (реакція Яффе) широко використовують у медичній практиці для оцінки вмісту креатиніну в плазмі (сироватці) крові та визначення швидкості клубочкової фільтрації – інтегрального показника видільної функції нирок. Для аналізу вмісту креатиніну запропоновано різні хімічні та фізико-хімічні методи [2, 9]: рідинна хроматографія високого тиску, хроматографія з використанням флуоресцентних індикаторів, іонна хроматографія, міцелярна електрокінетична хроматографія і тандемна мас-спектрометрія. Однак усі ці методи є дуже витратними, потребують складної підготовки проб, дорогих реактивів, висококваліфікованого персоналу і непридатні для вимірювання вмісту креатиніну в режимі реального часу, наприклад, під час контролю процесу тренувань спортсменів. Тому є потреба у простих, неінвазивних методах аналізу цього метаболіту в біологічних рідинах, в т. ч. у поті та слині [3, 10]. Одним із таких підходів може бути використання ферменту креатиніндемінази, що гідролізує креатинін до метилгідантоїну й аміаку. Креатиніндеміназа (КДІ) (КФ 3.5.4.21) належить до родини гідролаз і здійснює гідроліз циклічних амідів. У різних мікроорганізмів КДІ беруть участь у метаболізмі цитозину та креатиніну [15]. Одним із добре вивчених представників цієї родини є КДІ, виділена з *Corynebacterium lilium*. Молекулярна маса ферменту становить 195 кДа. Він є специфічним до креатиніну і нездатний гідролізувати креатин, сечовину, цитозин чи гуанін, зберігає стабільність при 5 °С у 0,02 М фосфатному буфері, рН 7,0 упродовж тижня [6, 12, 13]. Оскільки продуктивність синтезу КДІ у вказаних бактерій є невисокою – як для клітин дикого типу, так і для рекомбінантного штаму, що містить експресійну касету з геном ферменту [15], пошук інших мікроорганізмів із високою активністю КДІ є актуальним завданням. Перспективними об'єктами для такого пошуку є штами грибів, які здатні засвоювати різноманітні азотовмісні органічні сполуки (наприклад, креатинін). Метою даної роботи було дослідити креатиніндеміназну активність наявних штамів цвілевих грибів.

Матеріали та методи

У роботі використовували такі штами мікроорганізмів: *Aspergillus oryzae* Г-1-А, *Trichoderma lignorum* Г-3-Тр., *Aspergillus glaucus* ХС9, *Trichothecium roseum* Г-18-Тр., *Fusarium Sp* F31 (люб'язно надані з колекцій культур мікроорганізмів ЛНУ ім. І. Франка), *Monilinia fructicola* RU22, *Penicillium chrysogenum* BW 1890, *Chaetonium globosum* F0142, *Aureobasidium pullulans* AP-3 (Жешівського університету, Польща) та *Botrytis allii* 100(5) (з колекцій культур мікроорганізмів Інституту біології клітини НАН України).

Мікроорганізми вирощували в мінеральному середовищі такого складу (г/л): KNO_3 – 2,5; KH_2PO_4 – 2; NaCl – 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; дріжджовий екстракт – 0,2, глюкоза – 10,0; мікроелементи у кінцевій концентрації: 0,2 мкМ CuSO_4 ; 4,5 мкМ MnSO_4 ; 2,0 мкМ NaMoO_4 ; 0,75 мкМ H_3BO_3 ; 17,5 мкМ ZnSO_4 . Культури зберігали на агаризованому (20 г/л) середови-

щі аналогічного складу. У низці експериментів замість нітрату натрію середовище містило креатинін у концентрації 2,5 г/л.

Мікроорганізми вирощували аеробно за температури 28 °С у колбах об'ємом 500 мл (по 100 мл середовища) на орбітальному шейкері за 200 об./хв упродовж 3 діб.

Міцелій відділяли від середовища фільтруванням, промивали послідовно водою та 50 мМ фосфатним буфером (рН 7,0) і використовували для отримання безклітинних екстрактів.

Безклітинні екстракти отримували розтиранням міцелію з кварцовим піском на холоді. Незруйнований міцелій і клітини відділяли центрифугуванням за 6000 g 15 хв і 5 °С.

Визначення активності КДІ проводили у 50 мМ К,Na-фосфатному буфері, рН 7,5 (ФБ), який містив 5 мМ креатинін. Реакцію запускали внесенням досліджуваного препарату безклітинного екстракту й інкубували реакційну суміш (об'ємом 0,5–1,0 мл) упродовж 15–30 хв за 37 °С. До проб додавали 2,0 мл 15 мМ розчину *o*-ортофталевого альдегіду (ОФА), що містить 0,16 мМ сульфід натрію; суміш прогрівали за 60 °С упродовж 15 хв. Інтенсивність забарвлення продукту реакції аміаку з ОФА (жовтий колір) характеризувала активність КДІ [8].

Для кількісного визначення активності КДІ реєстрували оптичну густину проб (за довжини хвилі 360 нм) або інтенсивність флуоресценції (за довжини хвилі емісії 415 нм та хвилі збудження 360 нм) кінцевого продукту реакції щодо контрольної проби (реакційна суміш без додавання ферменту). Визначення оптичної густини проб проводили за допомогою спектрофотометра SHIMADZU UV-1650 PC із використанням стандартного програмного забезпечення "UVProbe 2.20". Інтенсивність флуоресценції визначали за допомогою флуориметра «TECAN Infinite M-200».

За одиницю активності КДІ приймали кількість ферменту, яка забезпечує утворення 1 мкмоль продукту (амонію) за 1 хв за описаних вище умов.

Статистичне опрацювання результатів проводили, використовуючи програмні пакети Microsoft Excel та Origin. Обчислювали основні статистичні показники за безпосередніми даними (середнє арифметичне – M ; стандартна похибка середнього арифметичного – m). Для оцінки достовірності різниці між статистичними характеристиками трьох альтернативних сукупностей даних обчислювали коефіцієнт Стьюдента [1]. Достовірною вважалася різниця за показника достовірності $P > 0,95$.

Результати і їхнє обговорення

КДІ каталізує розщеплення креатиніну до метилгдантоїну й амонію. Обидва продукти реакції утворюються в еквімолярній кількості, яка відповідає кількості розкладеного креатиніну. Принципова схема реакцій, що лягли в основу запропонованого нами методу визначення активності КДІ, представлена на рис. 1. На першій, ензиматичній, стадії реакції за участю КДІ відбувається гідроліз креатиніну до *N*-метилгдантоїну й амонію. Утворений амоній реагує з ОФА (друга стадія реакції, хімічна) з утворенням 2*H*-ізоіндол-1-тіолу, який кількісно оцінюють спектрофотометрично або флуориметрично.

Коефіцієнт молярної екстинкції (ϵ_m) 2*H*-ізоіндол-1-тіолу $((7,0 \pm 0,15) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$ забезпечує достатню для рутинного аналізу чутливість визначення активності КДІ.

Як видно з рис. 2, амоній утворює забарвлений продукт (2*H*-ізоіндол-1-тіол) у реакції із ОФА за наявності сульфату натрію. Після інкубації за 37 °С упродовж 30 хв інтенсивність кольору проб корелювала з концентрацією амонію.

У разі потреби чутливість запропонованого методу визначення активності КДІ можна значно збільшити (у ≈ 30 разів) за рахунок визначення флуоресценції проб, а не оптичної густини (рис. 3).

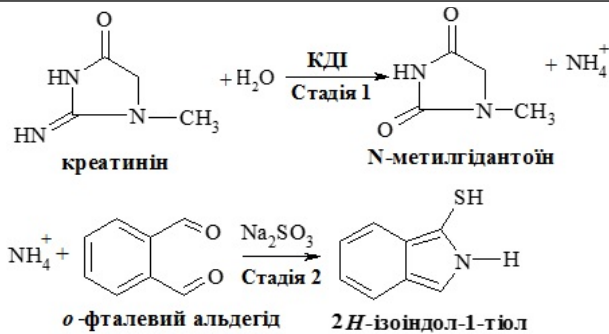


Рис. 1. Схема реакцій визначення активності КДІ

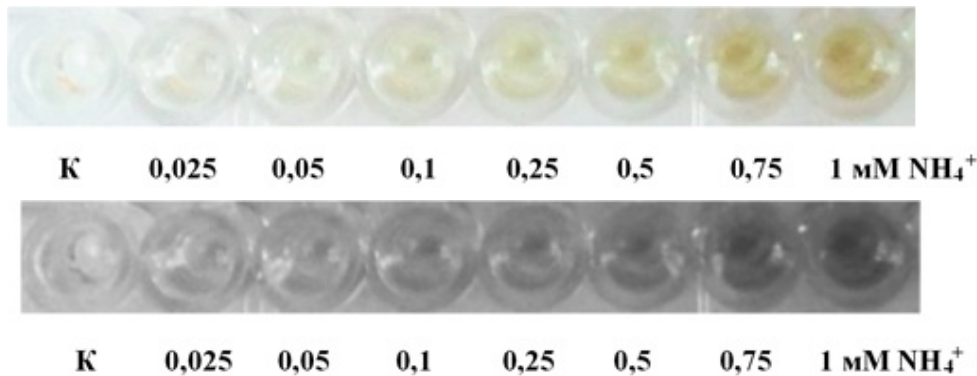


Рис. 2. Утворення 2H-ізоіндол-1-тіолу за взаємодії амонію з ОФА у присутності сульфїту натрію

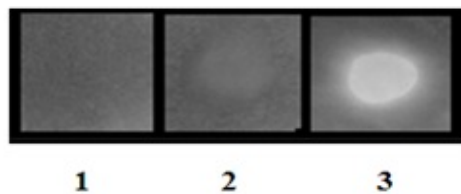


Рис. 3. Флуоресценція 2H-ізоіндол-1-тіолу за ультрафіолетового опромінення. На фільтрувальний папір, змочений 15 мМ розчином ОФА, що містив 0,16 мМ сульфїт натрію, наносили по 0,01 мл проб та інкубували у термостаті за 60 °С упродовж 15 хв: 1 – без амонію; 2 – 0,01 М хлорид амонію; 3 – 0,1 М хлорид амонію.

Використовуючи запропонований підхід, проведено тестування 10 видів грибів на здатність до синтезу КДІ. Для цього міцелій грибів вирощували в мінімальному середовищі з глюкозою та нітратом натрію як єдиними джерелами вуглецю й азоту, відповідно. Якісний аналіз активності КДІ у безклітинних екстрактах, отриманих із досліджуваних штамів, проводили у планшеті. Для цього у лунки вносили послідовно 0,1 мл ФБ, що містив 5 мМ креатинін і 0,025 мл безклітинного екстракту (приблизно 0,2 мг білка) й інкубували за 37 °С упродовж 30 хв. Після цього додавали 0,2 мл 15 мМ розчину ОФА, що містив 0,16 мМ сульфїт натрію та інкубували суміш за 37 °С упродовж 30 хв. Як видно із рис. 4, появу жовтого забарвлення, яке свідчить про утворення 2H-ізоіндол-1-тіолу із амонію, вивільненого при гідролізі креатиніну, спостерігали тільки для 5-ти із 10 досліджених видів: *M. fructicola*, *A. pullulans*, *B. allii*, *T. roseum*, *Ch. globosum*. У пробах без креатиніну забарвлення не розвивалося (дані не наведено).

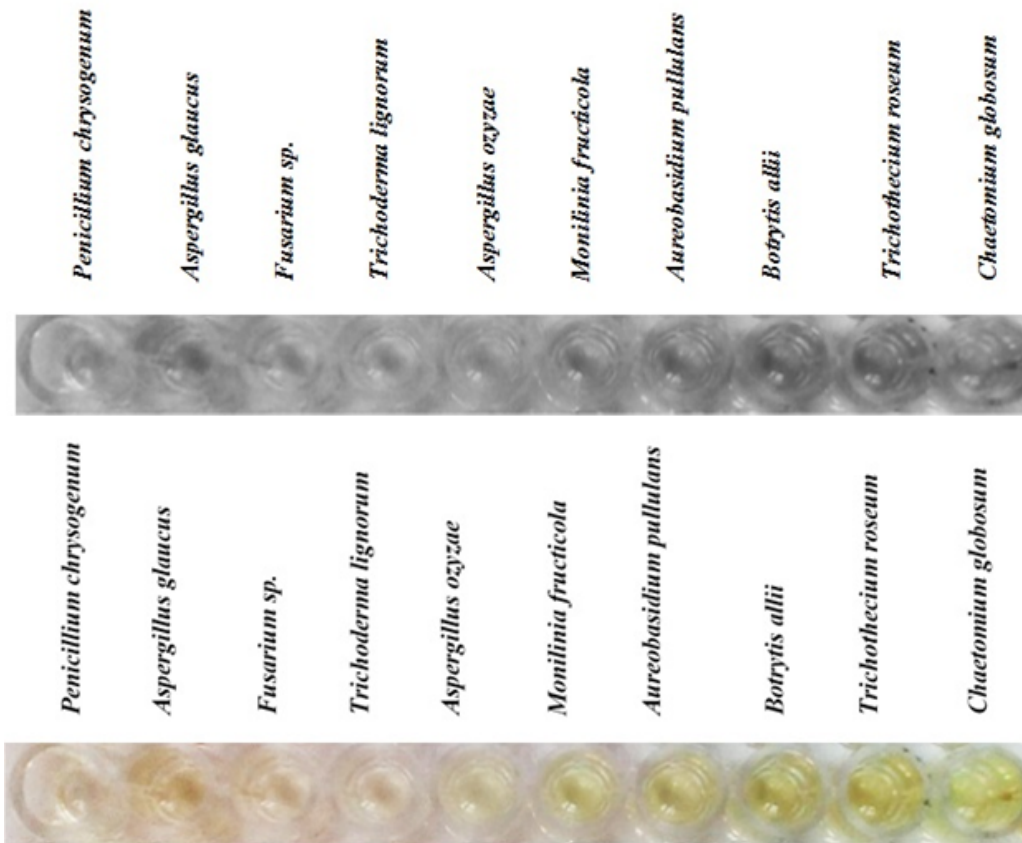


Рис. 4. Якісний аналіз активності КДІ у безклітинних екстрактах досліджуваних штамів грибів

На наступному етапі роботи для визначення активності КДІ було застосовано флуоресцентний метод. Виявилось, що у *M. fructicola*, *A. pullulans*, *B. allii*, *T. roseum* та *C. globosum* активність КДІ становила 0,06–0,15 од/мг (рис. 5), а це співрозмірно з результатами, отриманими під час дослідження бактерій (див. таблицю). У решти штамів активність КДІ була на межі чутливості методу.

Активність і субстратна специфічність КДІ деяких видів мікроорганізмів

Мікроорганізми	Субстратна специфічність	Питома активність безклітинних екстрактів, [Од./мг]	Літературні посилання
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Креатинін	0,014	[11, 12]
<i>Flavobacterium filamentosum</i>	Креатинін, цитозин	0,142	[5]
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Креатинін, цитозин	0,0112	[7]
<i>Pseudomonas putida 77</i>	Креатинін, цитозин	0,0729	[7]
<i>Proteus mirabilis</i>	Креатинін	0,0051	[7]

Тільки два із усіх досліджених штамів (*B. allii* та *C. globosum*,) виявилися здатними до утилізації креатиніну як джерела азоту. У безклітинних екстрактах *B. allii* та *C. globosum*, вирощених у середовищі з креатиніном як єдиним джерелом азоту, активність КДІ була відповідно у 2,5 та 1,5 разу вищою, ніж за вирощування у середовищі з глюкозою та нітратом натрію (рис. 6).

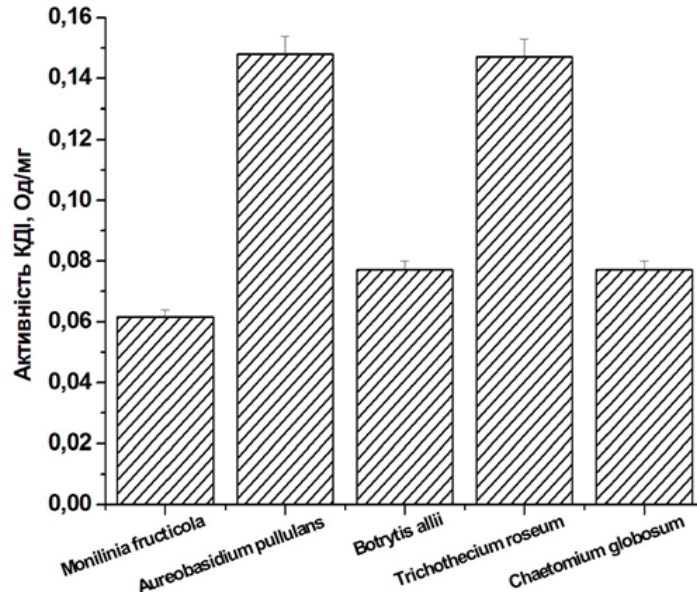


Рис. 5. Активність КДІ у безклітинних екстрактах досліджуваних штамів грибів

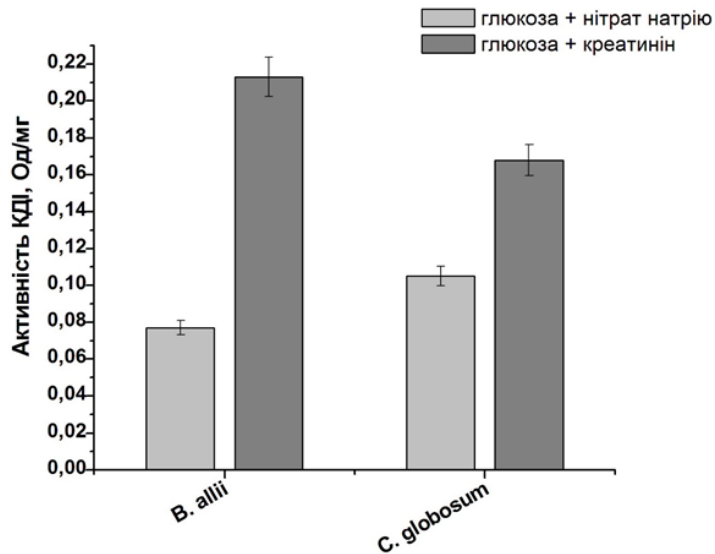


Рис. 6. Активність КДІ в безклітинних екстрактах грибів *B. allii* та *C. globosum*, вирощених у середовищі з глюкозою та креатиніном, а також із глюкозою та нітратом натрію як єдиними джерелами Карбону і Нітрогену

Усі досліджувані штами грибів аналізували на здатність секретувати КДІ в культуральне середовище. Однак жоден із перевірених штамів не виявляв позаклітинної активності КДІ (дані не наведено).

КДІ виділено й охарактеризовано для деяких видів бактерій і грибів (див. таблицю). Ферменти *P. putida*, *P. chlororaphis*, *E. coli*, *P. mirabilis* та *F. filamentosum* виявляють також цитозиндеаміназну активність [5, 7]. КДІ *C. glutamicum* ATCC 15990 [11] і анаеробних бак-

терій *Clostridium* sp. виявляє строгу субстратну специфічність і не каталізує дезамінування цитозину, тоді як відповідні ферменти *P. ovalis*, *Alcaligenes denitrificans* і *Arthrobacter* не здатні використовувати креатинін як субстрат [14]. Нами проведено скринінг штамів мікроорганізмів і виявлено креатиніндеїміназну активність у *M. fructicola*, *A. pullulans*, *B. allii*, *T. rosea* та *C. globosum*. *B. allii* та *C. globosum* мали вищу активність ферменту порівняно з іншими штамми. Додаткове зростання креатиніндеїміназної активності у *B. allii* та *C. globosum*, відповідно, у 2,5 та 1,5 разу виявлено за вирощування культур у середовищі, яке містило креатинін як єдине джерело азоту. Обидва штами можуть бути потенційними продуцентами КДІ за умови, що ферменти цих грибів виявляють строгу субстратну специфічність стосовно креатиніну. Отже, актуальним є дослідження цього питання, що передбачає отримання високоочищених препаратів КДІ із *B. allii* та *C. globosum*.

Робота виконана за підтримки МОН України в рамках програми «Наука в університетах» (проект 0118U000809) та НАН України в рамках науково-технічної програми «Смарт-сенсорні пристрої нового покоління на основі сучасних матеріалів та технологій» (проект № 13).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Гумецький Р. Я., Паляниця Б. М. Математичні методи в біології: теоретичні відомості, програмований практикум, комп'ютерні тести: навч. посіб. Львів: Видавничий центр ЛНУ ім. І. Франка, 2004. 112 с.
2. Марченко С. В., Зінченко О. А. Біосенсор на основі креатиніндеїмінази та рН-чутливого польового транзистора для аналізу креатиніну в сироватці крові // *Biotechnologia Acta*. 2013. Т. 6. № 5. С. 79–86.
3. Назаренко О. А., Сергеева Т. А., Солдаткін О. П. Креатинін та методи його визначення // *Біотехнологія*. 2009. Т. 2. № 1. С. 107–116.
4. Vanfi G. Serum creatinine concentrations in athletes: are they normal? // *Brazilian Journal of Biomotricity*. 2010. Vol. 4. N 3. P. 157–164.
5. Esders T. W., Lynn S. Y. Purification and properties of creatinine iminohydrolase from *Flavobacterium filamentosum* // *J. Biol. Chem.* 1985. Vol. 260. N 7. P. 3915–3922.
6. Hermann M., Knerr H. J., Mai N. et al. Creatinine and N-methylhydantoin degradation in two newly isolated *Clostridium* species // *Arch. Microbiol.* 1992. Vol. 157. N 5. P. 395–401.
7. Kim J. M., Shimizu S., Yamada H. Cytosine deaminase that hydrolyzes creatinine to N-methylhydantoin in various cytosine deaminase-forming microorganisms // *Arch. Microbiol.* 1987. Vol. 147. P. 58–63.
8. Kuo C. T., Wang P. Y., Wu C. H. Fluorometric determination of ammonium ion by ion chromatography using postcolumn derivatization with *o*-phthalaldehyde // *J. Chromatogr. A*. 2005. Vol. 1085. N 1. P. 91–97.
9. Narayanan Sh., Appleton H. O. Creatinine: A Review // *Clin. Chem.* 1980. Vol. 26. N 8. P. 1119–1126.
10. Sant W., Pourciel-Gouzy M. L., Launay J. et al. Development of a creatinine-sensitive sensor for medical analysis // *Sens. Actuator B-Chem.* 2004. Vol. 103. P. 260–264.
11. Uwajima T., Terada O. Properties of crystalline creatinine deiminase from *Corynebacterium lilium* // *Agric. Biol. Chem.* 1980. Vol. 44. N 8. P. 1787–1792.
12. Uwajima T., Terada O. Crystallization and some properties of creatinine deiminase from *Corynebacterium lilium* // *Agric. Biol. Chem.* 1976. Vol. 40. P. 1055–1056.
13. Uwajima T., Terada O. Production, purification and crystallization of creatinine deaminase of *Corynebacterium lilium* // *Agric. Biol. Chem.* 1977. Vol. 41. P. 339–344.

14. Wyss M., Kaddurah-Daouk R. Creatine and Creatinine Metabolism // *Physiological Reviews*. 2000. Vol. 80. N 3. P. 1107–1213.
15. Zakalskiy A. E., Stasyuk N. E., Gonchar M. V. Creatinine deiminase: characterization, using in enzymatic creatinine assay, and production of the enzyme // *Curr. Protein Pept. Sci*. 2019. Vol. 20. N 5. P. 465–470.

Стаття надійшла до редакції 04.09.19

доопрацьована 14.11.19

прийнята до друку 27.11.19

SCREENING MOLD STRAINS FOR AN ABILITY TO SYNTHESIZE CREATININE DEIMINASE

O. Demkiv¹, N. Stasyuk¹, A. Zakalskiy^{1,2}, O. Zakalska¹, T. Prokopiv^{1,2},
Y. Boretsky², M. Gonchar^{1,2,3}

¹*Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine
14/16, Drahomanov St., Lviv 79005, Ukraine*

²*Ivan Bobersky Lviv State University of Physical Culture
11, Kostyushko St., Lviv 79000, Ukraine*

³*Drohobych Ivan Franko State Pedagogical University
24, Ivan Franko St., Drohobych 82100, Ukraine
e-mail: demkiv@yahoo.com*

Determination of creatinine concentration in biological fluids is becoming increasingly relevant as a clinical test. Various chemical and physico-chemical methods have been proposed to determine creatinine concentration in biological samples, including various modifications of the well-known Jaffe color reaction, although it has several drawbacks, namely, a low specificity and sensitivity to positive and negative interference from related substances. In addition, the available methods are time consuming, require a complicated sample preparation procedure, expensive reagents, highly qualified personnel and, most importantly, do not allow real-time analysis. Therefore, increasing attention has been paid to enzymatic methods for the determination of creatinine, particularly, using microbial creatinine deiminase. In this regard, the search for new microorganisms – effective producers of specific creatinine deiminases – is an actual task for microbial enzymology and analytical biotechnology. We have analyzed creatinine deiminase activity for 10 strains of different molds: *Botrytis aclada*, *Botrytis allii* 100(5), *Monilinia fructicola*, *Sporobolomyces salmonicolor*, *Totula* sp., *Stachybotris chartarum*, *Pichiapini*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma lignorum*, *Aspergillus glaucus*, *Trichothecium roseum*, *Aureobasidium pullulans*. Among the strains tested, the enzyme activity was detected in the following species: *M. fructicola*, *A. pullulans*, *B. allii*, *T. roseum*, and *C. globosum*, although only two fungi, *B. allii* and *C. globosum*, were able to use creatinine as the sole nitrogen source. Creatinine deiminase activity in cell free extracts of *B. allii* and *C. globosum*, grown in glucose medium supplemented with creatinine (as the sole carbon and nitrogen source, respectively) was 2.5 and 1.5 times higher, related to that for the strains grown in glucose-sodium nitrate medium. Therefore, the fungi *B. allii* and *C. globosum* can be used for isolation of creatinine deiminase to be used in construction of biosensors selective to creatinine.

Keywords: creatinine, creatinine deiminase, molds, screening

ВПЛИВ ДЕЯКИХ ЧИННИКІВ ШЛУНКОВО-КИШКОВОГО ТРАКТУ НА ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ ЛАКТОБАЦИЛ, ВИДІЛЕНИХ ІЗ РІЗНИХ ЕКОЛОГІЧНИХ НІШ

І. Страшнова, Г. Ямборко*, Н. Васильєва

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова
вул. Дворянська, 2, Одеса 65082, Україна
e-mail: jamborkoann@ukr.net

Метою роботи було дослідити стійкість бактерій роду *Lactobacillus* до деяких агресивних чинників шлунково-кишкового тракту. Використання лактобацил як пробіотичних штамів висуває низку вимог до цієї групи мікроорганізмів, зокрема, пов'язаних із їхньою здатністю виживати в умовах підвищеної кислотності й наявності ферментів шлунково-кишкового тракту. У роботі використано 13 штамів лактобацил, виділених із різних джерел – із фекалій дітей молодшого віку, зі самоквасних овочів і з м'ясної сировини. Стійкість до секретів макроорганізму, що впливають на лактобацили під час їхнього транзиту через шлунково-кишковий тракт, досліджували *in vitro*, використовуючи різні значення рН (3,0–8,0) і травні ферменти пепсин та трипсин. Експериментально встановлено і статистично підтверджено, що досліджені штами лактобацил проявили варіабельну реакцію на дію різних значень рН і травних ферментів залежно від конкретного штаму та діючого чинника. Виявлено, що штами, ізольовані з м'ясної сировини, виявили найвищий рівень резистентності до різних значень рН, а штами, ізольовані з автоферментованих овочів, виявилися стійкішими до дії травних ферментів. Було показано, що незважаючи на вказану залежність, усередині кожної вибірки є неоднорідність відгуку штамів на дію чинника, що підтверджує варіабельність штамів молочнокислих бактерій. Проведеним математичним аналізом встановлено, що досліджені лактобацили залежно від ознак, які вивчали, утворюють кілька кластерів і підкластерів. Було показано, що первинне джерело виділення впливало на формування стійкості штамів лактобактерій до зміни рН середовища, однак не впливало на формування стійкості до дії ферментів шлунково-кишкового тракту. Отримані результати свідчать про доцільність подальших досліджень, необхідних, щоби відбирати штами лактобацил для отримання пробіотичних препаратів, і сприяють створенню раціональнішого підходу до пошуку потенційних пробіотичних штамів із наперед заданими властивостями.

Ключові слова: лактобацили, пробіотичні властивості, рН, пепсин, трипсин

Основою великої кількості пробіотичних препаратів є молочнокислі бактерії, зокрема, представники роду *Lactobacillus*. Проте, незважаючи на давність і тривалість застосування, масштабність вивчення лактобацил, пошук і виділення нових пробіотично перспективних штамів триває [2]. Причин цього багато, але основними є створення нових препаратів і продуктів із поліпшеними властивостями, зокрема, й із різними смако-ароматичними відтінками. Окрім цього, не рідкісними є випадки, коли промислові пробіотичні штами зменшують або втрачають активність, а інколи – навіть життєздатність [1].

Завдяки поширеності у довкіллі виділити молочнокислі бактерії можна із різних джерел [9]. Перед конструюванням біопрепаратів нові штами обов'язково перевіряють на відповідність критеріям (вимогам) до бактерій-пробіотиків [7]. Для отримання повноцінного ефекту бактерії, що є у складі пробіотиків, повинні, зокрема, бути стійкими

до низького рН шлункового соку і травних ферментів та зберігати життєздатність під час проходження через шлунково-кишковий тракт.

Метою роботи було дослідити *in vitro* стійкість нових ізолятів лактобацил, виділених із різних екологічних ніш, до деяких чинників шлунково-кишкового тракту.

Матеріали та методи

У дослідженнях використано штами бактерій роду *Lactobacillus*, ізольовані із різних джерел. Штами *Lactobacillus* sp. Б1, Б3, Б4, Б5, Б6, О1 виділено із автоферментованих овочів, *Lactobacillus* sp. М1, М2, М3, М6 – зі сирової м'ясної сировини, *Lactobacillus* sp. 146, 275, 175 – із фекалій дітей молодшого віку.

Досліджували стійкість штамів лактобацил до різних значень рН (3,0–8,0), а також до дії травних ферментів – пепсину (16 Од/мг) і трипсину (39 Од/мг) *in vitro*.

Рідке середовище MRS із різними значеннями рН у діапазоні від 3,0 до 8,0 готували, використовуючи HCl (0,1 М) або NaOH (20 %) для досягнення відповідного значення кислотності середовища.

Розчини ферментів готували у таких буферних сумішах:

кристалічний пепсин – у соляно-гліциновому буфері з рН 2,0–2,2, трипсин – у фосфатному буфері з рН 8,0–8,5.

Кінцеві концентрації ферментів становили 0,1 мг/мл.

Добові культури лактобацил, вирощених у рідкому поживному середовищі MRS, вносили у пробірки з відповідними варіантами експериментальних середовищ. Контролем були посіви добових культур лактобацил у рідке середовище MRS. Інкубували протягом 24 год за температури 37 °С. Життєздатність досліджених штамів оцінювали, вимірюючи оптичну густину суспензії бактерій у контрольних і експериментальних пробірках через 24 год культивування. Вимірювання проводили фотометричним методом за $\lambda=600$ нм на спектрофотометрі (SmartSpec™ Plus Spectrophotometr, серія – 273 BR 05027) [3].

Усі експерименти проведено у трьох повторах. Порівняльний аналіз результатів досліджень проводили, використовуючи критерії Вілкоксона та Краскела-Волліса [5]. Статистичне опрацювання результатів здійснювали, застосовуючи програму Calck та R 3.6.0 [4].

Результати і їхнє обговорення

Пробіотичні бактерії можуть чинити позитивний вплив на макроорганізм тільки за умови виживання під час транзиту у шлунково-кишковому тракті [8]. Для того, щоб простежити залежність пробіотичних властивостей молочнокислих бактерій від джерела виділення, усі досліджені штами розглядали як сукупність із трьох незалежних вибірок. До першої вибірки було віднесено штами, ізольовані з овочів, до другої – штами з м'ясної сировини, до третьої – штами, ізольовані з фекалій дітей. За дослідження *in vitro* стійкості 13 штамів бактерій роду *Lactobacillus*, виділених із різноманітних джерел, до різних значень рН, пепсину і трипсину виявлено, що ця ознака варіабельна і залежить від штаму та діючого чинника.

Відомо, що лактобацили, які входять до складу пробіотичних препаратів і продуктів функціонального харчування, в організмі людини зазнають короткочасного впливу різних значень рН. Оскільки секреція шлункової кислоти є основним захисним механізмом проти більшості мікроорганізмів, доцільно було перевірити ступінь стійкості досліджених штамів до кислотності середовища. Перевірка здатності лактобацил рости у середовищах з різним початковим значенням рН показала, що найнегативнішими є умови, коли значення рН середовища менше 5,0 (рис. 1).

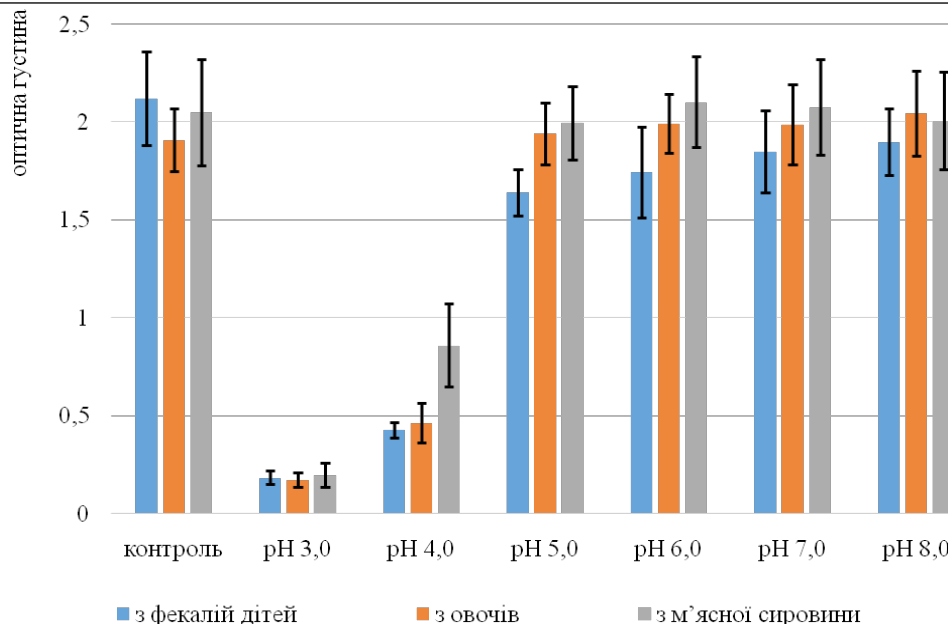


Рис. 1. Усереднені показники оптичної густини досліджених штамів лактобацил під час росту в середовищах із різними початковими значеннями рН залежно від первинного джерела виділення

У діапазонах рН від 5,0 до 8,0 коливання показника оптичної густини досліджених штамів були незначними.

Визначено, що стійкість до коливань рН середовища залежить від досліджуваного штаму. Збереження лактобацилами життєздатності під час росту в середовищах зі зниженим рН зумовлено, на нашу думку, здатністю молочнокислих бактерій підтримувати постійне значення рН усередині клітин. Аналогічні дані показано в роботі J. Schroeter і T. Klaenhammer (2009), які довели, що здатність до збереження гомеостазу усередині клітин молочнокислих бактерій є одним із найважливіших параметрів, характерних для цих мікроорганізмів [10]. Вони встановили, що регуляція внутрішньоклітинного і цитоплазматичного рН у молочнокислих бактерій здійснюється за участю АТФ-ази і що активність цього процесу зростає в міру зниження рН. Так, за рН 3,0 максимальні показники оптичної густини реєстрували для штамів *Lactobacillus* sp. 146, B4, M1 і M3; за рН 4,0 – для штамів *Lactobacillus* sp. 175, M1, M2 і M6.

У разі кислотності рН від 5,0 до 8,0 в більшості випадків максимальні показники оптичної густини були зареєстровані для штамів *Lactobacillus* sp. B6, M1 і M2. Тобто отримані дані підтверджують, що здатність зростати за різних показників кислотності середовища залежить від індивідуальних властивостей штаму.

Однак після проведення статистичного аналізу отриманих результатів було показано, що джерело виділення впливає на формування штампспецифічної стійкості до кислотності середовища. Так, найбільш однотипною за показником Краскела-Волліса (KW) була реакція на зміну рН у штамів, ізолюваних із фекалій дітей (табл. 1).

Штами, ізолювані з м'ясної сировини, навпаки, демонстрували неоднорідний відгук, а ростовий показник штамів (за показником оптичної густини), ізолюваних зі самоквасних овочів, є неоднорідним за показників рН від 3,0 до 6,0.

Таблиця 1

Порівняння усереднених показників стійкості досліджених штамів лактобацил до різних концентрацій рН за критерієм (p≤0,05)

Кислотність середовища	Критерій Краскела-Волліса для штамів лактобацил		
	зі самоквасних овочів	із м'ясої сировини	із фекалій дітей
pH 3,0	KW =18,46, p=0,0024	KW =10,650, p=0,0138	KW =2,80, p=0,2457
pH 4,3	KW =11,37, p=0,04450	KW =10,455, p=0,0150	KW =2,80, p=0,2457
pH 5,0	KW =11,37, p=0,04450	KW =9,580, p=0,02240	KW =2,34, p=0,3094
pH 6,0	KW =11,20, p=0,04750	KW =10,380, p=0,0155	KW =1,86, p=0,3941
pH 7,0	KW =9,98, p=0,0750	KW =9,580, p=0,0224	KW =1,42, p=0,4909
pH 8,0	KW =9,94, p=0,0760	KW =8,420, p=0,0379	KW =2,09, p=0,3510

Результати кластерного аналізу за показником стійкості досліджених штамів до рН у межах від 3,0 до 5,0 підтверджують висловлене припущення, що джерело виділення бактерій може впливати на формування штамспецифічної стійкості до кислотності середовища (рис. 2).

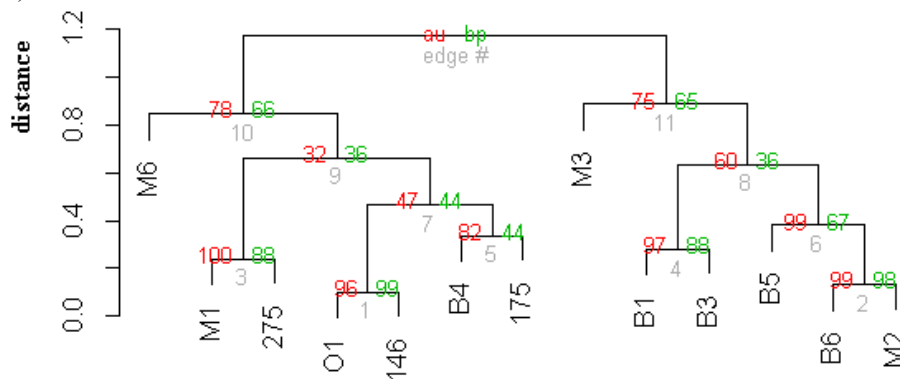


Рис. 2. Дендрограма результатів кластеризації показників стійкості досліджених штамів лактобацил до рН у межах від 3,0 до 5,0 (кластеризація даних із використанням функції pvclust за pboot = 1000; матриця відстаней – method “canberra”, спосіб агрегування – method “complete”)

За показником, який перевіряли, до одного кластеру входять штами лактобактерій з автоферментованих овочів (*Lactobacillus* sp. B1, B3, B5, B6) та м'ясої сировини (*Lactobacillus* sp. M3 і M2). Показники оптичної густини саме для цих штамів були на рівні середнього арифметичного для цієї підгрупи даних, тобто ці штами демонстрували однотипність біологічного відгуку на низькі значення рН середовища.

Найрізноманітнішим за своїм складом був інший підкластер, до якого входили штами, виділені з різних еконіш. В окремий кластер винесено штам *Lactobacillus* sp. M6, який характеризувався високим рівнем резистентності до високих значень рН. При цьому слід відмітити, що показник вірогідності формування внутрішнього вузла був досить високим для штамів із різних джерел первинного виділення.

Аналіз результатів кластеризації показників стійкості штамів лактобацил до значень рН у межах від 6,0 до 8,0 показав, що кластери формують штами, які були ізольовані з різних первинних джерел (рис. 3).

Так, до меншого кластеру входять штами *Lactobacillus* sp. B1, B3, B5 (зі самоквасних овочів), *Lactobacillus* sp. M2 (із м'ясої сировини) і *Lactobacillus* sp. 146 (із фекалій дітей). До більшого зі сформованих кластерів входять усі інші штами. В окремий кластер винесено штам *Lactobacillus* sp. B6, який характеризувався високим рівнем резистентності до високих значень рН.

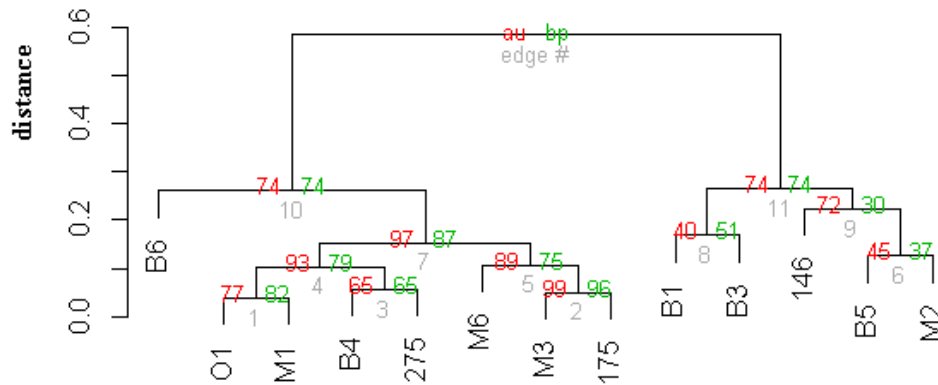


Рис. 3. Дендрограма результатів кластеризації показників стійкості досліджених штамів лактобацил до рН у межах від 6,0 до 8,0 (кластеризація даних з використанням функції *pvclust* за *nboot* = 1000; матриця відстаней – method “canberra”, спосіб агрегування – method “complete”)

Також вважали за доцільне перевірити виживання досліджених штамів лактобацил в умовах, що виникають під час проходження через травний тракт. Перевірка потенційних пробіотиків на стійкість стосовно ферментів шлунково-кишкового тракту необхідна, оскільки разом із дією інших чинників мікроорганізми будуть перебувати під впливом їхньої потужної протеолітичної дії. Пепсин (фермент шлунку) і трипсин (фермент підшлункової залози) є гідролітичними агентами для білків, дія яких суворо специфічна.

Під впливом кислого середовища у шлунку пепсиноген переходить в активний пепсин, який характеризується сильною антимікробною дією, що запобігає розвитку гнильних і бродильних процесів і перешкоджає проникненню патогенних бактерій у кишечник [6].

Наведені на рис. 4 графічні показники середніх значень оптичної густини досліджених штамів під дією пепсину порівняно з контролем свідчать, що всі протестовані штами демонстрували виживання практично на одному рівні, незалежно від первинного джерела виділення.

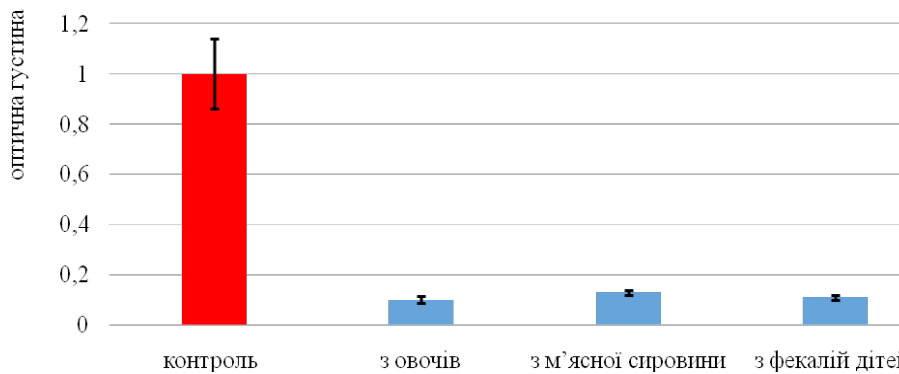


Рис. 4. Усереднені показники оптичної густини досліджених штамів лактобацил до дії пепсину залежно від первинного джерела виділення

Отримані дані підтверджені розрахованими значеннями критерію Вілкоксона між усередненими значеннями стійкості штамів за наявності пепсину залежно від джерела виділення (табл. 2).

Таблиця 2

Значення критерію Вілкоксона між усередненими показниками стійкості досліджених штамів лактобацил до пепсину залежно від джерела виділення

Джерело виділення лактобацил	Критерій Вілкоксона за вибірками		
Самоквасні овочі	W=0,0, p-value=0,100	W=14,0, p-value=0,746	W=7,0, p-value=0,694
М'ясна сировина	W=14,0, p-value=0,746	W=0,0, p-value=0,100	W=2,0, p-value=0,280
Фекалії дітей	W=7,0, p-value=0,694	W=2,5, p-value=0,280	W=0,0, p-value=0,100

Трипсиноген є ферментом підшлункової залози. Саме він під впливом ентерокинази кишкового соку перетворюється на активний протеолітичний фермент – трипсин. Оптимальне значення рН для трипсину становить 7,8 і відповідає значенню рН соку підшлункової залози та кишкового соку. У кишечнику під впливом трипсину розщеплюються білки і високомолекулярні поліпептиди, в результаті чого утворюються низькомолекулярні поліпептиди й амінокислоти.

За результатами досліджень, трипсин, на відміну від пепсину, майже не чинив негативного впливу на показники життєздатності досліджених штамів лактобацил (рис. 5).

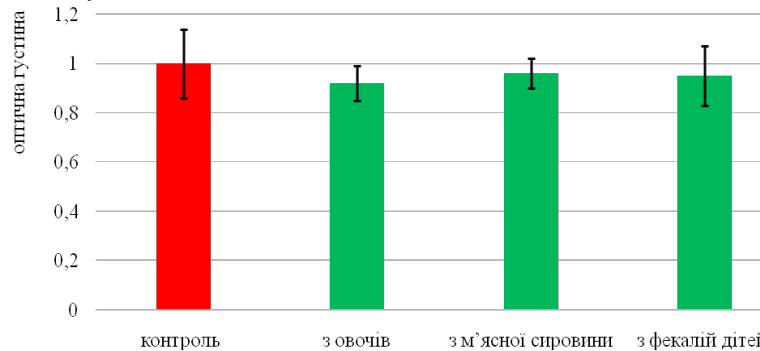


Рис. 5. Усереднені показники оптичної густини штамів лактобацил до дії трипсину залежно від первинного джерела виділення

Як і у попередньому досліді, було показано, що первинне джерело виділення не впливало на формування стійкості досліджених штамів до трипсину, й усі досліджені штами реагували на дію чинника майже ідентично. Достовірність прийняття нульової гіпотези підтверджено показниками критерію Вілкоксона, наведеними у табл. 3.

Таблиця 3

Показники критерію Вілкоксона між усередненими показниками стійкості досліджених штамів лактобацил до трипсину залежно від джерела виділення

Джерело виділення лактобацил	Критерій Вілкоксона за вибірками		
Самоквасні овочі	W=0,0 p-value=0,100	W=10,5, p-value=0,829	W=7,0, p-value=0,696
М'ясна сировина	W=10,5, p-value=0,829	W=0,0, p-value=0,100	W=5,0, p-value=0,857
Фекалії дітей	W=7,0, p-value=0,696	W=5,0, p-value=0,857	W=0,0, p-value=0,100

Найстійкішими до дії пепсину виявилися штами *Lactobacillus* sp. 175, O1, B5, M1, M2, M3. Найменш стійкими – *Lactobacillus* sp. 146 та B6 (рис. 6).

Максимально стійкими до дії трипсину виявилися штами *Lactobacillus* sp. 275, B5 і M2, найменш стійкими – штами *Lactobacillus* sp. M3 і 146. Слід відмітити, що штами *Lactobacillus* sp. B5 і *Lactobacillus* sp. M2 виявилися стійкими до впливу обох ферментів, а штам *Lactobacillus* sp. 146, навпаки, виявився найбільш чутливим до їхньої дії.

Наведені на рис. 7 і 8 дендрограми, отримані за результатами кластерного аналізу, наявно демонструють, що реакція лактобацил на дію ферментів шлунково-кишкового

тракту є штамспецифічною і залежить від біологічних властивостей штаму, а місце первинного виділення не впливає на формування стійкості до дії ферментів.

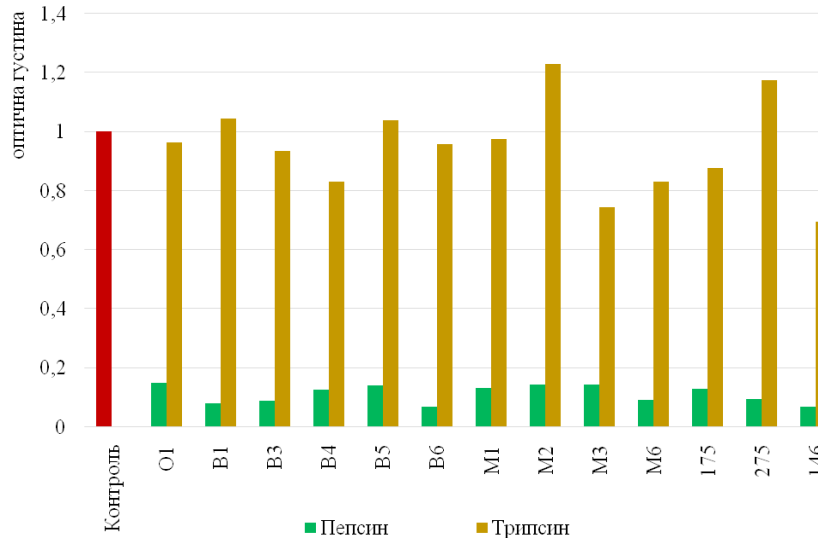


Рис. 6. Зміна показників оптичної густини досліджених штамів *Lactobacillus* sp. під дію пепсину і трипсину

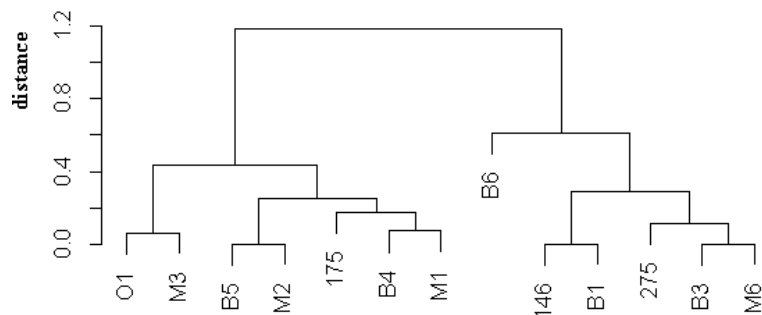


Рис. 7. Дендрограма результатів кластеризації показників стійкості досліджених штамів лактобацил до дії пепсину (матриця відстаней – method “canberra”, спосіб агрегування – method “complete”)

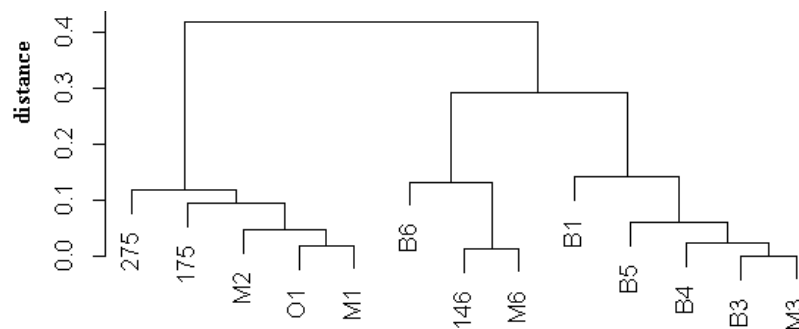


Рис. 8. Дендрограма результатів кластеризації показників стійкості досліджених штамів лактобацил до дії трипсину (матриця відстаней – method “canberra”, спосіб агрегування – method “complete”)

Отже, експериментально встановлено і статистично підтверджено, що досліджені штами лактобацил проявили варіабельну реакцію на дію різних значень рН і травних ферментів, яка залежить від біологічних властивостей штаму та діючого чинника. Було показано, що первинне джерело виділення може частково впливати на формування стійкості штамів молочнокислих бактерій до зміни рН середовища, однак не впливає на формування стійкості до дії ферментів шлунково-кишкового тракту.

Показано, що штами, ізольовані з м'ясної сировини, характеризувалися найвищим рівнем резистентності до різних значень рН, а штами, ізольовані з автоферментованих овочів, виявилися стійкішими до дії травних ферментів. Однак, незважаючи на вказану залежність, усередині кожної вибірки є неоднорідність реакції штамів на дію чинника, що свідчить про варіабельність штамів молочнокислих бактерій.

Отримані дані дають змогу припустити, що досліджені штами лактобактерій, пройшовши через верхні відділи шлунково-кишкового тракту, будуть потрапляти у кишечник в активному стані. Тому вони можуть бути рекомендовані для подальших досліджень інших пробіотичних властивостей, необхідних для відбору найперспективніших штамів для конструювання пробіотиків.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Дехтяренко Н. В., Шинкаренко Л. М., Дуган О. М. Критерії відбору пробіотичних штамів мікроорганізмів // Наукові записки. Біологія та екологія. 2007. Т. 67. С. 30–36.
2. Калініченко С. В., Коротких С. В., Тищенко І.Ю. Сучасні напрямки створення та удосконалення пробіотиків // Укр. біофарм. журнал. 2016. № 1 (42). С. 4–9.
3. Нетрусов А. И., Егорова М. А., Захарчук Л. М. Практикум по микробиологии: уч. пособ. для студ. высш. учеб. заведений. М.: Академия, 2005. С. 467–478.
4. Ромакин В. В. Комп'ютерний аналіз даних. К.: МДГУ ім. Петра Могили, 2006. 150 с.
5. Сиделев С. И. Математические методы в биологии и экологии: введение в элементарную биометрию: уч. пособ. Ярославль: ЯрГУ, 2012. 140 с.
6. Fernández C., Sánchez-Seiquer P., Sánchez A. Use of a total mixed ration with three sources of protein as an alternative feeding for dairy goats on Southeast of Spain // Pakistan J. Nutr. 2003. Vol. 2 (1). P. 18–24.
7. Ljungh A., Wadström T. *Lactobacillus* Molecular Biology: From Genomics to Probiotics. UK: Caister Academic Press. 2009. 206 p.
8. Ohland C. L., MacNaughton W. K. Probiotic bacteria and pontestinal epithelial barrier function // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 2010. Vol. 6 (298). P. 807–819.
9. Pidgorskyi V. S., Kovalenko N. K., Garmasheva I. L. Taxonomic research, biological properties and biosynthetic activity of lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from various natural ecological niches // Mikrobiolohichniy Zhurnal. 2016. Vol. 78 (6). P. 8–18.
10. Schroeter J., Klaenhammer T. Genomics of lactic acid bacteria // FEMS Microbiol. Lett. 2009. Vol. 292 (1). P. 1–6.

Стаття надійшла до редакції 16.10.19

доопрацьована 22.11.19

прийнята до друку 28.11.19

**THE INFLUENCE OF SOME FACTORS OF THE DIGESTIVE TRACT ON THE
LACTOBACILLI LIVES FROM DIFFERENT ENVIRONMENTAL NICHES****I. Strashnova, G. Yamborko, N. Vasylieva***Odessa I.I. Mechnikov National University
2, Dvoryanska St., Odesa 65082, Ukraine
e-mail: jamborkoann@ukr.net*

The aim of our work was to study the resistance of lactobacilli strains to some aggressive factors of gastrointestinal tract. The use of lactobacilli as a probiotic submits a number of requirements to this group of microorganisms associated with their ability to survive in conditions of high acidity and in the presence of enzymes of the gastrointestinal tract. 13 lactobacilli strains isolated from different sources (auto-fermenting vegetables, children feces and raw meat material) were used in this work. Resistance to secretions of the macroorganism affecting to lactobacilli during their transit through the gastrointestinal tract was investigated *in vitro* using different pH values (3,0–8,0) and digestive enzymes – pepsin and trypsin. It has been experimentally established and statistically confirmed that the tested lactobacilli strains showed a variable response to the action of different pH values and digestive enzymes, which was determined between a certain strain and the active factor. It was found that strains isolated from raw meat had the highest levels of resistance to different pH values, and strains isolated from auto-fermented vegetables were more resistant to digestive enzymes. It was shown that despite this dependence, there was a heterogeneous response of the strains to each aggressive factor, confirming the variability of the lactic acid bacteria strains. The mathematical analysis showed that the tested studied lactobacilli form several clusters and subclusters depending on the studied features. It has been shown that the primary source of lactobacilli isolation partially influences the formation of resistance of lactic acid bacteria to aggressive factors of the gastrointestinal tract. The obtained results indicate the feasibility of further studies that required for the selection of lactobacillus strains to produce probiotic preparations, and contribute to a more rational approach to the search for potential probiotic strains with predetermined properties.

Keywords: lactobacilli, probiotic properties, pH, pepsin, trypsin

ЧУТЛИВІСТЬ ЕРИТРОЦИТІВ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ ДО СТРЕСОВОГО ВПЛИВУ

Л. Коба¹, О. Ніпот², О. Шапкіна², А. Жуйкова¹, В. Бондаренко¹

¹*Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна
пл. Свободи, 4, Харків 61022, Україна*

²*Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України
вул. Переяславська, 23, Харків 61016, Україна
e-mail: nipotel71@gmail.com*

У роботі досліджено вікові особливості чутливості еритроцитів 1- і 12-місячних щурів до гіпертонічних умов середовища після їхньої модифікації геміном.

Встановлено, що рівень гемолітичного ушкодження еритроцитів як 1-місячних, так і 12-місячних щурів залежить від часу інкубації в гіпертонічних розчинах сахарози та її концентрації. Значне збільшення ушкодження відбувається за концентрацій 0,5–0,8 М під час інкубації 2, 10, 30 і 60 хв (8–10 разів). Аналіз пошкодження клітин залежно від концентрації сахарози за одного і того ж часу інкубації показав, що для 10, 30, і 60 хв можна спостерігати початкове зростання чутливості, досягнення максимуму (10 хв – 0,8 М, 30 хв – 0,7 М, 60 хв – 0,6 М) і подальше її зниження як для 1-місячних, так і для 12-місячних щурів.

Встановлено, що обробка геміном підвищує рівень гіпертонічного пошкодження еритроцитів щурів 1-місячного віку після їхньої інкубації в сахарозних середовищах. Максимальна різниця в чутливості оброблених і контрольних клітин спостерігається за часу інкубації 10 хв і 30 хв (33±4 % та 18±2 %, 56±4 % та 44±3 % відповідно). Рівень пошкодження еритроцитів щурів 12-місячного віку за цих же умов змінюється незначно: для 10 і 30 хв інкубації (21±3 % та 15±2 %, 27±3 % та 23±2 %, відповідно). Оскільки гемін є модифікатором білка 4.1, змінюючи його структуру, а отже, й функцію, отримані дані вказують на важливість зв'язків білок 4.1-спектрин для підтримки механічної стабільності еритроцитів молодих тварин.

Загальний рівень гемолітичного пошкодження еритроцитів 12-місячних тварин нижчий як для контрольних, так і для модифікованих клітин після інкубації в усіх концентраціях сахарози. Відсоток гемолізу знижується у 2-3 рази.

Таким чином, еритроцити 1-місячних і 12-місячних щурів значно відрізняються за чутливістю як до модифікації геміном, так і до стресового впливу гіпертонічних розчинів сахарози. Клітини старших тварин демонструють нижчий рівень пошкодження в обох випадках. Можливо, це пов'язано з меншою доступністю макромолекулярних комплексів, що підтримують стабільність мембрани, для модифікуючого впливу геміну і середовищ із низькою іонною силою, а також різним розподілом навантаження на макромолекулярні структури, що підтримують цілісність і механічну стабільність мембрани у тварин різного віку.

Ключові слова: еритроцити щурів, гемін, сахарозне середовище, цитоскелет

Функціонально важливою особливістю еритроцита є його здатність піддаватися значним повторним деформаціям за збереження структурної цілісності. Це дає йому змогу проникати в найдрібніші капіляри, забезпечуючи тканини киснем. Численні дослідження показали, що гемореологічні чинники суттєво змінюються у процесі старіння організму

[1, 14, 16, 18, 21, 22]. У більшості досліджень повідомлялося про збільшення в'язкості плазми і цільної крові [16, 22], збільшення агрегації та порушення здатності до деформації еритроцитів у старшому віці [1, 8, 22]. Зокрема, в роботі [14] показано, що розвиток окисного стресу тісно пов'язаний із віковим статусом щурів. Так, у старших тварин підвищується рівень перекисного окиснення ліпідів, знижується вміст відновленого глутатіону, змінюється активність редокс-системи, яка допомагає клітинам реагувати на зміни окисно-відновного потенціалу. В роботах [16, 22] показано, що мікров'язкість мембран еритроцитів залежить від віку піддослідних тварин. Підвищена мікров'язкість мембрани впливає на активність інтегральних транспортних білків, відповідальних за іонний гомеостаз у клітинах. Зокрема, це може вплинути на деформованість еритроцитів і їхнє проходження через капіляри, викликає гіпоксію та провокує виникнення серцево-судинних захворювань. Дані, отримані з використанням щурів як експериментальних моделей вивчення впливу віку на параметри еритроцитів, узгоджуються зі змінами відповідних показників еритроцитів людини у процесі старіння і можуть використовуватися в геронтологічних дослідженнях [11].

Особливості вікового статусу клітини можуть мати прихований характер і проявляти себе тільки поза фізіологічною нормою, тому для виявлення їх необхідно піддати клітину стресовому впливові. Так, відомо, що стійкість еритроцитів людини та ссавців до нефізіологічних умов середовища залежить від стану структурно-функціонального комплексу цитоскелет – плазматична мембрана [2, 3, 5]. Істотну роль у цьому відіграють білки, які визначають взаємозв'язок між компонентами цитоскелету і мембраною. Модифікацію цього комплексу можна здійснювати як зміною загального стану клітини, так і більш обмеженими впливами на певні клітинні структури. Так, використання продукту окиснення гемоглобіну – геміну – призводить до модифікації макромолекулярного комплексу білок 4.1-актин-спектрин. Він визначає вузлові з'єднання мембрано-скелетної мережі, забезпечує механічну стійкість еритроцита [9, 15, 19].

Метою роботи було дослідити вікові особливості чутливості еритроцитів 1- і 12-місячних щурів до гіпертонічних умов середовища після їхньої модифікації.

Матеріали та методи

Дослідження проводили на еритроцитах самців щурів лінії Wistar 1- і 12-місячного віку. Кров одержували під час декапітації тварин під легким ефірним наркозом (стабілізатор гепарин, 500 од/мл). Роботу з тваринами проводили відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах» (V Національний конгрес із біоетики, Київ, 2013), що були узгоджені з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Еритроцити відмивали 0,01 М Na-фосфатним буфером, що містить 0,15 М NaCl, за рН=7,4, шляхом центрифугування (3000 об/хв), упродовж 5 хв, зберігали за температури 0 °С не більше години.

Для модифікації еритроцитів геміном (кінцева концентрація 20 мкМ) 30 %-ву суспензію клітин обробляли модифікатором упродовж 10 хв за температури 37 °С. Нативні та модифіковані еритроцити витримували в гіпертонічних розчинах сахарози із різною концентрацією неелектроліту (0,27–1,0 М) за 37 °С упродовж 2, 10, 30 та 60 хв.

Стійкість еритроцитів у гіпертонічних умовах середовища оцінювали за вмістом гемоглобіну в супернатанті зразків після центрифугування за 3000 об/хв упродовж 3 хв. Вміст гемоглобіну визначали спектрофотометрично за 543 нм [4]. Результати дослідження оброблені стандартними методами варіаційної статистики. Дані представлено у вигляді $M \pm m$, $n=5-6$ (середнє арифметичне значення – M ; стандартна похибка середнього арифметичного – m). Для перевірки статистичної значущості відмінностей досліджуваних

числових показників використовували критерій Манна-Вітні. Відмінності вважали значущими за $P < 0,05$.

Результати і їхнє обговорення

На рис. 1 представлено дані про рівні гемолізу еритроцитів 1-місячних щурів у гіпертонічних розчинах сахарози за різного часу інкубації. Видно, що збільшення часу інкубації обумовлює зростання пошкодження клітин. Однак ступінь наростання чутливості залежить від концентрації сахарози. Так, значне збільшення рівня гемолізу відбувається за концентрацій 0,5–0,8 М (8–10 разів). Якщо розглянути пошкодження клітин залежно від концентрації сахарози за одного і того ж часу інкубації, то для 10, 30, і 60 хв можна спостерігати початкове зростання рівня гемолітичного пошкодження, досягнення максимуму (10 хв – 0,8 М, 30 хв – 0,7 М, 60 хв – 0,6 М) і подальше зниження показників гемолізу.

Для еритроцитів 1-місячних щурів, які попередньо були модифіковані геміном, зберігаються ті ж залежності від концентрації та часу інкубації (рис. 2). Слід зазначити, що для модифікованих клітин більш виражений рівень гемолізу порівняно з контрольними еритроцитами спостерігається для 10 і 30 хв інкубації ($33 \pm 4\%$ та $18 \pm 2\%$, $56 \pm 4\%$ та $44 \pm 3\%$ відповідно).

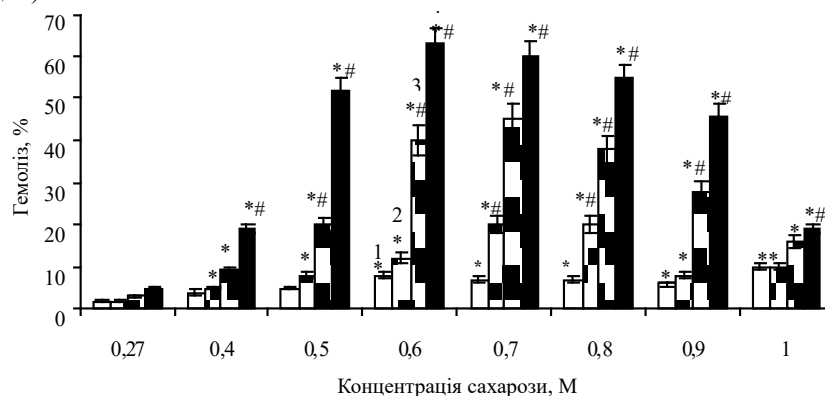


Рис. 1. Рівень гіпертонічного гемолізу еритроцитів 1-місячних щурів після інкубації у розчинах сахарози. Час інкубації: 1 – 2 хв; 2 – 10 хв; 3 – 30 хв; 4 – 60 хв

Примітка: * – різниця вірогідна, порівняно з рівнем гемолізу клітин, що не піддавалися дії гіпертонічних розчинів сахарози, $P < 0,05$; # – різниця вірогідна, порівняно з рівнем гемолізу клітин, що інкубувались у гіпертонічних розчинах сахарози 2 хв, $P < 0,05$

Аналогічні результати для 12-місячних тварин представлені на рис. 3 і 4. Видно, що загальний рівень пошкодження в цьому випадку нижчий як для контрольних, так і для модифікованих клітин за усіх концентрацій сахарози. Відсоток гемолізу знижується у 2–3 рази. Крім того, чутливість контрольних і модифікованих геміном еритроцитів до дії гіпертонічних розчинів сахарози практично не відрізняється. Для 10 і 30 хв інкубації: $21 \pm 3\%$ та $15 \pm 2\%$, $27 \pm 3\%$ та $23 \pm 2\%$ відповідно.

Механічна стійкість клітини забезпечується мембранно-асоційованим білковим скелетом. Дефекти або дефіцит компонентів останнього призводять до нестабільності білкової мережі, а отже, клітини. Спрямована зміна елементів цитоскелет-мембранного комплексу дає змогу оцінити стан плазматичної мембрани під впливом різних факторів, а також вікові зміни.

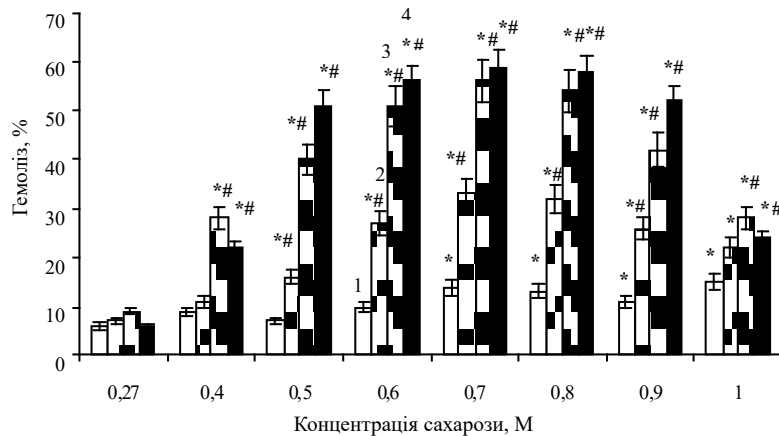


Рис. 2. Рівень гіпертонічного гемолізу модифікованих геміном еритроцитів 1-місячних щурів після інкубації у розчинах сахарози. Час інкубації: 1 – 2 хв; 2 – 10 хв; 3 – 30 хв; 4 – 60 хв

Примітка: * – різниця вірогідна, порівняно з рівнем гемолізу клітин, що не піддавалися дії гіпертонічних розчинів сахарози, $P < 0,05$; # – різниця вірогідна, порівняно з рівнем гемолізу клітин, що інкубувались у гіпертонічних розчинах сахарози 2 хв, $P < 0,05$

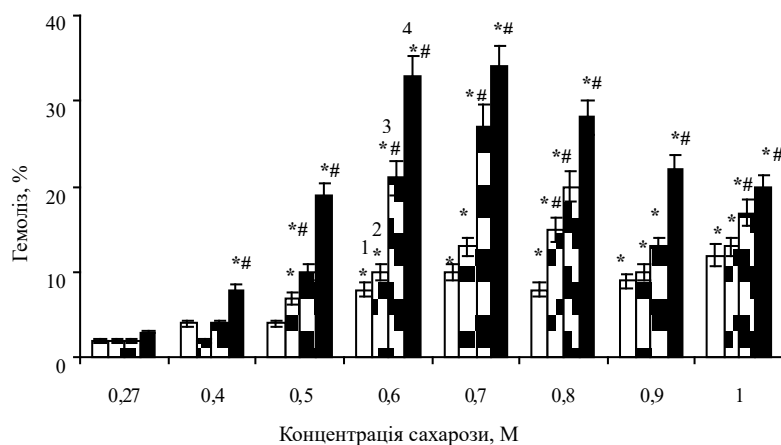


Рис. 3. Рівень гіпертонічного гемолізу еритроцитів 12-місячних щурів після інкубації у розчинах сахарози. Час інкубації: 1 – 2 хв; 2 – 10 хв; 3 – 30 хв; 4 – 60 хв

Примітка: * – різниця вірогідна, порівняно з рівнем гемолізу клітин, що не піддавалися дії гіпертонічних розчинів сахарози, $P < 0,05$; # – різниця вірогідна, порівняно з рівнем гемолізу клітин, що інкубувались у гіпертонічних розчинах сахарози 2 хв, $P < 0,05$

Білок 4.1 є багатофункціональним компонентом мембрани еритроцитів. Він утворює потрійний комплекс з актином і спектрином, який визначає вузлові з'єднання мембрано-скелетної мережі, а його приєднання до трансмембранного білка глікофорину С створює місток між білковою мережею та мембранним бішаром. Відсутність білка 4.1 в еритроцитах генетично модифікованих мишей суттєво змінює структуру цитоскелета, що призводить до зменшення стабільності мембрани, її прогресуючої фрагментації *in vivo* і руйнування клітини [19]. Дія геміну на еритроцити ссавців призводить до модифікації макромолекулярного комплексу білок 4.1-актин-спектрин і, як наслідок, до часткового

відшарування мембрани від цитоскелета [4, 10]. Це може бути використано для з'ясування ролі білка 4.1 в механічній і осмотичній стабільності клітини шляхом піддавання їх гіперосмотичному стресові. Крім того, дослідження дії геміну на мембрани еритроцитів має велике значення і для клінічної медицини, зокрема, для вивчення клітинної інтоксикації [7].

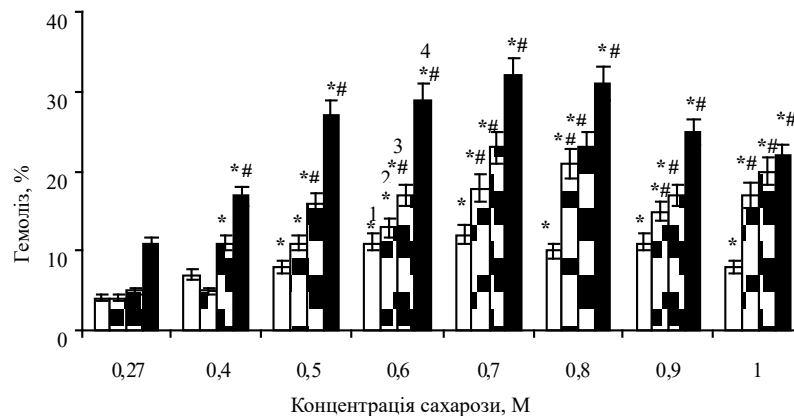


Рис. 4. Рівень гіпертонічного гемолізу модифікованих геміном еритроцитів 12-місячних щурів після інкубації у розчинах сахарози. Час інкубації: 1 – 2 хв; 2 – 10 хв; 3 – 30 хв; 4 – 60 хв

Примітка: * – різниця вірогідна, порівняно з рівнем гемолізу клітин, що не піддавалися дії гіпертонічних розчинів сахарози, $P < 0,05$; # – різниця вірогідна, порівняно з рівнем гемолізу клітин, що інкубувались у гіпертонічних розчинах сахарози 2 хв, $P < 0,05$

Гемін є продуктом окиснення гемоглобіну. Фізіологічно концентрація вільного геміну в крові строго регулюється високоафінним зв'язуванням з білками, такими як альбумін сироватки крові, гаптоглобін і гемопексин. Патологічно високі рівні вивільнення геміну виникають за важких гемолітичних станів, таких як серпоподібно-клітинна анемія або таласемія. Гемін також утворюється в умовах кровотечі при виразках і ерозіях шлунка під дією ферментів шлункового соку та соляної кислоти на гемоглобін. Багато чинників, що призводять до окиснення і руйнування мембран, утворення метгемоглобіну (наприклад, іонізуюче випромінювання), також збільшують ймовірність появи геміну в організмі. Крім того, препарати геміну використовуються для лікування порфірії [7]. Вільний гем, що є ліпофільною молекулою, проникає в мембрану, порушує ліпідний бішар і дестабілізує цитоскелет [4, 9, 10, 13, 15].

Можна припустити, що еритроцити, модифіковані геміном, будуть більш чутливі до стресового осмотичного впливу. Справді, обробка геміном підвищує чутливість еритроцитів до гіпертонічних сахарозних середовищ у щурів 1-місячного віку (рис. 1 і 2). Оскільки гемін є модифікатором білкового комплексу білок 4.1-актин-спектрин, це може вказувати на важливість зв'язків білок 4.1-актин-спектрин для підтримки механічної стабільності еритроцитів молодих тварин. Однак при цьому чутливість еритроцитів щурів 12-місячного віку не зазнає змін. Це можна пояснити меншою кількістю геміну, який проникає в еритроцити старших тварин. У роботі [11] повідомлялося, що в еритроцитах літніх людей (понад 60 років) спостерігається значне збільшення вмісту холестерину в мембранах, а також зміна кількісного складу фосфоліпідів і їхнього розташування, що призводить до зниження їхньої плинності. Оскільки гемін є ліпофільною молекулою, зміна складу мембран може суттєво обмежувати його проникнення всередину клітини [10]. Крім того,

в підтримці стабільності еритроцитів старших тварин, імовірно, можуть брати участь інші білкові комплекси. Так, у роботі [19] визначено два типи мультипротеїнових комплексів, що утворюють зв'язок між мембранним скелетом і бішаром. А саме, крім макромолекулярного комплексу на основі білка 4.1, є ще макромолекулярний комплекс на основі білка смуги 3, який приєднується через анкірин до тетрамеру спектрину. Слід зазначити, що максимальна різниця в чутливості оброблених і контрольних клітин спостерігається за часу інкубації 10 хв і 30 хв. Мабуть, 2 хв недостатньо для розвитку гіпертонічного ушкодження клітини, а за 60 хв пошкодження настільки значне, що модифікація геміном комплексу білок 4.1-актин-спектрин не має впливу на загальну стабільність еритроцита.

Аналізуючи чутливість еритроцитів до дії гіпертонічних сахарозних розчинів (рис. 1–2) можна побачити, що вона має максимум за концентрації сахарози 0,6 М, що може вказувати на наявність двох різноспрямованих процесів, один із яких підвищує рівень вивільнення гемоглобіну, інший – знижує. Сумарна дія цих процесів визначає чутливість клітин до гіпертонічного впливу. Так, з одного боку, зі збільшенням концентрації сахарози відбувається швидша дегідратація еритроцита, прискорюється дисоціація мембрани і цитоскелета [17], що призводить до фатальних порушень цілісності клітини і до її незворотного пошкодження. З іншого боку, за подальшого збільшення концентрації сахарози може значно змінюватися заряд білкових молекул, що призводить до зв'язування молекул гемоглобіну з білками цитоскелета (зокрема, спектрином) і до формування великих комплексів [6, 20, 23]. Це знижує концентрацію вільного гемоглобіну і зумовлює викривлення показників рівня ушкодження клітини, занижуючи їх.

За збільшення часу інкубації в сахарозі ступінь пошкодження наростає не тільки для модифікованих, а й для контрольних клітин. Це може бути пов'язано з низькою іонною силою середовища. Значення іонної сили відіграє важливу роль у структурі та конформації спектрину еритроцитів. Як показано раніше за допомогою електронної мікроскопії та гідродинамічних досліджень [12], димер спектрину змінює свою конформацію за зниження іонної сили середовища стосовно фізіологічної. Унаслідок цього відбувається дисоціація зв'язків мембрано-цитоскелетного комплексу, а саме зв'язку спектрин-актин. Це призводить до поступового відділення мембрани від цитоскелета, дестабілізації та руйнування клітини.

Таким чином, спостерігається розходження між чутливістю еритроцитів 1-місячних і 12-місячних щурів як до модифікації геміном, так і до стресового впливу гіпертонічних розчинів сахарози. Клітини старших тварин демонструють нижчий рівень пошкодження в обох випадках. Це, швидше за все, пов'язано з меншою доступністю макромолекулярних комплексів, що підтримують стабільність мембрани, для модифікуючого впливу геміну і дії середовищ із низькою іонною силою, а також із різним розподілом навантаження на вузлові білкові структури мембрани у тварин різного віку. Крім того, зростання інтенсивності процесів окиснення в мембрані еритроцита з віком призводить до збільшення кількості зв'язків гемоглобін-спектрин, знижуючи здатність мембрани еритроцитів до деформації, однак збільшуючи їхню осмотичну і механічну стійкість.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Березнякова А. І., Жемела О. Д. Здатність до деформації мембран еритроцитів у щурів різного віку при гіпоксії // *Фізіол. журнал*. 2013. Т. 59 № 3. С. 72–77.
2. Коба Л. В., Шапкіна О. О., Жуйкова А. Є., Бондаренко В. А. Стійкість еритроцитів щурів різного віку до гіпертонічних умов середовища // *Вісн. проблем біології і медицини*. 2018. Вип. 3 (145). С. 389–392.

3. *Луговський С. П.* Вікові особливості шкідливої дії малих доз свинцю на еритроцити щурів при його тривалому впливі на організм // Довкілля та здоров'я. 2010. № 4. С. 17–22.
4. *Олейник О. А., Рамазанов В. В., Бондаренко В. А.* Постгипертонический лизис модифицированных эритроцитов в цитратной среде // Проблемы криобиологии. 2003. № 3. С. 21–29.
5. *Шпакова Н. М., Орлова Н. В., Нупот Е. Е.* та ін. Осмотическая чувствительность эритроцитов млекопитающих при модификации их исходного состояния // Вестн. проблем биологии и медицины. 2016. Вып. 2. Т. 3 (130). С. 356–361.
6. *Basu A., Chakrabarti A.* Hemoglobin interacting proteins and implications of spectrin hemoglobin interaction // J. Proteomics. 2015. Vol. 128. P. 469–475.
7. *Belcher John D., Beckman Joan D., Balla Gyorgy* et al. Heme degradation and vascular injury // Antioxid Redox Signal. 2010. Vol. 1. N 2. P. 233–248.
8. *Ciana A., Achilli C., Minetti G.* Spectrin and other membrane-skeletal components in human red blood cells of different age // Cell Physiol. Biochem. 2017. Vol. 42. N 3. P. 1139–1152.
9. *Das D., Patra M., Chakrabarti A.* Binding of hemin, hematoporphyrin, and protoporphyrin with erythroid spectrin: fluorescence and molecular docking studies // Eur. Biophys. J. 2015. Vol. 44. N 3. P. 171–182.
10. *Das D., Tarafdar P. K., Chakrabarti A.* Structure-activity relationship of heme and its analogues in membrane damage and inhibition of fusion // FEBS Letters. 2018. Vol. 592. N 14. P. 2458–2465.
11. *Gonzalez L. M., Moeser A. J., Blikslager A. T.* Animal models of ischemia-reperfusion-induced intestinal injury: progress and promise for translational research // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 2015. Vol. 308. P. 63–75.
12. *Kelkar D. A., Chattopadhyay A., Chakrabarti A., Bhattacharyya M.* Effect of ionic strength on the organization and dynamics of tryptophan residues in erythroid spectrin: A fluorescence approach // Biopolymers. 2005. Vol. 77. N 6. P. 325–334.
13. *Kozlova E., Chernysh A., Moroz V.* et al. Transformation of membrane nanosurface of red blood cells under hemin action // Sci Rep. 2014. Vol. 4. N 6033. P. 1–11.
14. *Kumar D., Rizvi S. I.* Markers of oxidative stress in senescent erythrocytes obtained from young and old age rats // Rejuvenation Res. 2014. Vol. 17. N 5. P. 446–452.
15. *Matthews K., Duffy S. P., Myrand-Lapierre M. E.* et al. Microfluidic analysis of red blood cell deformability as a means to assess hemin-induced oxidative stress resulting from *Plasmodium falciparum* intraerythrocytic parasitism // Integr. Biol. (Camb). 2017. Vol. 9. N 6. P. 519–528.
16. *Mester A., Magyar Z., Molnar A.* Age- and gender-related hemorheological alterations in intestinal ischemia-reperfusion in the rat // J. Surg. Res. 2018. Vol. 225. P. 68–75.
17. *Moersdorf D., Egee S., Hahn C.* Transmembrane potential of red blood cells under low ionic strength conditions // Cell Physiol. Biochem. 2013. Vol. 31. N 6. P. 875–882.
18. *Rebrova T. Y., Afanasiev S. A., Popov S. V.* Age-dependent changes in Na(+),K(+)-ATPase activity and lipid peroxidation in membranes of erythrocytes during cardiosclerosis development in rats // Bull Exp. Biol. Med. 2016. Vol. 161. N 2. P. 235–236.
19. *Salomao M., Zhang X., Yang Y.* et al. Protein 4.1R-dependent multiprotein complex: New insights into the structural organization of the red blood cell membrane // Proc Natl Acad. Sci. USA. 2008. Vol. 105. N 23. P. 8026–8031.
20. *Sauberman N., Fortier N. L., Joshi W.* et al Spectrin-haemoglobin crosslinkages associated with in vitro oxidant hypersensitivity in pathologic and artificially dehydrated red cells // British. J. Haematol. 2008. Vol. 54. N 1. P. 15–28.
21. *Singh S., Pandey K. B., Rizvi S. I.* Erythrocyte senescence and membrane transporters in young and old rats // Arch. Physiol. Biochem. 2016. Vol. 122. N 4. P. 228–234.

22. *Somogyi V., Peto K., Deak A.* Effects of aging and gender on micro-rheology of blood in 3 to 18 months old male and female Wistar (Crl:WI) rats // *Biorheology*. 2018. Vol. 54. N 5–6. P. 127–140.
23. *Welbourn E. M., Wilson M. T., Yusof A.* et al. The mechanism of formation, structure and physiological relevance of covalent hemoglobin attachment to the erythrocyte membrane // *Free Radic. Biol. Med.* 2017. Vol. 103. P. 95–106.

Стаття: надійшла до редакції 06.03.19

доопрацьована 25.09.19

прийнята до друку 04.10.19

SENSITIVITY OF DIFFERENT AGE RATS ERYTHROCYTES TO STRESS

L. Koba¹, O. Nipot², O. Shapkina², A. Zhujkova¹, V. Bondarenko¹

¹*V.N Karazin Kharkiv National University
4, Svobody Sq., Kharkiv 61022, Ukraine*

²*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, NAS of Ukraine
23, Pereyaslavska St, Kharkiv 61016, Ukraine
e-mail: nipotel71@gmail.com*

In this work age features of 1- and 12-month rats erythrocytes sensitivity to hypertonic conditions of environment after their modification by hemin.

It has been shown that the level of hemolytic damage of erythrocytes in both 1-month and 12-month rats depends on the time of incubation in hypertonic solutions of sucrose and their concentration. For incubations for 2, 10, 30, and 60 minutes significant increase in damage occurs at concentrations of 0.5–0.8 M (8–10 times). The analysis of cell damage, depending on the concentration of sucrose at the same incubation time, showed that for 10, 30, and 60 minutes it is possible to observe the initial increase in sensitivity, achievement of maximum (10 min – 0.8 M, 30 min – 0.7 M, 60 min – 0.6 M) and further reduction erythrocytes damage in both 1-month and 12-month rats.

It was found that gemin treatment increases the level of hypertonic damage of erythrocytes after incubation in sucrose environments for 1 month old rats. At the same time, the maximum difference in the sensitivity of treated and control cells is observed at incubation time of 10 min and 30 min (33±4 % and 18±2 %, 56±4 % and 44±3 % respectively). The level of erythrocyte damage in 12-month-old rats in these conditions does not change. For 10 and 30 minutes incubation (21±3 % and 15±2 %, 27±3 % and 23±2 % respectively). Since hemin modifies protein 4.1, the data indicate the importance of 4.1-spectrum protein bonds to support the mechanical stability of red blood cells in young animals.

Overall level of hemolytic damage of erythrocytes for 12-month-old animals is lower for both control and modified cells for all concentrations of sucrose. The percentage of hemolysis is reduced from two to three times.

Thus, erythrocytes of 1-month and 12-month-old rats differ significantly in sensitivity, both to modification by hemin, and to the stressful effects of hypertonic sucrose solutions. Senior animal cells exhibit a lower level of damage in both cases. This can be explained by the lower availability of macromolecular complexes that support the stability of the membrane, for modifying the influence of hemin and low ionic strength media, as well as the different distribution of strain on macromolecular structures that maintain the integrity and mechanical stability of the membrane in animals of all ages.

Keywords: erythrocytes of rats, hemin, sucrose medium, cytoskeleton

ЗМІСТ БІОХІМІЯ

<i>К. Решетник, Д. Юськов</i> Вплив лазерного опромінення на каталазну активність базидіоміцета <i>Flammulina velutipes</i> (Curt.: Fr.) Sing.	3
<i>Я. Діордіца</i> Антиоксидантна система печінки щурів за умов гострого гепатиту під час корекції комплексами антиоксидантів	12

БОТАНІКА

<i>I. Bednarska, G. Angelov</i> Seed proteins analysis of <i>Festuca</i> series <i>Psammophilae</i> M. Pawlus and <i>Ovinae</i> M. Pawlus (Poaceae)	21
<i>М. Томич</i> Відділ <i>Polypodiophyta</i> у структурі флори Національного природного парку “Гуцульщина” (Українські Карпати)	29

ГЕНЕТИКА

<i>К. Ведмедєва</i> Успадкування оранжевих забарвлень крайових квіток соняшнику	41
<i>Y. Kuzhyk, Y. Rebets, I. Popko, I. Ostash, S. Walker, V. Fedorenko, B. Ostash</i> Tn5-based transposon mutagenesis of <i>Streptomyces ghanaensis</i> ATCC14672: searching for novel regulators of moenomycin production	50
<i>Л. Боднар, І. Тупусяк, С. Горбулінська</i> Виявлення можливої генотоксичної небезпеки за використання синтетичного харчового ароматизатора «Вишня»	57
<i>О. Зотова, А. Лук'янова, М. Вальчук, Ю. Кароль, Н. Горон, О. Шалай, В. Логінський</i> Цитогенетичні дослідження лейкемічних клітин на різних етапах перебігу гострих лейкемій	65

ЕКОЛОГІЯ

<i>В. Горбань</i> Вплив штучних лісонасаджень на електрофізичні показники чорнозему звичайного... <i>Р. Дмитрах</i> Вплив кліматичних змін на популяції видів трав'яних рослин у сучасних умовах високогір'я Українських Карпат	76
<i>А. Фецюх, Л. Буньо, О. Пацула, О. Терек</i> Накопичення важких металів рослинами <i>S. viminalis</i> за росту на субстраті зі Стебницького хвостосховища	96

МІКРОБІОЛОГІЯ

<i>Н. Васильєва, І. Блайда, Т. Васильєва, В. Баранов, І. Барба</i> Використання методів дисперсійного і кластерного аналізу для порівняння стійкості до важких металів ацидофільних хемолітотрофних бактерій, виділених із техногенної сировини	111
<i>О. Демків, Н. Стасюк, А. Закальський, О. Закальська, Т. Прокопів, Ю. Борецький, М. Гончар</i> Скринінг цвілевих грибів на здатність до синтезу креатиніндеїмінази	122
<i>І. Страшинова, Г. Ямборко, Н. Васильєва</i> Вплив деяких чинників шлунково-кишкового тракту на життєздатність лактобацил, виділених із різних екологічних ніш	130

ФІЗІОЛОГІЯ ЛЮДИНИ І ТВАРИН

<i>Л. Коба, О. Ніпот, О. Шапкіна, А. Жуйкова, В. Бондаренко</i> Чутливість еритроцитів щурів різного віку до стресового впливу	139
---	-----

CONTENS BIOCHEMISTRY

<i>K. Reshetnyk, D. Yuskov</i> The effect of laser irradiation on basidiomycete <i>Flammulina velutipes</i> (Curt.: Fr.) Sing. catalase activity	3
<i>Y. Diorditsa</i> Antioxidant system activity in liver of rats under conditions of acute hepatitis during correction with antioxidant complexes	12

BOTANY

<i>I. Bednarska, G. Angelov</i> Seed proteins analysis of <i>Festuca</i> series <i>Psammophilae</i> M. Pawlus and <i>Ovinae</i> M. Pawlus (Poaceae)	21
<i>M. Tomych</i> Section <i>Polypodiophyta</i> in the structure of flora of the National Natural Park “Gutsulshchyna” (Ukrainian Carpathians)	29

GENETICS

<i>K. Vedmedeva</i> Inheritance of orange colors of the infertale ray flowers of sunflower	41
<i>Y. Kuzhyk, Y. Rebets, I. Popko, I. Ostash, S. Walker, V. Fedorenko, B. Ostash</i> Tn5-based transposon mutagenesis of <i>Streptomyces ghanaensis</i> ATCC14672: searching for novel regulators of moenomycin production	50
<i>L. Bodnar, I. Typusiak, S. Horbulinska</i> Detection of possible genotoxic hazard by using synthetic flavouring «Cherry»	57
<i>O. Zotova, A. Lukianova, M. Valchuk, Y. Karol, N. Horon, O. Shalay, V. Loginsky</i> Cytogenetic investigations of leukemic cells at different stages of acute leukemia	65

ECOLOGY

<i>V. Gorban</i> Influence of artificial forest plantations on electrophysical index of ordinary chornozem	76
<i>R. Dmytrakh</i> The influence of climatic changes on herbaceous plants species' populations in currend conditions of high-montain zone of the Ukrainian Carpathians	86
<i>A. Fetsiukh, L. Bunio, O. Patsula, O. Terek</i> Accumulation of heavy metals by <i>Salix viminalis</i> plants under growing at the substrate from Stebnyk tailings	96

MICROBIOLOGY

<i>N. Vasylieva, I. Blayda, T. Vasylieva, V. Baranov, I. Barba</i> Applications of methods of dispersion and cluster analysis to compare the resistance of acidophilic chemolithotrophic bacteria isolated from dump products to heavy metals	111
<i>O. Demkiv, N. Stasyuk, A. Zakalskiy, O. Zakalska, T. Prokopiv, Y. Boretsky, M. Gonchar</i> Screening mold strains for an ability to synthesize creatinine deiminase	122
<i>I. Strashnova, G. Yamborko, N. Vasylieva</i> The influence of some factors of the digestive tract on the lactobacilli lives from different environmental niches	130

HUMAN AND ANIMAL PHYSIOLOGY

<i>L. Koba, O. Nipot, O. Shapkina, A. Zhujkova, V. Bondarenko</i> Sensitivity of different age rats erythrocytes to stress	139
---	-----