

REDISTRIBUTION OF ^{137}Cs IN TROPHIC CHAINS OF INSECTS-HERPETOBIONS

V. GAYCHENKO, doctor of sciences, professor

*Department of ecology of agrosphere
and ecological control of NULES of Ukraine*

D. MONOSHYN, MSc

ISA-Lille, France

E-mail: gaychenko_v@ukr.net; masterchief0028@gmail.com

Annotation. *We review the questions of redistribution of ^{137}Cs in trophic chain, based on the study of radioactivity of insects-herpetobions exoskeletons, sampled in Drevlanskiy Natural Reservation (the density of radioactive contamination is above 555 kBq/m²). To simplify the model, only obligatory phytophagous, zoophagous and necrophagous were used. Calculated accumulation coefficients (T_F) for each unit of chain give an ability to define the unit with the maximal accumulation of radioactive element - secondary consumers (zoophagous), where T_F is 6 time higher than in other units which proves known standard trend.*

However, draws attention the fact that T_F for insects-predators is almost 3 times higher than for the predators from other taxonomical groups. Comparison of measured accumulation coefficients of insects-herpetobions to already published data allows us to make an assumption about the domination of insects in biogenic transformation of radionuclides, at least in forest ecosystems. This domination can be based on the higher biomass and density of population of invertebrates from one side and on the high level of radioactive contamination of these animals.

Keywords: *insects-herpetobions, radionuclides, ^{137}Cs , trophic chain, accumulation coefficient, primary and secondary consumers*

Even since the 30 years after the Chornobyl accident, the problem of presence of radioactive compounds in animal and human habitants is still actual. Post-accident high-scale studies of the impact of radioactive contamination on the flora and fauna of whole regions gave an opportunity to estimate radiobiological and radioecological effect on the plant and animal communities. The features of accumulation and redistribution of radionuclides in the animals whose lifecycle is strongly connected to the soil surface is the important point of these studies.

Soil surface is the main source of radionuclides in terrestrial trophic chains. Radioactive compounds fall onto the soil surface, accumulate in the soil and after get included into biochemical cycles and became part of soil composition. Soil is the most important inertial chain and allover speed of migration of radionuclides through trophic chains is strongly dependent on the speed of radionuclides movement inside the soil. As the result of relocation in soil and subsequent

sorption through the roots radioactive agents get into the parts of plants that have nutritional value or used as fodder [11].

On the assumption of biochemical cycle of elements in the landscape [1], migration of the majority of chemical compounds in the elemental landscape is a cycle, where elements repeatedly participate the composition of living organism ("organization") and leave it ("mineralization") [2; 3]. Such cycles are different in the time for each compound and each landscape; the cycles can never be inversed and landscape never goes to its previous state but can only be evolved with obtaining of some new properties. Development of landscape mainly emerges as the system of such cycles, and the soil, as the main consumer of primary and secondary production of biocenosis production, has the main role in it.

As it is known from the works of Hyliarov [4; 5], Zonn[6] and others, terrestrial and soil fauna have strong direct and indirect (through litter) impact on the cycle of matter. Soil invertebrates is an important factor of soil genesis and increasing of the quality of soil, and by so – the main element in the chain of biochemical relations [2; 7]. It can be concluded from the studies of Kryvolutskyi [8] and Pokarzhevskyi [9] that the role of soil animals in the accumulation and migration of chemical elements is significant. The long-term study of the role of different groups of litter mezofauna in the cycle of the mater in the conditions of the short-hawn oak forests and arena oak forests of steppe zone of Ukraine [10] can be used as an example. It was shown that the main participant to the process of the litter decomposition are Diplopoda, Siphidae, Scarabaeidae, Oniscidea, caterpillars of Noctuidae, Diptera larvae and Gastropoda in the short-hawn oak forest and Julida, Coleoptera, and Diptera in arena oak forests.

Invertebrates that live in the upper soil horizon – litter, from one side, are strongly linked to the plants, that, as well as animals, accumulate contaminants (including radioactive onea) and are the objects of feeding interest for the phytophagous. From the other side, these invertebrates are strongly linked to the litter which has barrier-function on the way of contaminants to enter the soil. Hence, the litter became not only the matrix for living of animals, but the object of destructive impact on saprophagous as well [13].

Thus, all vital processes in the population of animals of upper soil horizon come about the context of changing of chemical composition of their environment. Macro- and micro elements get to the body of animals and accumulate there in the process of feeding. Thereby, the features of accumulation of pollutants in invertebrates has an interest not only in the taxonomic, but on the trophic level as well. Redistribution of contaminants in case of radioactive contamination of any ecosystem element happen due to its (compound) active participation to the biogenic and abiogenic cycles of matter. The biogenic cycle is the most important, since radioactive compound actively include itself to the processes of exchange that have place in the living beings [15; 16].

Entrance of radionuclides in to the animal organisms depends on the ecology of different species and their feeding preferences and distribution at biocenosis, as well as on the chemical and physical properties of radionuclides [17]. For some groups of animals with the same feeding preferences the same trends in concentration of radionuclides while they migrate through trophic chain are observed.

Such the features can explain why the majority of publications that deal with the biogenic transformation of radionuclides in trophic chains devoted to the study of accumulation of radioactive isotopes in the chains that finally leads to the human or in the trophic chains of vertebrates which have specific feeding specialization [18-21]. Trophic specialization of the majority of insects are not studied so deeply yet. Segregation of insects according to their feeding character on to trophic groups more or less relative since the degree of this specificity is differ from species to species; for example, some insect species might be zoophagous, phytophagous, saprophagous and necrophages at the same time [23].

The goal of this work is the study of the redistribution of ^{137}Cs in the trophic chain of insects-herpetobions: plants – phytophagous – zoophagous – necrophagous. It is obvious that such a simplified model is not able to represent all details of redistribution of radionuclides, but it allows to take into consideration some features of trophic links of herpetobions. The next objects were chosen for the study: *Zabrus tenebrioides* Goeseas the obligatory phytophagous, *Calosoma sycophanta* as the obligatory zoophagous, *Nicrophorus vespillo* as a necrophagous. All chosen modeling species has short lifecycle which strongly simplify the interpretation of obtained data.

Material and methods. Material for the study has been taken in the Drevlanskiy Natural Reservation by using Berber's traps, in the pine forest 60+ years old with the density of soil contamination by ^{137}Cs was above 555 kBq/m^2 . Radioactivity of exoskeletons of collected insects has been defined by using gamma – ray spectrometer with Ge(Li) semi conductive detector of GEM-30185, GMX series (EG&G ORTEC) and multichannel analyzer (ADAM-300, USA, IN-1200, France) in measuring reservoirs “Denta” fabricated in the shape of a frustum 3.3 cm high and with the diameters of base 6.3 and 7.3 cm respectively in the Institute of Agricultural Radiology of NULES of Ukraine.

The coefficient of accumulation of radionuclides in each unit of the trophic chain has been defined by using common-known formula: the ration of the specific activity of the linker-acceptor to the donor unit.

Results and discussion. The simplified trophic chain started from the wild-growing cereals was used to perform the study (Fig. 1)



Fig.1. Simplified model of trophic chain

Such a simplified model allows to take into account redistribution of radionuclide by representatives of each ecological group, starting from the primary consumers and until the decomposers. Activity of the first unit (plant) has been considered as 1.

As it was predicted, radioactivity of each unit of trophic chain has not shown any significant deviation from the general trend – thesecondary consumers (zoophagous) has the highest value (Tab. 1).

1. Radioactivity of units of trophic chain

Trophic level	Radioactivity (Bq/kg)
Herbivore	1327 ± 240
Primary consumer (<i>Zabrus tenebrioides</i> Goese)	520 ± 104
Secondary consumer (<i>Calosoma sycophanta</i>)	3283 ± 33
Necrophagous (<i>Nicrophorus vespillo</i>)	525 ± 92

As it was already shown, the main parameter that characterizes degree of biogenic redistribution between the units of trophic chain is the transfer factor (T_F). Computation showi that on the stage of migration “plant – primary consumer” significant decreasing of T_F is clearly traced, what is in agreement with the data from literature [24-26] – the decreasing of the concentration of radionuclide in the first stage of trophic chain.

Totally different situation appears in the second unit – “phytophagous – zoophagous” (Tab. 2). T_F in this unit is 16 times higher, what has never been reported before for any studied group of animals.

2. Transfer factor in the units of trophic chains

Trophic level	T_F
Herbivore	-
Primary consumer (<i>Zabrus tenebrioides</i> Goese)	0.39
Secondary consumer (<i>Calosoma sycophanta</i>)	6.31
Necrophagous (<i>Nicrophorus vespillo</i>)	0.16

It might be likely explained by the specificity of lifestyle of selected species, that is characterized by high mobility and aggressivity, short lifecycle and feeding features of larva, which is obligatory zoophagous [27].

Third unit of trophic chain – necrophagous has, compare to zoophagous, much lower coefficient of accumulation. However, since the trophic specialization of *Nicrophorus vespillo* tends to include the consumption of vertebrate animals, the result is not in disagreement with the data obtained before.

Another point of interest is the data about the second trophic unit – secondary consumers. Comparison of T_F for zoophagous of different systematic groups (Tab. 3) allows to say that among all zoophagous the insects have the highest coefficient of accumulation of ^{137}Cs , which probably can be explained though the specificity of ecology of these animals.

3. Transfer factor for different groups of zoophagous

Secondary consumers	T_F
Insecta (<i>Calosoma sycophanta</i>)	6.31
Reptilia [21, 25, 26]	3.4, 2.5
Mammalia [21, 25, 26]	1.3
Aves [21, 25, 26]	0.53

The results of the study proved known trend of concentration of ^{137}Cs in the second unit of trophic chain. However, it needs to be noticed that such high values of T_F (two times higher) that were observed for insects-predators allows us to make an assumption about dominating position of insects in the biogenic transformation of

radionuclides, at least in forest ecosystems. This assumption is based on the high biomass and density of invertebrates compare to vertebrates on the one side and high level of contamination of invertebrates on another.

As it was mentioned before, the exoskeletons with the removed soft tissues were used for the study, thus only contamination of chitinous cover was analyzed. Comparison of this data with the radioactivity of whole body of animals, sampled in the same biocenosis allows to assume that the coefficients of accumulation can be significantly higher for other units of trophic chain. The basis for this assumption is the comparison of radioactivity of phytophagous *Zabrus tenebrioides* exoskeletons (520 ± 104 Bq/kg) and radioactivity of *Melolontha melolontha* (1500 ± 14 Bq/kg), which is approximately 3 times higher for the second species. Additionally, it indirectly proves an assumption about the leading role of invertebrates and particularly insects in the trophic transformation of radionuclides in natural ecosystems.

References

1. Perelman, A. Y. *Heokhymyia landshafta*. – M.: Nauka, 1975. – 340 s.
2. Babeva, Y. P., Ahre N. S. *Praktycheskoe rukovodstvo po byolohyy pochv*. – M.: MHU, 1971. – 126 s.
3. Novohrudskiy D. M. *Pochvennaia mykrobyolohyia*. – Alma-Ata: AN Kazakhskoi SSR, 1956. – 366 s.
4. Hyliarov M. S. *Zoolohycheskyi metod dyahnostyky pochv*. – M.: Nauka, 1965. – 275 s.
5. Hyliarov M. S. *Pochvennyiyarusbyotsenozovsushy* // *Uspekhysovremennoibylolohyy*. – 1968. – T. 66, № 1(4). – S. 121-136.
6. Zonn S. V. *Vlyanye lesa na pochvy*. – M.: Nauka, 1954. – 144 s.
7. Bazylevych N. Y., Hrebenshchikov O. S., Tyshkov A. A. *Heohrafycheskye zakonomernosti struktury y funktsyonyrovanyia ekosystem*. – M.: Nauka, 1986. – 296 s.
8. Kryvolutskiy D. A. *Pochvennaia fauna v ekolohycheskom kontrole*. – M.: Nauka, 1994. – 240 s.
9. Pokarzhevskiy A. D. *Heokhymycheskaia ekolohyia nazemnykh zhyvotnykh*. – M.: Nauka, 1985. – 298 s.
10. N. N. Tsvetkova, V. V. Bryhadyrenko. *Rol herpetobyontnoi mezofauny v transformatsyy orhanycheskoho veshchestva podstylky poimennykh y arennykh lesov stepnoi zony* // *Pytannia bioindykatsiia ekolohii*. – Zaporizhzhia: ZDU, 2003. – Vyp. 8, № 2.
11. Aleksakhyn R.M., Vasylev A.V., Dykarev V.H. y dr. *Selskokhoziaistvennaia radyoekolohyia*. – M.: Ekolohyia, 1992. – 400 s.
12. Rakhymova N. N. *Heoekolohycheskye osobennosti myhratsyy radyonuklydov Cs-137 y Sr-90 v pochvenno-rastytelnykh kompleksakh stepnoi zony Orenburhskoi oblasti*. // *Avtoref. dyss. kand. tekhn. nauk*. Perm 2006, 16s.
13. Kulbachko Yu.L., Hasso V.Ya. *Nakoplenye tiazhelykh metallov pochvennyymi bespozvonochnyymi razlychnykh funktsyonalnykh hrupp v zone deistviia marhantsevoi obohatytelnoi fabryky* // *Pytannia bioindykatsii ta ekolohii*. – Zaporizhzhia: ZNU, 2008. – Vyp. 13, № 2. – S. 121–130.
14. Bulakhov V.L., Hasso V.Ya., Pakhomov O.Ye. *Biolohichne riznomanittia Ukrainy. Dnipropetrovska oblast. Zemnovodni ta plazuny (Amphibia et Reptilia)*. – D.: Vyd-vo DNU, 2007. – 420 s.
15. Ylenko A.Y. *Kontsentryrovanye zhyvotnyymi radyoyzotopov y ykh vlyanye na populiatsiyu*. – M.: Nauka, 1974. – 168 s.

16. Sokolov V.E., Kryvolutskyi D.K., Usachev V.L. Dykye zhyvotnye v hlobalnom radyoekolohycheskom monytorynhe. - M.: Nauka, 1989. - 148 s.
17. Witkamp M., Frank M.L. Cesium-137 linetics in terrestrials microcosms // Proc. II Nat. Symp. Radioecol.(Ann Arbor, Mich., 1967). - P. 635 - 643.
18. Kryvolutskyi D.A. Radyoekolohyia soobshchestv nazemnykh zhyvotnykh - M.: Enerhoatomyzdat, 1983. - 87 s.
19. Usachev V.L., Kryvolutskyi D.A., Martiushov V.Z. Nakoplenye y pereraspredelenye po profyliu pochvy strontsiya-90 pod vliyaniem dozhddevykh chervei v laboratornykh eksperymentakh // Radyoekolohyia pochvennykh zhyvotnykh. - M.: Nauka, 1985. - S. 96 - 106.
20. Verkhovskaia Y.N., Vavylova P.P., Maslov V.Y. Myhratsyia estestvenno-radyoaktyvnykh elementov v pryrodnykh uslovyakh y raspredelenye ykh po byotycheskym y abyotycheskym komponentam sredy // Yzv. AN SSSR.Ser. byol. 1967. - № 2. - S. 720 - 729.
21. Ylenko A.Y., Krapyvko T.P. Ekolohyia zhyvotnykh v radyatsyonnom byoheotsenoze. - M.: Nauka, 1989. -223 s.
22. V. A. Haichenko. Znachenniamyshopodibnykhhrizunivubiohenniimihratsii 137Ssnaperelohakh. // Yadernafizykataenerhetyka, - 2012, T. 13 № 4, s. 392–395.
23. YakhontovV.V. Ekolohyianasekomykh. – M.: Vysshaiashkola. – 1964, - 459 s.
24. YlienkoA.Y., KrapyvkoT.P. Ekolohyia zhyvotnykh v radyatsyonnom byoheotsenoze. – M.: Nauka, 1989.
25. Simonova L. I., Gaychenko V. A. Biohennamihratsiia 137Csvtrofichnykhlantsiuhakh // Ukrainskyiradiolohichnyizhurnal. - 2009. - № 2. - S. 218 - 220.
26. Gaychenko V. A., Kozynenko Y. Y., Zavodnykov N. S. idr., // Ekoloho-faunystycheskyeyssledovanyiaavzoneChernobylskoiAES. // Kyev. 1996, -65 s.
27. Forest Caterpillar Hunter. Calosoma sycophanta (Linnaeus, 1758) Rezhym dostupa: <https://www.biolib.cz/en/taxon/id81>.
28. V.N. Romanenko. Osnovysravnytelnoifyzyolohyybespozvonochnykh. – Tomsk: Tomskiyhosudarstvennyiuniversitytet, 2013. – 224 s.

ПЕРЕРОЗПОДІЛ ¹³⁷CS В ТРОФІЧНОМУ ЛАНЦЮГУ КОМАХ-ГЕРПЕТОБІОНТІВ

В. Гайченко, Д. Моношин

Анотація. На прикладі вивчення питомої радіоактивності екзоскелетів комах-герпетобіонтів, відловлених у Древлянському заповіднику (щільність забруднення понад 555 кБк / м²) розглядаються питання перерозподілу ¹³⁷Cs в трофічному ланцюгу пасовищного типу. Для побудови спрощеної моделі трофічного ланцюга використовувалися облігатні фітофаг, хижак і детритофаг. Розраховані коефіцієнти накопичення (КН) для окремих ланок ланцюга дають можливість виявити ланку з максимальним накопиченням радіонукліда - консументи II порядку (зоофаги) - в якій КН у 6 разів вище, ніж в інших ланках, що підтверджує відому закономірність. Разом з тим, звертає на себе увагу високий коефіцієнт накопичення у хижих комах, який майже втричі вищий, ніж для відомих хижаків різного систематичного положення з наземних екосистем. Проведене порівняння коефіцієнтів накопичення в трофічному ланцюгу комах-герпетобіонтів з літературними даними дозволяє

висловити обґрунтоване припущення про домінуюче положення комах в біогенній трансформації радіонукліда, хоча б в лісових екосистемах. Підставою для цього, з одного боку, є більша ніж у хребетних тварин біомаса і щільність безхребетних в наземних ценозах, а з іншого – значне радіоактивне забруднення цих тварин.

Ключові слова: *комахи-герпетобіонти, радіонукліди, ^{137}Cs , трофічні ланцюги, коефіцієнт накопичення, консументи I, II порядку.*

ПЕРЕРАСПРЕДЕЛЕНИЕ ^{137}Cs В ТРОФИЧЕСКОЙ ЦЕПИ НАСЕКОМЫХ-ГЕРПЕТОБИОНТОВ

В. Гайченко, Д. Моношин

Аннотация. На основании изучения удельной радиоактивности экзоскелетов насекомых-герпетобионтов, отловленных в Древянском заповеднике (плотность загрязнения свыше 555 кБк/м^2) рассматриваются вопросы перераспределения ^{137}Cs в трофической цепи пастбищного типа. Для построения упрощенной модели трофической цепи использовались облигатные фитофаг, хищник и детритофаг. Рассчитанные коэффициенты накопления (K_n) для отдельных звеньев цепи дают возможность выявить звено с максимальным накоплением радионуклида – консументы II порядка (зоофаги) – в котором K_n в 6 раз выше, чем в других звеньях, что подтверждает известную закономерность. Вместе с тем, обращает на себя внимание высокий коэффициент накопления у хищных насекомых, который почти в три раза выше известных для хищников различного систематического положения из наземных экосистем. Проведенное сравнение коэффициентов накопления в трофической цепи насекомых-герпетобионтов с литературными данным позволяет высказать обоснованное предположение о доминирующем положении насекомых в биогенной трансформации радионуклида, по крайней мере, в лесных экосистемах. Основанием для этого является, с одной стороны, большая, чем у позвоночных животных биомасса и плотность беспозвоночных в наземных ценозах, а с другой – значительное радиоактивное загрязнение этих животных.

Ключевые слова: *насекомые-герпетобионты, радионуклиды, ^{137}Cs , трофические цепи, коэффициент накопления, консументы I, II порядка.*

ОЦІНКА ВПЛИВУ ТВЕРДИХ ПОБУТОВИХ ВІДХОДІВ НА СТАН ПОВЕРХНЕВИХ ВОД В ЗОНІ ДІЇ МІСТА ХЕРСОН

С. В. СКОК, викладач кафедри екології та сталого розвитку імені професора

Ю.В. Пилипенка

Державний вищий навчальний заклад

«Херсонський державний аграрний університет»

E-mail:skok_sv@ukr.net

Анотація. У статті розглянута проблема утворення твердих побутових відходів в міських екосистемах. Відсутність обліку утворення відходів, встановлення ступеня їх небезпеки сприяло необхідності визначення показників сталого розвитку у сфері поводження з відходами. Система показників для міста Херсон складається із базових показників поводження з відходами: утворення відходів I–III класів небезпеки та утворення ТПВ на душу населення, м³, які були інтегровані за формулою середнього геометричного у агрегований показник поводження з відходами. В результаті розрахунків встановлено, що у сфері поводження з відходами місто Херсон має задовільний стан (агрегований показник $I_a = 0,58$). У загальній структурі твердих побутових відходів близько 45 % становили харчові відходи. Утворені фільтрати мають два природні шляхи міграції до приміських річок – через підземні води та поверхневі стоки. Внаслідок цього відбувається значне забруднення біогенними та токсичними елементами поверхневих вод акваторій р. Вирьовчина і р. Дніпро. Тому для оперативного визначення стану у сфері поводження з відходами нами була розроблена шкала показників сталого розвитку з метою запровадження заходів щодо мінімізації потрапляння у водні об'єкти забруднюючих речовин.

Ключові слова: *тверді побутові відходи, урбанізація, фільтрат, показники сталого розвитку, полігон, підземні води, поверхневі води.*

Актуальність. Процес інтенсивної урбанізації призводить до утворення великих об'ємів твердих побутових відходів, які являються небезпечними факторами забруднення навколишнього природного середовища, проблем досягнення екологічної безпеки та сталого розвитку регіону. На сьогодні найпоширенішим методом поводження з відходами є будівництво полігонів, негативний вплив якого проявляється в утворенні фільтрату. За відсутності організованої системи його очищення та видалення він потрапляє в ґрунтові, підземні, поверхневі води населених пунктів, забруднюючи їх токсичними органічними та неорганічними речовинами. Ситуація ускладнюється утворенням несанкціонованих стихійних звалищ, що призводить до небезпечної епідемічної ситуації через масове розмноження і розповсюдження шкідливих комах та гризунів. Особливо небезпечна ситуація відбувається влітку, коли висока

температура повітря прискорює швидкість розкладання продуктів життєдіяльності, що також призводить до утворення токсичного пилу. Полігони твердих побутових відходів є потужним джерелом забруднення усіх складових навколишнього природного середовища, тому проблема поводження з відходами є важливою складовою забезпечення екологічної безпеки регіонів. Особливо актуальним є їх кількісна та якісна оцінка в системі індикації сталого розвитку міських систем.

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Полігони твердих побутових відходів є спеціальними спорудами, призначеними для ізоляції та знешкодження твердих побутових відходів (ТПВ), які повинні гарантувати санітарно-епідеміологічну безпеку населення. Проте, на сьогодні полігони перестали виконувати свою головну природоохоронну функцію за відсутності у більшості населених пунктів організованої системи поводження з відходами. Утворені фільтрати за своїм канцерогенним вмістом такі науковці як М. С. Мальований, Н. Ю. Голець, Ю. О. Малик, О. Я. Голодовська прирівнюють до отруйних гербіцидів, які вимиваються дощовими водами, таненням снігового покриву і потрапляють у підземні та поверхневі води [1, 2].

Теоретичні основи поводження з відходами достатньо обґрунтовані і представлені у низці наукових праць А. А. Конигіна, В. Г. Петрука, І. В. Васильківського, В. А. Іщенка, В. І. Савуляка, О. В. Березнюка, М. О. Клименка, Н. М. Вознюка, Ю. В. Пилипенка, А. М. Прищепи [3-6], проте, недостатньо розроблена методологія їх кількісного та якісного обліку за оцінки екологічного стану міських території. У зв'язку з цим необхідним стало формування системи індикації сталого розвитку у сфері управління твердих побутових відходів з метою встановлення закономірного утворення та оцінки їх впливу на водні екосистеми.

Мета дослідження – здійснити оцінку впливу твердих побутових відходів на стан поверхневих вод в зоні впливу міста Херсон за індикаторами сталого розвитку.

Матеріали та методи дослідження. Кількісний аналіз об'ємів утворення і структури твердих побутових відходів здійснювався за матеріалами Головного управління статистики у м. Херсоні та Управління екології та природних ресурсів у Херсонській області протягом 2005-2016 років.

Оцінка стану міської системи у сфері поводження з відходами здійснювалася за уніфікованою шкалою базових екологічних індикаторів, розробленою Інститутом проблем природокористування та екології НАН України [7]. Рівень впливу твердих побутових відходів на водне середовище міста Херсона оцінювався за п'ятьма категоріями – еталонний (1,0–0,8), сприятливий (0,8–0,6), задовільний (0,6–0,4), загрозливий (0,4–0,2) і критичний (0,2–0). Серед базових індикаторів найбільш інформативними за здійснення оцінки ступеню забруднення міської території виявились показники утворення відходів I–III класів небезпеки та утворення твердих побутових відходів на душу населення, які були інтегровані за формулою середнього геометричного у агрегований показник поводження з відходами (1):

$$X_{\text{негат}} = \frac{N_{i(\text{max})} - N_i}{N_{i(\text{max})} - N_{i(\text{min})}}, \quad (1)$$

де $X_{негат}$ – негативний базовий індикатор;
 N_i – фактичне значення базового індикатора досліджуваної міської системи;

$N_{i(max)}$ – максимальне значення індикатора;

$N_{i(min)}$ – мінімальне значення індикатора.

Результати дослідження та їх обговорення. Зважаючи на зменшення кількості населення на 8 % протягом останніх 10 років та збільшення загального виробництва промислової продукції на 13, 9 % протягом 2005-2016 років (обласний показник) у Херсонській міській системі спостерігається чітка тенденція до зростання обсягів утворення твердих побутових відходів (рис. 1). Основними джерелами їх формування є переробна (72,6 %) і сільськогосподарська галузі (19 %), домогосподарства (8,4 %) [8].

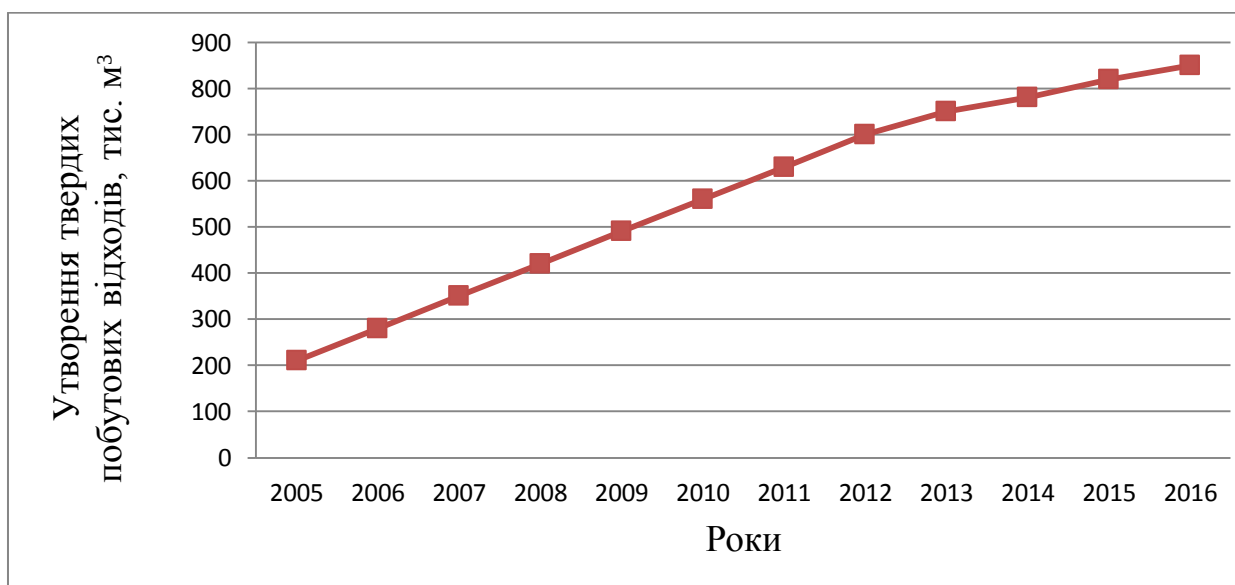


Рис. 1. Динаміка утворення твердих побутових відходів у місті Херсон

Основна частка відходів припадає на папір, харчові органічні відходи, пластик, близько 2 % мають відходи металевих походження. Утворення великих об'ємів паперу та полімерних матеріалів пояснюється широким використанням у повсякденному житті пакувальних матеріалів та пластикових виробів [2].

Міські відходи на 30–50 % складаються з горючих матеріалів і на 20–40 % з негорючого баласту: метал, скло, кераміка. Баластні домішки харчових відходів представлені кістками, босм скла і фаянсу, металевими кришками, банками. Вологість харчових відходів навесні коливається від 60–70 %, влітку і восени – до 80–85 %. Морфологічний склад відходів також змінюється в залежності від сезону року. Так, із зростаючим споживанням овочів та фруктів з весни до осені кількість харчових відходів збільшується до 50 % [3].

Значну екологічну загрозу становлять відходи електричного та електронного обладнання, ртутовмістні освітлювальні прилади, частка яких складає 0,5 %. З ними до складу ТПВ надходять: ртуть – близько 100 мг на кожну люмінесцентну лампу; пестициди і лікарські препарати; компоненти фарб (важкі метали) – до 3–5 % від їхньої закупівельної кількості; важкі метали, марганець, цинк, кислоти, свинець; полімерні матеріали – вихідні компоненти для мимовільного синтезу діоксинів та інших ксенобіотиків.

Склад ТПВ постійно ускладнюється, включаючи в себе все більше екологічно небезпечних компонентів. Враховуючи відсутність законодавчих норм, організованої системи збору, сортування та статистичної звітності комунальних підприємств щодо їх утилізації в м. Херсоні, посилює проблеми у сфері поводження з такими відходами [8].

Щорічне збільшення утворення відходів призводить до збільшення їх маси у розрахунку на душу населення. Так, у м. Херсоні даний показник становить 350–400 кг на людину в рік, що на 40–60 % більше, ніж середньостатистичний показник (250 кг) в Україні.

Слід відмітити, що для м. Херсон постала нагальна потреба у відведенні нового полігону для складування відходів, оскільки сучасне міське звалище на сьогодні є перевантаженим.

Щоденно на херсонському сміттєзвалищі накопичується до 1,8 тис. м³, причому 70 % складають відходи побутової діяльності населення, 30 % – інші відходи. Стає очевидним, що кількість утворених твердих побутових відходів матиме чітку тенденцію до зростання.

На сьогодні експлуатація міського полігону є екологічно небезпечною, оскільки його ложе не захищене гідроізолюючим екраном, розміщення відходів здійснюється без влаштування прошарків глини між шарами відходів.

Зазвичай фільтрати, що утворюються (рис. 2) у разі попадання атмосферних опадів на суміш відходів, мають два природні шляхи міграції до приміських річок – через підземні води та поверхневі стоки. Внаслідок цього відбувається значне забруднення біогенними та токсичними елементами поверхневих вод акваторій р. Вірьовчина і р. Дніпро, що призводить до евтрофікації водойм, поширення інфекційних хвороб, зменшуючи при цьому популяцію водних організмів та здійснюючи соціальне напруження серед мешканців міста.

Накопичення відходів на полігоні ТПВ протягом багатьох років відбувалося безпосередньо на вапняки у відпрацьовані кар'єри бутового каміння без проведення належних агротехнічних та природоохоронних заходів. Найбільш вразливим до техногенезу є перший від поверхні водоносний горизонт, дотичний до вапняків понт-меотичних відкладень.

У процесі багаторічної експлуатації полігону сформувався відносно уповільнений вплив його на гідрохімічну обстановку прилеглої території. Початок будь-якої розробки накопичених відходів може дестабілізувати роками утворений біохімічний баланс та виклати небажану зміну у стані підземних вод, значно погіршити якість питної води в районі розташування полігону ТПВ і за потоком діючих водозабірних споруд. Недостатня природна захищеність водоносних горизонтів в районі розташування відпрацьованих кар'єрів може прискорити забруднення водоносних горизонтів.

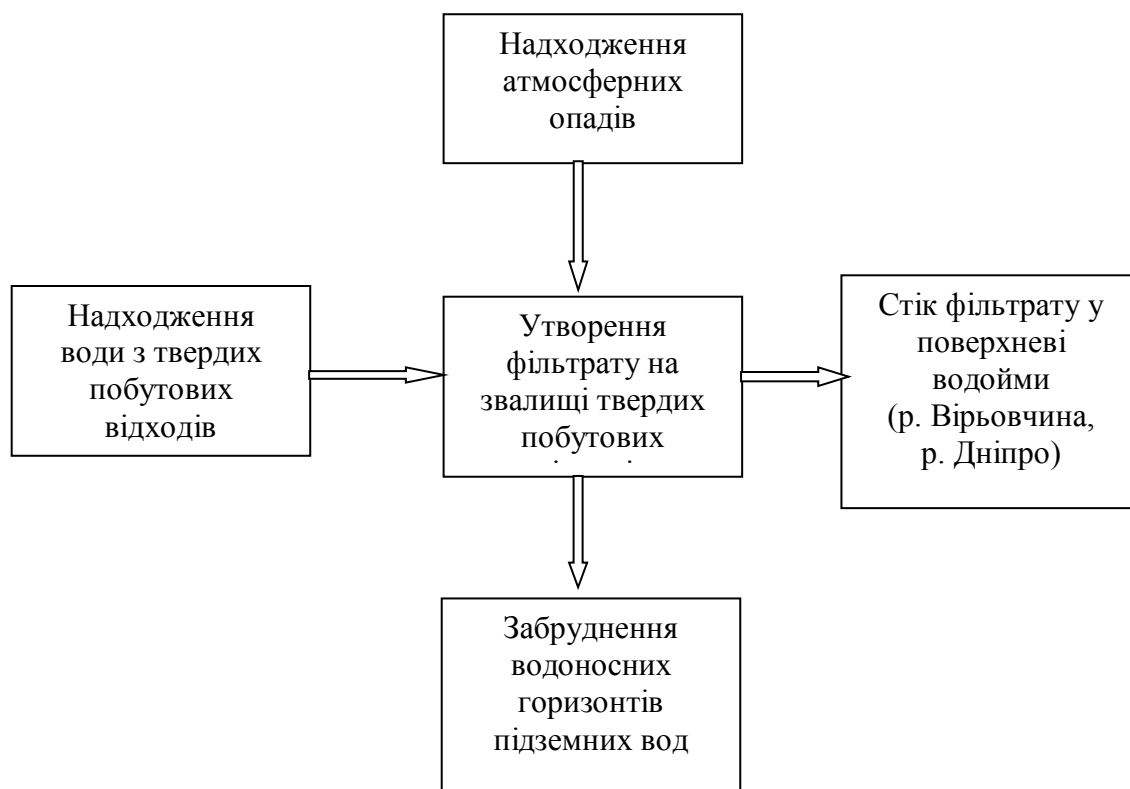


Рис. 2. Шляхи утворення та міграції фільтрату на полігоні твердих побутових відходів м. Херсона

Зважаючи на проблеми у сфері поводження з відходами необхідним було формування системи індикації, шляхом розробки показників утворення відходів класу I–III небезпеки та їх утворення у розрахунку на душу населення (табл. 1).

Оцінка стану поводження з відходами за індикаторами сталого розвитку

Індикатори сталого розвитку	Межі індикатора		Значення базового індикатора (I_{B1}, I_{B2})	Значення агрегованого індикатора (I_a)
	мінімальне значення	Максимальне значення		
Утворення відходів I–III класів небезпеки (I_{B1}), тис. т	1,00	50,00	0,57	0,58
Утворення ТПВ на душу населення (I_{B2}), м ³	1,00	3,20	0,60	

Встановлено, що агрегований показник та його базові складові відповідають задовільному стану ($I_a = 0,58$) функціонування міської системи Херсону у сфері поводження з відходами.

Зважаючи на затратність часу в обчисленні даного показника, нами було запропоновано шкалу базових показників (табл. 2), згідно якої можливо здійснювати безперервний інтерактивний моніторинг кількості утворення

небезпечних побутових відходів для оперативного коригування та впровадження заходів щодо мінімізації їх утворення з метою недопущення поширення забруднюючих речовин у компоненти навколишнього середовища.

Визначення агрегованого показника поводження з відходами

Агрегований показник	Базовий показник	Діапазон показників сталого розвитку				
		0–0,2 критичний	0,2 – 0,4 загрозливий	0,4 – 0,6 задовільний	0,6 – 0,8 сприятливий	0,8–1,0 еталонний
Показник поводження з відходами (I_a)	Утворення відходів I–III класів небезпеки, тис.т	> 50,0	30,0 – 50,0	10,0 – 30,0	10,0 – 5,0	< 5,0
	Утворення ТПВ на душу населення, м ³	> 3,0	3,0 – 2,5	2,5 – 2,0	2,0 – 1,5	< 1,0

Значення базових індексів одержані емпіричним шляхом і за шкалою знаходились в одному діапазоні розвитку (0,4–0,6). Подальшу оцінку стану поводження з відходами слід здійснювати на основі розробленої шкали шляхом підстановки актуальної інформації. Це забезпечить постійне інформування голів райдержадміністрацій та керівників підприємств стосовно кількості небезпечних відходів для здійснення їх безперервного контролю, об'єктивної оцінки ситуації та дотримання законодавства щодо пошуку шляхів утилізації та їх знешкодження. Одним з найбільш дієвих заходів є установка на полігонах систем збору та утилізації фільтрату. Перспективним напрямом в управлінні із ТПВ являється вторинне їх використання шляхом переробки, повторного використання, поліпшення або будь-якого іншого процесу з отриманням вторинної сировини та використанням відходів як джерела енергії

Висновки та перспективи. Проблема утворення твердих побутових відходів у міських системах набула значного розмаху. Особливої уваги потребують заходи захисту ґрунтових та поверхневих вод від утвореного фільтрату. У зв'язку з цим нами була запропонована система індикації сталого розвитку у сфері поводження з відходами, згідно якої стан функціонування Херсонської міської системи було оцінено як задовільний. Запропонована шкала оцінки стану поводження з відходами дозволяє здійснювати постійний контроль за об'ємами утворення небезпечних та побутових відходів, розробляти і впроваджувати відповідні організаційні та управлінські рішення.

References

1. Holets, N., Malovanyi, M., Malyk, Yu.(2013). Rozrakhunok klasu nebezpeky filtratu Hrybovystskoho polihonu tverdykh pobutovykh vidkhodiv [Calculation of the hazard class of the Gribovystskoho filtrate solid household waste landfill]. Bulletin of LDU BZD, 7, 219-224.
2. Malovanyi, M. S., Holodovska, O. Ya., Pasternak, M. I. (2011). Tverdi pobutovi vidkhody m. Lvova ta yikh vplyv na dovkillia [Solid municipal waste in Lviv and

its impact on the environment]. Chemistry, technology of substances and their application, 7, 250-252.

3. Копыльн, А. А. (2011). Kompleksnaia tekhnolohyia ochystky fyltrata polyhonov zakhoronenyia tverdykh bytovykh otkhodov [Complex technology of filtrate purification of land fills for disposal of solid household waste]. Building sciences, 4, 105-109.

4. Petruk, V. G., Vasilkivskiy, I. V., Ischenko, V. A., Petruk, R. V. (2013). Upravlinnya ta povodzhennya z vidhodami. Poligoni tverdih pobutovih vidhodiv [Management and waste management. Polygons of solid household waste]. Vinnitsa: VNTU, 139.

5. Savulyak, V. I., Berezyuk, O. V. (2006). Tehnichne zabezpechennya, zbirannya, perevezennya ta pidgotovki do pererobki tverdih pobutovih vidhodiv [Technical support, collection, transportation and preparation for the processing of solid household waste]. Vinnytsya: Universum-Vinnitsa, 218.

6. Klymenko, M. O., Pylypenko, Yu. V., Pryshchepa, A. M., Vozniuk, N. M. (2010). Monitorynh dovkillia [Environmental monitoring]. Kherson: Oldi-plus, 208.

7. Brezhytska, O. A. (2010). Otsiniuvannia stanu selitebnykh terytorii za pokaznykamy staloho rozvytku (na prykladi mista Dubno Rivnenskoï oblasti) [Assessment of the state and dynamics of atmospheric air pollution of the urbose ecosystem (for example, the city of Dubno)]. Zhytomyr: National Agroecological University. Sumy, 20.

8. Rehionalna dopovid pro stan navkolyshnoho pryrodnoho seredovyshcha v Khersonskoi oblasti za 2016. (2017). [Regional report on the state of the environment in Kherson oblast for 2016] Kherson, 290.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ТВЕРДЫХ БЫТОВЫХ ОТХОДОВ НА СОСТОЯНИЕ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОД В ЗОНЕ ДЕЙСТВИЯ ГОРОДА ХЕРСОН

С. В. Скок

Аннотация. В статье рассмотрена проблема образования твердых бытовых отходов в городских экосистемах. Отсутствие учета образования отходов, установления степени их опасности способствовало необходимости определения показателей устойчивого развития в сфере обращения с отходами. Система показателей для города Херсон состоит из базовых показателей обращения с отходами: образование отходов I-III классов опасности и образования ТБО на душу населения, м^3 , которые были интегрированы по формуле среднего геометрического в агрегированный показатель обращения с отходами.

В результате расчетов установлено, что в сфере обращения с отходами город Херсон имеет удовлетворительное состояние (агрегированный показатель $I_a = 0,58$). В общей структуре твердых бытовых отходов около 45 % составляли пищевые отходы. Образованные фильтраты имеют два естественных пути миграции в пригородные реки – через подземные воды и поверхностные стоки. В результате происходит значительное загрязнение биогенными и токсичными элементами поверхностных вод акваторий р. Веревчина и р. Днепр. Поэтому для оперативного определения состояния в сфере обращения с отходами нами была разработана шкала показателей

устойчивого развития с целью принятия мер по минимизации попадания в водные объекты загрязняющих веществ.

Ключевые слова: твердые бытовые отходы, урбанизация, фильтр, показатели устойчивого развития, полигон, подземные воды, поверхностные воды

THE ESTIMATION OF THE IMPACT OF SOLID HOUSEHOLD WASTE ON THE STATE OF SURFACE WATERS IN THE AREA OF KHERSON

S. Skok

Abstract. The study looks at the problem of solid household waste generation in urban ecosystems. The lack of registration of waste and the level of its danger led to developing the indicators of sustainable development in the area of waste management. The system of indicators of sustainable development of Kherson consisted of the basic indexes and the aggregate index of waste management. The most informative in performing the estimation of the urban territory were the indexes of waste generation of the 1st–3rd levels of danger and solid household waste generation per capita which were integrated by the formula of the geometric mean into the aggregate index of waste management. An increase in the numeric parameters of the basic indexes caused a worse situation in the area of waste management. There is a distinct tendency for an increase in their annual volumes. While calculating, a satisfactory condition in the area of waste management was established: the aggregate index I_a made 0.58. It was established that in the general structure of solid household waste, food waste made about 45 %. The generated filtrates have only two natural ways for migration: filtration into ground waters or entering the ravine and the river Virovchyna and the Dnipro river. As a result, there is progressive pollution of Kherson surface waters by biogenic and toxic elements. Therefore in order to determine the condition in the area of waste management, the scale of the indicators of sustainable development was developed to take measures aimed at minimizing the number of pollutants entering water bodies.

Keywords: solid household waste, urbanization, filtrate, indicators of sustainable development, landfill, ground waters, surface waters.

ЕКОЛОГІЧНА МЕРЕЖА СХІДНОГО ПОДІЛЛЯ: ОСНОВНІ ЕТАПИ І РЕСУРСИ ФОРМУВАННЯ

Ю. Ю. ОВЧИННИКОВА, старший викладач кафедри зоології та екології
Донецький національний університет імені Василя Стуса
E-mail: yu.ovchinnikova@donnu.ed.ua

Анотація. На основі літературних і картографічних джерел, польових досліджень, реєстру природно-заповідного фонду, довідників і визначників рослин і тварин, кадастру, краєзнавчих матеріалів із подальшою критично-системною обробкою зібраного матеріалу визначено етапи формування екологічної мережі Східного Поділля. Розглянуті основні положення концепції створення регіональної екологічної мережі. Запропоновано необхідні ресурси для її розбудови. Подано програму формування екологічної мережі Східного Поділля на 2017-2030 роки.

Доведено, що ефективне формування і функціонування регіональної екологічної мережі можливе за умови виконання комплексу рекомендованих автором заходів. З метою створення ефективної регіональної екологічної мережі необхідно взяти під заповідання об'єкти і території історико-культурної спадщини як просторові елементи. Слід зазначити, що перспективним напрямом діяльності із збереження об'єктів історико-архітектурної спадщини є створення Національних природних парків – природоохоронних рекреаційних установ, що мають особливу природоохоронну й історико-культурну цінність.

Ключові слова: екологічна мережа, етапи, ресурси, ключові території, Східне Поділля, збалансований розвиток

Актуальність. Збереження біотичного і ландшафтного різноманіття є одним з найважливіших завдань збалансованого розвитку людства, яке має значення для всіх сфер його діяльності. Це завдання було сформульовано в міжнародних Конвенціях, Угодах і Директивах як світової спільноти, так і всіх країн ЄС. Для збереження біотичного різноманіття (БР), збалансованого природокористування будь-якого регіону необхідно сформувати його екологічну мережу (ЕМ) [5, с. 7].

Мета роботи – виділити основні етапи та ресурси формування і реалізації екологічної мережі Східного Поділля в контексті стратегії збалансованого розвитку регіону.

Матеріали і методи досліджень. Об'єктом дослідження були просторові елементи екологічної мережі Східного Поділля: ключові території (КТ) або природні чи еталонні ядра, сполучні території (екологічні коридори, ЕК), буферні зони (БЗ) й відновлювальні території (ВТ). Ці елементи у своїй неперервній єдності створюють екологічну мережу, яка функціонально має об'єднати осередки біотичного і ландшафтного різноманіття в єдину

просторово-територіальну систему. Використано реєстр ПЗФ Вінницької області, визначники рослин і тварин, Червону і Зелену книги України, методичні рекомендації щодо формування схеми регіональної екологічної мережі (РЕМ) та заходи щодо її реалізації.

Основні методи досліджень – ландшафтно-екологічні, лісотипологічні, агроекологічні, гідроекологічні, ретроспективного аналізу, моніторингу, статистичні, картографічні, польові.

Результати дослідження. В основу розробки проекту формування ЕМ Східного Поділля мають бути покладені такі основні положення концепції створення РЕМ:

1) основою для розбудови РЕМ є оптимізована природно-заповідна мережа регіону;

2) ЕМ Східного Поділля є частиною ЕМ Право-бережного Лісостепу України, що забезпечує органічне межування з іншими міжнародними, національними, регіональними і локальними ЕК;

3) основними структурними елементами ЕМ Східного Поділля є 16 ЕК (площею 688487 га, що становить 25,98 % від його загальної площі): 3 – національного (як складові Бузького, Дністровського, Південноукраїнського – 306406 га, що становить 11,56 % від його загальної площі), 6 – регіонального (222985 га, що становить 8,41 % від загальної площі області) і 7 – локального рівня (159096 га, що становить 6 % від його загальної площі), вздовж яких визначені природні ядра (біоцентри, БЦ), функціонування яких забезпечують 24 ключові території (заповідні об'єкти): 1 – міжнародного, 3 – національного, 9 – регіонального і 11 – локального рівня (площею 123557,93 га, що становить 4,66 % від його загальної площі), визначені 60 ВТ (72042,6 га, що становить 2,71 %) і БЗ, площею біля 200 тис. га;

4) основним шляхом розбудови РЕМ є подальша оптимізація ПЗФ регіону в напрямку створення біосферних заповідників (БСЗ), природних заповідників (ПЗ), національних природних парків (НПП), регіональних ландшафтних парків (РЛП), заказників, штучних природно-заповідних об'єктів і територій (ПЗОіТ) – ботанічних садів, дендрологічних парків;

5) виділення меж в натуру ПЗОіТ;

6) виділення меж БЗ, ЕК і ВТ;

7) формування і реалізація РЕМ потребує “вписання” її в “Схему планування Вінницької області”, забезпечення якісно нової екологобезпечної раціональної організації території, зменшення кількості “гарячих точок” (місць скидання стічних вод, сміттєзвалищ, гноєсховищ, складів для зберігання мінеральних добрив і пестицидів, відходів фосфогіпсу, золошлаковідвалу тощо);

8) створення РЕМ сприятиме відновленню і підтриманню екологічної рівноваги Правобережного Лісостепу України, вирішенню проблем збереження БР на видовому, ценотичному, екосистемному, ландшафтному рівнях, середовищ існування (біотопів, оселищ) й забезпечить збалансований розвиток суспільства регіону [1, с. 368; 2, с. 186; 3, с. 9; 4, с. 227].

Для Східного Поділля виділено такі основні етапи формування РЕМ, що стане частиною національної (НЕМ) і Пан-Європейської екологічної мережі (ПЄЕМ):

- дослідження природних умов, ресурсів і особливостей регіону, стану екосистем, біотопів і ландшафтів, необхідних для формування і реалізації РЕМ;
- аналіз репрезентативності існуючої природно-заповідної мережі регіону;
- створення спільних транскордонних елементів ЕМ у межах ЕК, узгодження проектів землеустрою на прикордонних ділянках з Молдовою;
- складання переліку об'єктів природної й історико-культурної спадщини як перспективних КТ, створення бази даних для формування РЕМ;
- розробка проекту перспективної (проектованої) РЕМ, яка враховує ступінь трансформації природних ландшафтів, включаючи міста обласного підпорядкування з метою збереження БР урбоекосистем. Для цього необхідно обстежити і зарезервувати території для заповідання та виділити територіальні елементи РЕМ на місцевості;
- визначення природних ядер національного, регіонального і локального рівня, які виконуватимуть роль біоцентрів, локальних і регіональних ЕК, екостабілізуючих зон, екостабілізуючих пауз, зон можливих конфліктів транспортної мережі та РЕМ;
- посилення охорони природних екосистем існуючих біоцентрів за рахунок оптимізації природно-заповідної мережі регіону;
- обстеження і визначення БЗ та ВТ, включаючи різні види антропогенних ландшафтів, для всіх КТ і ЕК різного рівня 27 адміністративних районів;
- координація ЕМ Східного Поділля з суміжними регіонами (9 областями і Республікою Молдова), виділення екологічних вузлів (ЕВ);
- визначення ризиків для збереження біоландшафтного різноманіття від еколого-небезпечних об'єктів, які перешкоджають формуванню і реалізації РЕМ, та виконання комплексу заходів щодо нейтралізації їх впливу;
- розроблення програми формування РЕМ до 2020 р., а потім, згідно з проектом змін до “Загальнодержавної програми формування національної екомережі України на 2000-2015 роки”, до 2030 р.;
- реалізація проекту РЕМ на період до 2020 р. (відповідно до природоохоронного законодавства України) і на перспективу до 2030 р. (згідно проекту змін).

На території Східного Поділля є всі необхідні ресурси для розбудови РЕМ, які увійдуть до ЕК і природних ядер: ПЗОіТ загальнодержавного і місцевого значення, поверхневі водні об'єкти, ліси І групи віком понад 50 років, курортні і лікувально-оздоровчі території, рекреаційні зони, залишки природної і напів-природної рослинності, агроландшафти, зайняті багаторічними і однорічними культурами. Розбудові РЕМ значною мірою сприяє розвинена гідрографічна мережа, основу якої складають річки, вздовж долин і заплав яких зосереджені основні площі природної рослинності, яку необхідно охороняти. В регіоні каркас ЕМ складають ключові 415 територій і об'єктів ПЗФ загальнодержавного і місцевого значення. Вони становлять 2,26 % від загальної площі території області, що в 5-6 разів нижче від рекомендованої вченими норми. Результати World

Watch Institute (Вашингтон) свідчать про те, що для підтримання нормального функціонування екосистем і ландшафтів будь-якого регіону площа “диких” (первісних), неущоджених людською діяльністю територій (акваторій) в його межах має становити не менше 10-12 % від загальної території, а оптимальна площа заповідних територій – 20 %.

Серед ПЗОіТ Східного Поділля найважливішу роль ключових територій відіграють об’єкти охорони ландшафтів і біотопів – ландшафтні, ботанічні, лісові, гідрологічні, орнітологічні, загальнозоологічні, ентомологічні заказники, заповідні урочища, які розташовані в заплавах, надзаплавно-терасових, схилових і плакорних (вододільних) типах місцевостей. Однак, у межах проєктованих ЕК (національних, регіональних, локальних) їх концентрація нерівномірна, тому для збереження центрів БР необхідно створити нові заповідні об’єкти – різних категорій і функціонального призначення. В межах регіону, враховуючи ареал мешкання червонокнижних (особливо зубра, популяція якого складає 101 особину) і регіонально рідкісних тварин та умови існування рослин, на базі 34 заповідних об’єктів і лісомисливських господарств Вінницького, Калинівського, Літинського, Хмельницького районів) необхідно створити НПП “Центральне Поділля” (46,4 тис. га). З позицій геоботанічного і фізико-географічного районування доцільно створити РЛП-и: “Буго-Собський” (1,5 тис. га), “Удринський” (430 га), “Лядова” (3,5 тис. га), “Рів” (350 га), “Надросся” (550 га), “Мурафські Товтри” (26,3 тис. га) та інші. При цьому необхідно розширити такі РЛП-и “Дністер” (з 6719,48 га до 18230 га), “Мурафа” (з 3452,7 га до 10 тис. га). Враховуючи біотичну репрезентативність і унікальність, доречно розширити площу загальнозоологічних заказників державного значення “Буго-Деснянський” і “Згарський”. До територій, які мають міжнародне значення відповідно до Рамсарської конвенції, можна віднести Микулинецькі ставки (Літинський р-н), долину р. Снивода, верхів’я Сандракського водосховища (Хмельницький р-н), Гармакські ставки (Барський р-н). Доречним є створення зоологічного заказника “Війтівський” (Бершадський р-н); орнітологічного заказника “Іванівський”, де б охоронялись ІВА території; ландшафтних заказників “Березнянська дача” і “Чудинівські пороги” (перший каскад мальовничих порогів у руслі Південного Бугу); НПП “Бузькі пороги”, об’єднавши РЛП “Середнє Побужжя” і “Немирівське Побужжя” (площею 16,5 тис. га, другий каскад мальовничих Стрільченських, Врублівецьких, Сокілецьких, Печорських порогів); заповідних об’єктів річища і заплави Дністра й Південного Бугу, де знаходиться значна кількість унікальних долинно-річкових ландшафтів, які підпадають під дію Європейської ландшафтної конвенції [1, с. 369].

Одним із перспективних унікальних об’єктів національної екологічної мережі (НЕМ) може стати транс-біосферний резерват (ТБР) “Дністровський каньйон” – система каньйонів Придністер’я, яку утворює річка Дністер зі своїми притоками. Включення до складу ТБР правобережної частини Дністра Івано-Франківської (відм. Галич), Чернівецької областей і лівобережної частини Тернопільської, Хмельницької і Вінницької областей (до м. Ямпіль) дозволить збільшити його площу до 250 тис. га й зберегти унікальне БР і ландшафтне різноманіття Подільського біосферного ядра,

репрезентувавши його в структурі НЕМ і Пан-Європейську екологічну мережу (ПЄЕМ) [1, с. 369].

Програма формування ЕМ Східного Поділля на 2017-2030рр. подана в табл.1.

Основним ресурсом для формування РЕМ є землі водного фонду: а) водо-охоронні зони; б) прибережні захисні смуги; в) берегові смуги; г) смуги відведення; д) зони санітарної охорони. Для них встановлено відповідний нормативно-правовий статус і введено обмеження щодо господарського використання.

Ще одним ресурсом за формування РЕМ є агроландшафти. У Східному Поділлі є значні площі сільгоспземель, які внаслідок інтенсивного використання втратили свою природну продуктивність. Це еродовані, заболочені, підтоплені, зрошувані, осушувані, радіаційно забруднені угіддя, які необхідно виводити із сільгоспвикористання і включати до складу РЕМ (природних лісових, чагарникових, лучних, степових, прибережно-водних угруповань). Тепер державний земельний кадастр дає змогу здійснити реальну економічну оцінку кожної ділянки землі.

Важливим ресурсом за формування ЕМ області є використання гірничо-промислових ландшафтів (закинутих кар'єрів), рекультивація яких дозволяє відновити рослинний покрив та використати їх як елементи ЕМ – ВТ [4, с. 229].

Табл. 1. Програма формування екомережі Східного Поділля на 2017-2030 рр.

Назва заходів	Відповідальні виконавці
Створення бази даних і визначення еталонних ділянок для формування структурних елементів екомережі	Обласний геодезцентр, **ДЗР, *ДЕПР
Вдосконалення і реалізація регіональної схеми екомережі	Обласний геодезцентр, ДЗР
Розробка проектів відведення земель для:	ДЕПР Івано-Франківської, Терно-пільської, Чернівецької, Хмельницької і Вінницької областей
ТБЗ “Дністерський каньйон” (219113,01 га);	ДЗР і ДЕПР Вінницької області
ПЗ “Згарський” (5203,4 га);	ДЗР і ДЕПР Вінницької області
НПП “Центральне Поділля” (46420 га);	ДЗР і ДЕПР Вінницької області
РЛП “Мурафські Товтри” (26,3 тис. га), “Буго-Собський” (1536 га), “Удицький” (430 га);	ДЗР і ДЕПР Вінницької області
РЛП “Лядова”(3563 га), “Рів”(2323 га), “Надросся”(550 га);	ДЗР і ДЕПР Вінницької області
розширення РЛП “Мурафа”, “Середнє Побужжя”, “Дністер”;	ДЕПР Вінницької області
створення НПП “Бузькі пороги” (16500 га);	ДЕПР Вінницької області
- розширення зоопарку “Вінницький” (до 20 га)	ВОКСЛП “Віноблагроліс”
Винесення меж в натуру для об’єктів ПЗФ	ДЗР
Інвентаризація ландшафтів територій ПЗФ області	ДЕПР
Створення заповідних об’єктів державного (14) і місцевого (96) значення	ДЕПР Вінницької області

Надання ДЕПР програмного забезпечення,
необхідного для створення ГІС та бази даних ПЗФ
Інвентаризація видів рослин і тварин, занесених
до ЧС МСОП, ЄЧС, міжнародних конвенцій і
угод, ЧКУ, регіо-нально рідкісних видів,
синтаксонів, занесених до ЗКУ
Оцінка стану популяцій тварин і рослин ЧКУ в
регіоні
Інвентаризація степових, лучних, лісових
ділянок ЗКУ
Інвентаризація ВБУ (Рамсарська конвенція) і
місцевих
Створення полігонів для штучного розведення
рідкісних і зникаючих видів рослин і тварин
Створення і відновлення водоохоронних зон та
ПЗС
Створення і відновлення захисних
лісонасаджень та полезахисних лісосмуг,
заліснення деградованих земель
Залуження деградованих земель

ДЕПР Вінницької області

ДЕПР Вінницької області

ДЕПР, ****ОУЛМГ

ДЕПР, ДЗР

ДЕПР, басейнові ради

ДЕПР, ОУЛМГ, установи
ПЗФ

ДЗР, водгоспи, ***ВКССМР

ОУЛМГ,
“Вінницяоблагроліс”,
ВКССМР
ДЗР, ОУЛМГ, “Вінницяобл-
агроліс”, ВКССМР

Примітка: * ДЕПР – Департамент екології та природних ресурсів; ** ДЗР – Департамент земельних ресурсів; *** ВКССМР – виконавчі комітети сільських, селищних і міських рад; **** ОУЛМГ – обласне управління лісового і мисливського господарства

Основними КТ екологічної мережі Східного Поділля є лісові ландшафти, частка яких складає 13,3 % від загальної площі регіону. Одним із основних аспектів створення об'єктів ЕМ є виділення особливо цінних у генетико-селекційному відношенні популяцій деревних видів. До таких популяцій слід віднести об'єкти збереження генофонду *insitu*, зокрема генетичні резервати, плюсові насадження і плюсові дерева. Ці об'єкти входять до постійної лісонасінної бази підприємств, які здійснюють лісогосподарську діяльність. Лісовий генетичний резерват являє собою ділянку лісу, типову за своїми фітоценотичними, лісівничими і лісорослинними умовами для певного природно-кліматичного району, у якій зосереджена цінна в генетико-селекційному відношенні частина популяції, виду, екотипу. Генетичні резервати виділяють у природних пристигаючих, стиглих, рідше середньовікових, плюсових і нормальних насадженнях, площею не менше 0,5 га із повнотою деревостанів не нижче 0,6. До плюсових відносять дерева, які за інтенсивністю росту перевищують середні показники насадження за висотою не менше ніж на 10 %, за діаметром стовбура – на 30 % і при цьому характеризуються високою селекційною якістю та біологічною стійкістю. Відбір плюсових дерев проводять переважно у стиглих і пристигаючих насадженнях природного походження, а також у високопродуктивних насадженнях штучного походження за типологічним принципом і фітогенетичними ознаками. Головними критеріями відбору плюсових насаджень є винятково високі показники продуктивності, якості стовбурів, біологічної стійкості. До плюсових відносять стиглі, пристигаючі або середньо-вікові насадження, які мають найвищу для цього типу умов місцезростання продуктивність, повнотою не нижче 0,6. У плюсових насадженнях участь плюсових та кращих нормальних дерев повинна становити 15-27 % у залежності від повноти насадження. Наразі відібрано близько 285,3 га генетичних резерватів, атестовано близько

53 га плюсових насаджень, внесено до реєстру 123 плюсових дерева, з яких – 109 дерев дуба звичайного. Більшість резерватів представляє свіжу грабову діброву, 3 із них – свіжу грабову діброву із дубом скельним, та 1 – вологу грабову діброву. Основними показниками сучасного стану генетичних резерватів і плюсових насаджень є продуктивність насаджень та участь цільової породи у складі насаджень. У більшості насаджень південної частини регіону відмічена постійна участь дуба скельного (1-4 одиниці). У цих насадженнях виділені як дерева дуба та скельного, так і гібридні форми. У складі деяких резерватів входять насадження штучного походження віком 60-70 – років із низькою участю дуба у складі (Тульчинське ЛГ, Брацлавське лісництво ур. “Маркова дубина” кв. 35-40). Такі резервати необхідно виключити із лісонасінневої бази та підібрати більш продуктивні насадження. Найбільш високопродуктивними є плюсові насадження і генетичні резервати Вінницького ЛГ, Прибузьке лісництво, Жмеринського ЛГ, Жмеринське лісництво, Іллінецького ЛГ, Немирівське лісництво, Тульчинського ДЛГ, Брацлавське лісництво. Аналіз таксаційних матеріалів закладених тимчасових пробних площ у генетичних резерватах і плюсових насадженнях показав, що суттєвих змін у складі та продуктивності насаджень за останні 20 років не відбулося. Спостерігаються закономірні тенденції зростання середньої висоти та діаметру насаджень. Зниження участі головної породи на 2 одиниці відмічено у Бершадському ЛГ, Сумівське лісництво (кв. 11 вид. 8); Чечельницькому ЛГ, Червоногреблянське лісництво (кв. 71 вид. 1), Могилів-Подільському ЛГ, Моївське лісництво (кв. 19 вид. 3), Хмельницькому ЛГ, Літинське лісництво (кв. 53 вид. 2), Тульчинському ЛГ Брацлавське лісництво (кв. 11 вид. 9, пп № 14). Зниження повноти відмічено у Крижопільському ЛГ, Рудницьке лісництво (кв. 58 вид. 2), Хмільникському ЛГ, Літинське лісництво (кв. 42 вид. 2). Подальші дослідження слід направити на пошук і виділення особливо цінних у генетико-селекційному відношенні популяцій деревних видів (генетичних резерватів, плюсових насаджень і плюсових дерев), їх резервацію, моніторинг, створення електронного каталогу з метою збереження і розширеного відтворення генетичного фонду популяцій лісоутворюючих порід та включення їх до структурних елементів РЕМ. Вони, в першу чергу, мають бути віднесені до БЦ [6, с. 173].

З метою створення ефективної РЕМ необхідно взяти під заповідання об'єкти і території історико-культурної спадщини як просторові елементи. Перспективним напрямом діяльності із збереження об'єктів історико-архітектурної спадщини є створення НПП і РЛП – природоохоронних рекреаційних установ, що мають особливу природоохоронну й історико-культурну цінність. Для таких поліфункціональних об'єктів передбачено диференційований режим охорони і використання територій, а також створення спеціальних адміністрацій з управління ними [8, с. 103].

Висновки та перспективи. Ефективне формування і функціонування РЕМ можливе за умови:

- збереження всього комплексу екосистем і середовищ існування (оселищ) для збереження реліктових, ендемічних і зникаючих видів, їх генетичного різноманіття, а також сприяння відтворенню територіальної й функціональної цілісності унікальних ландшафтів локального і регіонального значення;

- створення кадастру існуючих ПЗОіТ та проведення інвентаризації об'єктів ПЗФ з метою виявлення нових територій, перспективних для включення до РЕМ;
- проведення паспортизації заповідних об'єктів, визначивши ступінь їх репрезентативності, унікальності, атрактивності;
- створення необхідних умов для обміну між генетичною речовиною, розселенням і міграцією (кочівлею) видів, а також збереженням міграційних шляхів, створенням функціонуючих ЕК;
- забезпечення відновлення компонентів ключових екосистем, які зазнали руйнації, ренатуралізації особливо цінних деградованих екоотопів і різноманіття для проходження різних стадій відновлювальних сукцесій з метою повернення до природного біогеоценотичного покриву;
- захисту екосистем і ландшафтів від потенційно негативних чинників, підвищення їх продуктивності, захист життєво важливих екологічних процесів, збільшення і підтримка екологічної місткості рослинних угруповань (синузій, асоціацій, формацій, групформацій), стабілізація екологічного гомеостазу на локальному, регіональному і національному рівнях, поліпшення стану довкілля;
- збільшення площі ПЗФ, створення перспективної (проектованої) РЕМ, введення нових категорій заповідних об'єктів (зокрема ПЗ, БСЗ);
- виділення меж в природу для ПЗОіТ. Так, для ПЗОіТ загальнодержавного значення, які займають площу 29,7 тис. га, виділені межі в природу лише на площі 14,1 тис. га, що становить 47,4 %. Для ПЗОіТ місцевого значення, площею 24,8 тис. га, виділені межі в природу на площі 15,5 тис. га, що становить 62,5 %;
- вивчення природних особливостей Східно-Подільського регіону, кількості і стану його екосистем, оцінки природних ресурсів, необхідних для реалізації ЕМ в контексті збалансованого розвитку (ЗР);
- розроблення еколого-збалансованих схем землекористування для кожного типу островних територій в межах ЕМ й річкових долин з урахуванням потреб збереження ландшафту;
- обмеження інтенсивного використання “ековразливих” земель, впровадження контурно-полосної структури землекористування й адаптивних агротехнологій, створення нормативно-правової бази для стимулювання ґрунто- й водоохоронної систем землекористування, консервації еродованих ґрунтів;
- проведення екологічнобезпечного використання меліорованих земель на ландшафтній основі, відновлення ґрунтоводоохоронної структури водозбірних басейнів, створення польової гідрографічної мережі в агроландшафтах;
- розроблення ефективного механізму проведення незалежної екологічної експертизи, аудиту, інспектування об'єктів заповідання з впровадженням науково-обґрунтованих систем у межах ділянок ЕМ;
- встановлення оцінки ландшафтного різноманіття територій регіону, яка виконана на основі класифікації різних типів ландшафтів, що проведена з використанням біоцентрично-мережевої структури кількісних показників ступеня різноманітності, складності, контрастної ландшафтної структури території, що визначають ареали з найбільш різноманітною структурою;

- забезпечення збереження БР, що входить до складу агроландшафтів області, які становлять 76,1 % території;

- збереження цілісності і непорушеності лісових масивів, відтворення лісових угруповань високої якості у всіх лісах (в т. ч. плюсових насаджень), включаючи ПЗОіТ, за рахунок організації проведення на належному технічному рівні моніторингу лісових екосистем з урахуванням потреб збереження БР, створення нових, підтримки існуючих ПЗОіТ за рахунок залишків незайманих лісів, особливо цінних ділянок лісового фонду, що мають наукове значення;

- забезпечення максимального збереження і відтворення лісів, що виконують захисні функції (водоохоронні, протиерозійні), через збільшення лісистості з 13,3 до 15-17 % за рахунок заліснення низькопродуктивних і деградованих земель сільськогосподарського призначення;

- регулювання рекреаційного навантаження, зведення його до оптимального, на основі розроблених методик і заходів для лісових масивів і водних угідь, зберігання й насаджування санітарно-гігієнічних і оздоровчих лісів, довівши їх площу до оптимальної, що дозволить стабілізувати екоситуацію, збільшити ресурси деревини;

- зберігання пам'яток історико-культурної спадщини, самотутніх технологій господарювання з включенням їх до просторових елементів РЕМ;

- сприяння ефективному розвитку екологічного туризму (розробивши екологічні стежки), що є соціально корисним та економічно вигідним на об'єктах ПЗФ;

- оптимізації заходів, спрямованих на поліпшення ведення мисливського господарства, проведення більш чіткого обліку диких тварин і птахів, визначення ареалів їх поширення, зменшення неконтрольованого полювання і браконьєрства. Мисливські тварини є ресурсом державного значення і становлять державний мисливський фонд. Впродовж останніх років спостерігається тенденція до зростання загальних витрат на ведення мисливського господарства;

- посилення відповідальності місцевих органів влади, громадських організацій і місцевого населення загалом за збереження біо- й ландшафтного різноманіття краю та підтримання на належному рівні об'єктів РЕМ;

- підвищення рівня екологічної освіти, виховання та інформованості населення щодо значення й охорони заповідних об'єктів (територій);

- дотримання правової бази та пакету нормативно-регулюючих документів (постанов, актів, положень і законів), які спрямовані на реорганізацію структури природокористування, його економічних аспектів, становлення взаємин між суб'єктами в процесі розбудови і реалізації РЕМ [1, с. 373].

Зараз необхідно впроваджувати “Загальнодержавну цільову програму формування та реалізації національної екомережі України на 2009-2020 роки”, згідно якої площа земель ЕМ до 2018 року має складати 41,68 %, до 2023 р. – 50 %, до 2030 р. – 60 % (2/3 земель має бути у природному стані – ідеальний варіант за Ю. Одумом) [7, 9]. Відповідно площа ПЗФ Східного Поділля має бути в 2018 р. – 5 %, 2019 р. – 8,3 %, 2020 р. – 10,4 %, 2030 р. – 15 %. Лише кількість об'єктів вищої категорії ПЗФ має сягнути 10, що

становитиме 7 % від загальної площі території регіону, зараз їх 5. Для виконання загальнодержавної програми Вінницька обласна рада прийняла рішення (від 22.10.2003 р. № 429) про розроблення “Регіональної програми екологічної мережі Вінницької області на 2004-2015 роки”. Згідно якої розроблена схема формування РЕМ, що потребує суттєвого вдосконалення.

References

1. Mudrak, O. V., Mudrak, G. V. & Polishchuk V.M. et al. (2015). *Etalony pryrodi Vinnychyny [Standards of nature of Vinnytsya]*. Vinnytsia, Ukraine: LTDKonsol, 540.
2. Mudrak, O. V. (2010). Vinnytsia region in the structure of the national ecological network. Proceedings from Balanced (sustainable) development of Ukraine is a priority of national policy. *All-Ukrainian Scientific Ecological Conference*. (Ukraine), 185-187.
3. Mudrak, O. V. & Ovchynnykova, Yu. Yu. (2017). Eastern Podillya is a representative region of the National Ecological network. – *Agroecological journal*, 4, 7-13.
4. Mudrak, O. V. (2011). Ecological network of Vinnytsya: state, problems, prospects. III All-Ukrainian Congress of Ecologists with International Participation (Ukraine), Vol. 1, 226-230.
5. Mudrak, O. V. & Mudrak, H. V. (2013). *Osoblyvosti zberezhenntia bioriznomanittia Podillia: teoriia i praktika [Features of biodiversity conservation in Podilia: theory and practice]*. Vinnytsia, Ukraine: Nilan-LTD, 320.
6. Neiko, I. S. & Mudrak, O. V. (2009). Forest genetic component as the basis of the key ecological network of the Eastern Podilia. *Journal of Zhytomyr National Agroecology University*. Vol. 2, № 25, 170-174.
7. Odum, Yu. (1986). *Ekolohiia [Ecology]*. Mir, 390.
8. Popovych, S. Yu. (2007). *Pryrodno-zapovidna sprava [Natural-reserved case]*. Kyiv, Ukraine: Aristei, 480.
9. Environmental protection legislation of Ukraine. Available at: <http://www.rada.gov.ua>.

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ СЕТЬ ВОСТОЧНОГО ПОДОЛЬЯ: ЭТАПЫ И РЕСУРСЫ ФОРМИРОВАНИЯ

Ю. Ю. Овчинникова

Аннотация. Используя литературные и картографические источники, проведя полевые исследования, применяя реестр естественно-заповедного фонда, справочников и определителей растений и животных, кадастр, краеведческие материалы с последующей критически системной обработкой собранного материала определены этапы формирования экологической сети Восточного Подолья. Рассмотрены основные положения концепции создания региональной экологической сети. Указаны необходимые ресурсы для ее развития. Подана программа формирования экологической сети Восточного Подолья на 2017-2030 годы.

Определено, что эффективное формирование и функционирование региональной экологической сети возможно при условии выполнения комплекса рекомендованных автором мероприятий.

Ключевые слова: экологическая сеть, этапы, ресурсы, ключевые территории, Восточное Подолье, сбалансированное

резюме.

ECOLOGICAL NETWORK OF THE EASTERN PODILLYA: STAGES AND RESOURCES OF FORMATION

Yu.Yu. Ovchynnykova

Abstract. *The stages of formation of the ecological network of the Eastern Podillya have been determined on the basis of literary and cartographic sources, field research, the register of the nature reserve fund, reference books and determinants of plants and animals, cadastre, ethnographic materials with subsequent critical-system processing of the collected material. Consider the main provisions of the concept of creating a regional ecological network. The necessary resources are offered for its development. The program of formation of the ecological network of Eastern Podillya for 2017-2030 is submitted. It is advised that effective formation and functioning of the regional ecological network is possible provided that a set of measures recommended by the author is carried out.*

Keywords: *ecological network, stages, resources, key territories, Eastern Podillya, balanced development*

ЕКОЛОГІЧНА ОЦІНКА ЯКОСТІ ПОВЕРХНЕВИХ ВОД Р. МОЛОЧНА

В. П. СКИБА, асистент кафедри геоєкології і землеустрою

Таврійський державний агротехнологічний університет

Н. М. ВОЗНЮК, кандидат сільськогосподарських наук, доцент кафедри екології, технології захисту навколишнього середовища та лісового господарства

Національний університет водного господарства та природокористування

E-mail: skiff_vika@ukr.net, n.m.voznyuk@nuwm.edu.ua

Анотація. На підставі узагальнення та систематизації даних багаторічних досліджень гідрохімічних показників р. Молочна виконано екологічну оцінку якості поверхневих вод. Розрахунки проведено за проектною методикою «Екологічної оцінки якості поверхневих вод за відповідними категоріями», яка є найсучаснішою розробкою і враховує основні положення діючої в Європі Водної Рамкової Директиви ЄС 2000/60/ЕС. На підставі отриманих результатів запропоновано корективи до уточнення категорії якості поверхневих вод.

Уточнена категорія якості поверхневих вод р. Молочна дозволила проаналізувати процеси, які відбуваються у гідрологічному об'єкті, а саме: встановити наближення перехідного коефіцієнта до межі покращення, чи, навпаки, погіршення екологічної ситуації. Виходячи з цих цифрових показників проаналізовано динаміку зміни якості води досліджуваного водотоку за період 1990-2015 рр., визначено основні речовини-поллютанти, які є пріоритетними для даної річки. Вперше проведено комплексну оцінку якості поверхневих вод річки Молочна за багатьма гідрохімічними та наявними гідробіологічними показниками, визначено клас та категорію якості води, загальний ступінь забруднення, трофності та сапробності. Висновки роботи можуть стати опорними за встановлення режиму господарювання та впровадженні природоохоронних заходів.

Ключові слова: поверхневі води, екологічна якість, клас якості води, категорія якості, гідрохімічні показники, р. Молочна

Актуальність. Водотоки Півдня України мають ряд суттєвих екологічних проблем, першопричиною яких стала антропогенна діяльність та природно-кліматичні особливості даного регіону. Річка Молочна класифікується як середня, має протяжність русла 197 км, площу водозбору – 3450 км². Важливим аспектом є те, що річка впадає у Молочний лиман, природоохоронний водний об'єкт, який входить до складу Приазовського національного природного парку, внесеного до Рамсарського переліку водно-болотних угідь. Недоліком багатьох природоохоронних розробок та програм, спрямованих на оздоровлення даної гідрологічної

системи є відсутність комплексності підходу. Також необхідно зазначити, що на діючих гідрологічних постах річки Молочна не проводяться спостереження за гіdroхімічними та гідробіологічними показниками, які необхідні для проведення аналізу якості води річки. Натомість, наявність інформації про якість води надасть змогу ґрунтовно визначитись з напрямками ведення господарської діяльності та режимом користування даного водного об'єкта надасть змогу ефективно відкоригувати запропоновані раніше водо- та природоохоронні заходи.

Аналіз останніх досліджень та публікацій. У 2013 р. місцевими органами самоврядування була підписана «Програма екологічного оздоровлення басейну річки Молочна, відновлення її гідрологічного режиму, благоустрою та збереження біорізноманіття на 2014-2025 роки», основна увага акцентується на захисті територій заплави річки, які зазнають підтоплення; розчистці окремих ділянок русла річки; залісненні прибережних захисних смуг; відведенні територій до об'єктів природно-заповідного фонду та формуванні їх єдиної екологічної мережі [1].

Питання екологічної оцінки якості поверхневих вод річок Північно-Західного Приазов'я за гіdroхімічними та гіdroфізичними показниками у своїй науковій роботі піднімає Х.В. Черченко, який зазначає недостатню вивченості річок даного регіону України у гіdroхімічному та гідрологічному аспектах. Його дослідження показали, що відбулося зменшення рівня природного стоку річок унаслідок антропогенної діяльності; якість води за період 2000-2013 рр. змінювалась від «доброї» до «задовільної»; мав місце високий рівень концентрацій сульфатів, хлоридів та нітритів [2].

Сапун Т. О. у своїй роботі [3] стверджує, що якість поверхневих вод басейну р. Молочна залежить від наявності в них чисельних хімічних інгредієнтів, які можуть знаходитися у розчиненому, колоїдно-дисперсному стані або у вигляді мінеральних та органо-мінеральних зависей. Екологічна якість води авандельти (пологого підводного схилу, який примикає до дельти та продовжує її надводну частину) р. Молочна оцінена III класом «забруднена» і 4-ою категорією «слабко забруднена» ($I_E = 3,96$).

Коробковою Г. В. була проведена оцінка екологічного стану поверхневих вод України. У межах басейнів річок було проведено розподіл за адміністративними одиницями (областями). Для річок Приазов'я (Запорізької області) середні значення індексів, за якими оцінюється якість поверхневих вод дорівнюють: $I_C = 5,3$; $I_{TC} = 3,3$; $I_T = 1,8$; $I_E = 3,5$ (розшифровка індексів наводиться нижче) [4].

Мета дослідження – провести комплексну оцінку якості води р. Молочна за різні проміжки часу з 1990 до 2015 рр., розрахувати уточнену категорію якості води за наявними показниками, виокремити лімітуючі речовини-поллютанти за кожним блоком.

Матеріали і методи дослідження. Методики оцінки забруднення та екологічного стану поверхневих вод вдосконалюються та модернізуються згідно з вимогами ЄС. У 1994 р. затверджена «Екологічна оцінка якості поверхневих вод суші та естуаріїв України. Методика. КНД 211.1.4.010-94». У 1996 р. А. В. Яцик із співавторами розробили методику, що включала дані моніторингових спостережень за гіdroхімічними показниками стану поверхневих вод із відповідною прив'язкою до гіdroграфічного районування

території України [5]. У 1998 р. офіційно на загальнодержавному рівні затверджена «Методика екологічної оцінки якості поверхневих вод за відповідними категоріями» (Романенко В. Д. та ін.) [6]. За спрямування України на європейську інтеграцію у 2012 р. була розроблена проектна методика «Екологічної оцінки якості поверхневих вод за відповідними категоріями» – (далі «Методика...») [7] з урахуванням основних положень діючої в Європі Водної Рамкової Директиви ЄС 2000/60/ЄС [8].

Результати дослідження та їх обговорення. Нововведенням «Методики...» є можливість розрахунку перехідного коефіцієнту між сусідніми категоріями якості води. Уточнене значення категорії якості дозволяє робити оцінку якості більш гнучкою та точнішою, за допомогою подальшого заокруглення отриманого значення до десятих та віднесення показника (блоку показників) до відповідної субкатегорії якості води. Це має важливе значення з водоохоронної точки зору та дає змогу визначити ступінь наближення значення показника до межі наступного (гіршого) класу. Також «плюсом» даної «Методики...» є те, що вперше враховується гідрохімічна область розташування річки [7]. Обрахунки проводяться за формулою:

$$K_y = K + (A_c - K_{min}) / (K_{max} - K_{min}), \quad (1)$$

де K_y – уточнене значення категорії;

K – ціле число категорії якості вод, що відповідає номеру тієї категорії, до якої належить абсолютна величина показника (обирається за середньорічним показником згідно додатків «Методики...»);

A_c – середньорічна величина показника якості вод у пункті контролю;

K_{min} і K_{max} – найменше і найбільше значення діапазону величин категорії якості вод, до якої належить абсолютна величина показника.

Приклади розрахунку для р. Молочна:

Мінералізація 2005 р. $K_y = 5 + \frac{3732 - 3170}{4346 - 3170} = 5 + \frac{562}{1173} = 5,48.$

Мінералізація 2010 р. $K_y = 5 + \frac{3999 - 3208}{4514 - 3208} = 5 + \frac{791}{1306} = 5,61.$

Мінералізація за 2005 та 2010 рр. розрахована об'єктивно і показує, що за 2010 р. усі показники є вищими, тому закономірно що категорія якості води трохи вища. Проте розрахунок за іншими гідрохімічними речовинами показав обернено пропорційну закономірність:

Хлориди 2010 р. $K_y = 4 + \frac{951,9 - 858,8}{1120,9 - 858,8} = 4 + \frac{93,1}{262,1} = 4,36.$

Хлориди 2015 р. $K_y = 4 + \frac{667,4 - 496,3}{865,0 - 496,3} = 4 + \frac{171,1}{368,7} = 4,46.$

Залежність зовсім не справедлива, показники вмісту хлоридів нижчі, але значення категорії вийшло більшим. Така сама ситуація спостерігається і за уточненням категорії якості води для сульфатів:

Сульфати 2010 р. $K_y = 6 + \frac{1643,1 - 1451,9}{1921,6 - 1451,9} = 6 + \frac{191,2}{469,7} = 6,41.$

Сульфати 2015 р. $K_y = 6 + \frac{1641,0 - 1514,9}{1945,7 - 1514,9} = 6 + \frac{126,1}{430,8} = 6,29.$

Нами було встановлено, що дана формула буде показовою лише у разі врахування категорій для усіх значень (середнього, максимального та

мінімального). Якщо за проведення розрахунку фігурує дві або три категорії якості води, то приводимо їх до усередненого значення $(4+4+5)/3$ і у розрахунку буде 4,33; $(2+4+5)/3$ – у розрахунку приймаємо 3,67. Категорії для наочності позначаємо у дужках жирним шрифтом.

Наприклад, для визначення перехідної категорії додаємо значення категорій для максимального, мінімального та середнього значень і знаходимо їх середнє арифметичне значення $K_y = (4+4+5)/3 = 4,33$. Після врахування значень концентрації речовини у річці чітко видно, що категорія якості води 4-та, попередньо визначена за табличними даними, має фактичне значення 4,69, тобто спрямування до погіршення якості води.

$$\text{Хлориди 2010 р. } K_y = 4,33 + \frac{951,9(4) - 858,8(4)}{1120,9(5) - 858,8(4)} = 4,33 + \frac{93,1}{262,1} = 4,33 + 0,36 = 4,69$$

Таким чином, проводимо розрахунок для того ж самого гідрохімічного показника, але вже за інший рік, $K_y = (4+4+3)/3 = 3,67$, з урахуванням фактичних значень концентрацій хлоридів у воді отримуємо значення перехідного показника категорії 4,13.

$$\text{Хлориди 2015 р. } K_y = 3,67 + \frac{667,4(4) - 496,3(3)}{865,0(4) - 496,3(3)} = 3,67 + \frac{171,1}{368,7} = 3,67 + 0,46 = 4,13$$

Шляхом проведення уточнюючих обрахунків визначено, що значення дещо різняться: 4,69 за 2010 р. та 4,13 за 2015 р. У 2010 р. виник істотний ризик переходу якості води до наступної гіршої категорії.

Для мінералізації умова все одно буде виконуватись, зберігається 5-та категорія якості води, але після проведення уточнюючих розрахунків чітко видно, що існує велика вірогідність переходу до 6-тої категорії за погіршення екологічної ситуації у водотоці.

$$\text{Мінералізація 2005р. } K_y = 5,33 + \frac{3732(5) - 3170(5)}{4346(6) - 3170(5)} = 5,33 + \frac{562}{1173} = 5,33 + 0,48 = 5,81$$

$$\text{Мінералізація 2010р. } K_y = 5,33 + \frac{3999(5) - 3208(5)}{4514(6) - 3208(5)} = 5,33 + \frac{791}{1306} = 5,33 + 0,61 = 5,94$$

Необхідно зазначити, що формула є коректною для усіх категорій якості води, де є можливість переходу до іншої категорії (меншої чи більшої), окрім випадків, коли усі значення концентрацій даної речовини у воді відносять якість води до 7-мої категорії. Наприклад, якщо фігурують значення $(7+7+6)/3 = 6,67$ – обрахунок проводиться. Але якщо максимальне, середнє та мінімальне значення вже відносяться до 7-мої категорії якості води у таких випадках розрахунок не проводиться, він буде неінформативним. Екологічна ситуація у водотоці вже досягла критичних позначок та вийшла за рамки допустимого екологічного оптимуму.

Визначення уточненої категорії якості води річки на її фактичний екологічний стан ніяким чином не вплине, це лише теоретичний розрахунок. Але уточнене цифрове значення категорії якості води надає змогу зрозуміти, які процеси відбуваються у гідрологічному об'єкті. Спостерігається наближення перехідного коефіцієнта до межі покращення чи, навпаки, погіршення, що іноді є суттєво важливим за розроблення та впровадження ряду необхідних природоохоронних рішень.

Видно, що певним чином відбулась видозміна основних лімітуючих речовин, які є ключовими за визначення загальної якості поверхневих вод р. Молочна. За попередніми даними основними забруднювачами виступали нітрити, нітрати та фосфати. Тепер же чітко видно, що для нітритів ситуація є не такою критичною, здебільшого значення показників варіюються між 6 та 7 категоріями. Значення K_y позначені ризиком V (7) є критичними та не були розраховані зважаючи на те, що максимальне, середнє та мінімальне значення відповідають 7-мій категорії якості води. За визначення класу та категорії якості води за додатками не було такої чіткої достовірності даних, наприклад, за концентрацією розчиненого кисню за 2005-2015 рр. якість води відповідала I (1) класу та категорії, після розрахунків якість знизилась до II (2) класу та категорії відповідно. Для сульфатів навпаки, за 2000 та 2005 рр. попередньо було визначено V (7), після обрахунку – III (5) та IV (6).

$$I_F = (I_X + I_B)/2. \quad (2)$$
$$I_{\text{Бсеред.}} = (I_{\text{Гсеред.}} + I_{\text{Мсеред.}} + I_{\text{БХсеред.}} + I_{\text{БТсеред.}}) / N, \quad (3)$$

N – загальна кількість блоків біологічних показників, які розглядаються.

[illegible]

Фосфати, мгР/дм ³	<u>V(7)</u>	-	<u>V(7)</u>	-	<u>V(7)</u>	-	<u>V(7)</u>	-	<u>V(7)</u>	-	<u>V(7)</u>	-
<i>I_{БРсеред.}</i>		7,1		6,7		6,8		6,5		6,5		6,2
Розчин. кисень, мгО ₂ /дм ³	III(5)	5,3 5	<u>V(7)</u>	<u>7,3</u> <u>8</u>	II(3)	3,4 5	II(2)	2,5 1	II(2)	2,1 7	II(2)	2,6 7
<i>I_{КРсеред.}</i>		5,4		7,4		3,5		2,5		2,2		2,7
БСК ₅ , мгО ₂ /дм ³	<u>V(7)</u>	-	<u>V(7)</u>	-	<u>V(7)</u>	-	III(5)	5,4 7	III(5)	5,5 2	III(4)	4,7 2
ХСК, мгО ₂ /дм ³	III(5)	5,1 6	<u>V(7)</u>	<u>7,0</u> <u>5</u>	<u>V(7)</u>	-	III(5)	5,0 9	II(3)	3,6 7	II(3)	3,4 5
<i>I_{ОРсеред.}</i>		6,1		7		7		5,3		4,6		4,1
Продовження таблиці												
1	3	4	6	7	9	10	12	13	15	16	18	19
Зав.реч., мг/дм ³	IV(6)	6,27	III(5)	5,1 1	<u>V(7)</u>	<u>7,0</u> <u>1</u>	III(4)	4,3 3	II(3)	3,6 3	III(4)	4,3 8
pH	I	1,6	I	1,0	II(2)	2,9 7	II(3)	3,5 1	II(3)	3,0 4	II(3)	3,0 3
<i>I_{ЗПсеред.}</i>		3,9		3,1		5,0		3,9		3,3		3,7
<i>I_{ТСсеред.}</i>		5,6		6,1		5,6		4,6		4,2		4,2
Залізо, мкг/ дм ³	III(5)	5,2 5	III(5)	5,2 9	III(4)	4,7 4	III(4)	4,0 7	II(3)	3,8 2	II(3)	3,7 9
Наф-ти, мкг/ дм ³	IV(6)	6,8 3	IV(6)	6,0 0	IV(6)	6,3 5	I	1,7	III(4)	4,3	-	-
Феноли, мкг/ дм ³	<u>V(7)</u>	-	-	0	<u>V(7)</u>	-	-	-	-	-	-	-
СПАР, мкг/ дм ³	<u>V(7)</u>	7,1 7	IV(6)	6,9 1	IV(6)	6,2 7	-	-	-	-	-	-
<i>I_{Т серед.}</i>		6,6		6,1		6,1		2,9		4,1		3,8
<i>I_{Х серед.}</i>		5,6		5,5		5,6		4,3		4,6		4,4
<i>I_{Б серед.}</i> (умовне)		5,5		5,5		5,5		5,5		5,5		5,5
<i>I_{Е серед.}</i>		<u>5,6</u>		<u>5,5</u>		<u>5,6</u>		<u>4,9</u>		<u>5,1</u>		<u>5,0</u>
<i>I_{Хнайгір.}</i>		6,6		6,1		6,1		4,9		5,1		5,3
<i>I_{Б найгір.}</i> (умовне)		6,5		6,5		6,5		6,5		6,5		6,5
<i>I_{Е найгір.}</i>		<u>6,5</u> <u>5</u>		<u>6,3</u>		<u>6,3</u>		<u>5,7</u>		<u>5,8</u>		<u>5,9</u>

Середні значення групових індексів розраховуються як середньоарифметичне значення суми категорій показників, що входять до відповідної групи. Наприклад, індекс гідробіологічних показників (*I_{Гсеред.}*) може визначити за формулою:

$$I_{Гсеред.} = (K_{Усеред.} + K_{Фсеред.} + K_{Бсеред.}) / 3, \quad (4)$$

де $K_{Усеред.}$ – категорія за структурними показниками біотичних угруповань;

$K_{Фсеред.}$ – категорія за показниками фітопланктону;

$I_{Бсеред.}$ – категорія за біоіндикаційними оцінками.

Офіційно спостереження за гідробіологічними показниками для річки Молочна не проводяться, тому наразі неможливо включити цей підрозділ для встановлення загального індексу екологічної оцінки якості води даної

річки. Тому використали лише наявні вибіркові показники: індекс сапробності за Понтле-Букком 2,04 – середньорічний показник (згідно додатку «Методики...» відповідає III (4) класу та категорії якості води), 2,70 – максимальний показник; біомаса фітопланктону – 101,5 мг/дм³ (V(7)); індекс самоочищення – самозабруднення (A/R) – 3,7 (V(7))). Можна вважати, що найгірший клас якості води за гідробіологічними показниками становитиме V(7). За відсутністю необхідної бази даних за гідробіологічними показниками для проведення розрахунку екологічного індексу якості води річки Молочна показник I_B приймаємо умовно, посилаючись на середню встановлену категорію IV(6). У табл. 1 вносимо менше та більше значення показника $I_{Бсеред.} = 5,5$ та $I_{Бнайгір.} = 6,5$.

Для забезпечення достовірності результатів оцінки якості води за хімічними трофо-сапробіологічними критеріями загальна кількість показників, за якими виконується оцінка, не повинна бути меншою, ніж 10 [7].

Значення хімічного індексу якості вод ($I_{Хсеред.}$) розраховується як:

$$I_{Хсеред.} = (I_{Ссеред.} + I_{ТСсеред.} + I_{Тсеред.}) / 3, \quad (5)$$

де $I_{Ссеред.}$ – індекс показників сольового складу;

$I_{ТСсеред.}$ – індекс хімічних трофо-сапробіологічних показників;

$I_{Тсеред.}$ – індекс специфічних показників токсичної і радіаційної дії.

Індекс хімічних трофо-сапробіологічних показників розраховується на основі узагальнення значень категорій наступних групових показників :

$$I_{Т-С серед.} = (I_{КРсеред.} + I_{ОРсеред.} + I_{ЗПсеред.} + I_{БРсеред.}) / 4, \quad (6)$$

де $I_{КРсеред.}$ – індекс показників кисневого режиму;

$I_{ОРсеред.}$ – індекс показників вмісту органічних речовин;

$I_{ЗПсеред.}$ – індекс загальних показників (рН, завислі речовини та ін.);

$I_{БРсеред.}$ – індекс показників вмісту сполук біогенних елементів.

Індекс показників вмісту сполук біогенних елементів ($I_{БРсеред.}$) визначається:

$$I_{БРсеред.} = (K_{NH4} + K_{NO2} + K_{NO3} + K_N + 2K_{PO4} + 2K_P) / 8, \quad (7)$$

де K_{NH4} , K_{NO2} , K_{NO3} , K_N , K_{PO4} , K_P – категорії за показниками вмісту, відповідно, амонійного, нітритного, нітратного і загального азоту, фосфору фосфатів і загального фосфору.

Якщо кількість показників, за якими є інформація, менша, у знаменнику ставиться відповідна цифра з урахуванням пропорційного множення категорій по фосфору.

Показник $I_{БРсеред.}$ для р. Молочна з посиланням на наявні дані розраховувався за дещо видозміненою формулою (відсутні дані спостережень за двома показниками: азотом загальним та фосфором загальним).

$$I_{БРсеред.} = (K_{NH4} + K_{NO2} + K_{NO3} + 2K_{PO4}) / 6. \quad (8)$$

Хімічний індекс якості вод $I_{Хнайгір.}$ визначається за найгіршим значенням з трьох блокових індексів I_C , $I_{Т-С}$, I_T :

$$I_{Хнайгір.} = \max(I_C, I_{Т-С}, I_T). \quad (9)$$

Біологічний індекс якості вод $I_{\text{Бнайгір.}}$, як і хімічний індекс $I_{\text{Хнайгір.}}$, визначається за найгіршим значенням серед усіх блокових індексів біологічних показників:

$$I_{\text{Бнайгір.}} = \max(I_{\text{Г}}, I_{\text{М}}, I_{\text{БХ}}, I_{\text{БТ}}). \quad (10)$$

Проведені нами обрахунки визначили: $I_{\text{С}} = 5,3$; $I_{\text{ТС}} = 4,2$; $I_{\text{Т}} = 3,8$; $I_{\text{Х}} = 4,4$; $I_{\text{Е}} = 5,0$. Екологічний індекс якості вод, як і блокові індекси, обчислюється для середніх і для найгірших значень категорій окремо: $I_{\text{Е серед.}}$ та $I_{\text{Е найгір.}}$. Показник $I_{\text{Е серед.}}$ за період 1990-2015 рр. коливається у межах 4,9-5,6, $I_{\text{Е найгір.}} = 5,7-6,55$. Обидва показники мають динаміку до незначного покращення екологічної якості води з 2000 р.

Одним із способів подання результатів оцінювання екологічного стану поверхневих вод, згідно Водної Рамкової Директиви ЄС 2000/60/ЄС, може бути індекс екологічної якості (EQI). Цей індекс визначається шляхом порівняння значень показників, отриманих у конкретному створі зі значеннями показників у референційних (еталонних) умовах.

Для приведення індексу екологічної оцінки якості вод ($I_{\text{Е}}$) до діапазону від 1 до 0, який прийнято для EQI, можна використати відношення:

$$I_{\text{Епр}} = 1 - (I_{\text{Е}} / 7) \quad (11)$$

2. Градації індексу EQI відповідно до класів якості вод згідно «Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive (2000/60/EC), Guidance document № 10» [8]:

Клас якості вод	I	II	III	IV	V
	Відмінна (high)	Добра (good)	Посередня (moderate)	Низька (poor)	Погана (bad)
Значення EQI	1-0,83	0,82-0,62	0,61-0,41	0,40-0,20	<0,20

Встановлено, що для р. Молочна $I_{\text{Е}} = 5,0$ за 2015 р., у попередні роки значення $I_{\text{Е}}$ було трохи більшим. Відповідно $I_{\text{Епр}} = 1 - (5 / 7) = 0,29$. Відповідно до градації EQI це «низька» якість води. Якщо не брати до уваги гідробіологічні показники і розрахувати $I_{\text{Епр}}$ опираючись лише на масштабний масив даних гідрохімічних показників ($I_{\text{Х}} = 4,4$) $I_{\text{Епр}} = 1 - (4,4 / 7) = 0,37$, усе одно показник EQI попадатиме у ті ж самі межі екологічного нормування якості води.

Висновки і перспективи.

1. Внесено корегування до основної формули обрахунку уточненої категорії якості води річок, яке може використовуватись для оцінки якості поверхневих вод будь-якого водотоку України.

2. Завдяки нововведенню «Методики...», а саме врахуванню регіональних особливостей водних об'єктів було встановлено, що основні речовини-поллютанти р. Молочна відносяться до трофо-сапробіологічного блоку.

3. Основними забруднюючими речовинами р. Молочна за 2015 р. є нітрати та фосфати (встановлено найгірший клас якості води VII(7)). За концентраціями нітритів та сульфатів вода відноситься до IV(6). Простежується зміна категорій якості води з часом, у період 1990-2000 рр. до 7-мої категорії відносилась річка за показниками: азотом амонійним,

фенолами, БСК₅, СПАР, завислими речовинами. З 2000 р. відбулось зниження концентрації даних речовин у воді.

4. Комплексний показник екологічної якості води р. Молочна $I_{\text{Есеред}}$ за період 1990-2015 рр. коливається у межах 4,9-5,6, $I_{\text{Енайгір.}} = 5,7-6,55$. Встановлена загальна динаміка до незначного покращення екологічної якості води з 2000 р. За даними 2015 р. якість води за рівнем забрудненості відноситься до III (5) класу та категорії, характеризується як «помірно забруднена», за ступенем сапробності - « α '-мезосапробна», трофності – «ев-політрофна».

5. Якість поверхневих вод р. Молочна згідно індексу EQI (відповідно до класів якості вод згідно вимог ВРД (2000/60/ЕС)) класифікується як «низька», що неодмінно необхідно брати до уваги при плануванні господарського використання водотоку.

References

1. «Prohrama ekolohichnoho ozdorovlennia baseinu richky Molochna, vidnovlennia yii hidrolohichnoho rezhymu, blahoustroiu ta zberezhenia bioriznomanittia na 2014-2025 roky» zatverdzhena rishenniam Zaporizkoi oblasnoi rady №14 vid 26.12.2013r. Available at: <http://www.zovh.gov.ua/proovr/normdocs/zorada.shtml>
2. Cherchenko Kh.V. (2017) Ekolohichna otsinka yakosti poverkhnevykh vod richok Pivnichno-Zakhidnoho Pryazov'ya za hidrokhimichnymy ta hidrofizychnymy kharakterystykamy. Visnyk Zaporiz'koho natsional'noho universytetu: zbirnyk naukovykh prats'. Biolohichni nauky. 1. Zaporizhzhya, 170-179
3. Sapun T.O. (2016). Ekolohichna otsinka yakosti poverkhnevykh vod baseinu r.Molochna yak rezultat sukupnoi dii antropohennykh chynnykiv [Humanitarnyi prostir nauky: dosvid ta perspektyvy]. Zb. Materialiv Mizhnarod. nauk. prakt. internet-konf., 7. Pereiaslav- Khmelnytskyi, 19-28.
4. Korobkova H.V. (2015) Metody ekolohichnoho normuvannia u administratyvno-baseinovomu upravlinnia vodookhoronnoiu diialnistiu [Ekolohichna bezpeka: problemy i shliakhy vyrishennia]. Zb. nauk. st. Khl Mizhnar. nauk.-prakt. konf., Kharkiv, UkrNDIEP, 131-134.
5. Yatsyk A.V., Denysova O.I., Cherniavska A.P., Vernychenko H.A. (1996) Metodyka ekolohichnoi otsinky yakosti poverkhnevykh vod Ukrainy. Kyiv. 20.
6. Romanenko V.D., Zhukynskiy V.M., Oksiiuk O.P. (1988) Metodyka ekolohichnoi otsinky yakosti poverkhnevykh vod za vidpovidnymy katehoriiamy. Kyiv: SYMVOL-T, 28.
7. Hrytsenko A.V., Vasenko O.H., Vernichenko H.A. (2012) Normatyvnyi dokument UDK 556.531:049.3 [Metodyka ekolohichnoi otsinky yakosti poverkhnevykh vod za vidpovidnymy katehoriiamy]. Kharkiv, UkrNDIEP, 37.
8. YeS, V. R. D. (2006). 60/leC: Osnovni terminy ta yikh vyznachennia (ofitsiyni pereklad). K.: Konsortsium kompanii RODECOVERSeau–WRc. Kyiv, 240 .

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ВОДЫ Р. МОЛОЧНАЯ

В. П. Скиба, Н. М. Вознюк

Аннотация. На основании обобщённых и систематизированных данных многолетних наблюдений за гидрохимическими показателями выполнена экологическая оценка качества воды р. Молочная. Расчёты проведены согласно проектной методики «Экологическая оценка качества

поверхностных вод по соответствующим категориям», которая является наиболее современной разработкой и учитывает основные положения действующей в Европе Водной Рамочной Директивы ЕС 2000/60/ЕС. На основании полученных результатов предложены корректировки к уточнению категории качества поверхностных вод.

Полученные результаты позволили проанализировать процессы, проходящие в гидрологическом объекте, а именно: установить приближение переходного коэффициента к границе улучшения или же наоборот, ухудшения экологической ситуации. Также, исходя из полученных значений, проанализирована динамика изменения качества воды исследуемого водотока за период 1990-2015 г.г. и определены основные вещества-поллютанты, которые являются приоритетными для данной реки. Впервые проведена комплексная оценка качества воды реки Молочная по широкому спектру гидрохимических и некоторых гидробиологических показателей, определен класс и категория качества воды, общий уровень загрязнения, трофности и сапробности. Выводы работы могут стать опорными при определении режима использования реки и внедрении природоохранных мероприятий.

Ключевые слова: гидрохимические показатели, экологическое качество, категория качества, класс качества, поверхностные воды, р. Молочная

ECOLOGICAL EVALUATION OF THE MOLOCHNAYA RIVER WATER QUALITY

V. P Skiba, N. M. Voznyuk

Annotation. Based on the generalized and systematized data of long-term observations of hydrochemical indicators, the ecological evaluation of the Molochnaya River water quality was performed. The calculations were carried out according to the project methodology "Ecological evaluation of surface water quality according to the relevant categories", which is the most up-to-date development and takes into account the main regulations of the EU Water Framework Directive 2000/60 / EC in force in Europe. Based on the results obtained, the corrections are proposed for clarifying the category of surface water quality. The obtained results allowed analyzing the processes taking place in the hydrological object, namely: establishing the approach of the transition coefficient to the border of improvement or, on the contrary, the deterioration of the ecological situation. Also, based on the obtained values, the dynamics of the water quality alteration of the watercourse under study for the period of 1990-2015 was analyzed; and the main pollutants, which are the priority for this river, were identified. For the first time, a total evaluation of the Molochnaya River water quality was carried out for a wide range of hydrochemical and some hydrobiological indicators; class and category of water quality, general level of pollution, trophicity and saprobity were defined. The conclusions of the research work can become supporting ones in determining the usage mode of the river and the introduction of environmental measures.

Keywords: hydrochemical indicators, ecological quality, quality category, quality class, surface waters, the Molochnaya River

ЗМІНИ МАСОМЕТРИЧНИХ ПОКАЗНИКІВ ВНУТРІШНІХ ОРГАНІВ ЩУРІВ ЗА ВЖИВАННЯ НАТИВНОЇ ТА ГЕНЕТИЧНО МОДИФІКОВАНОЇ СОЇ У СКЛАДІ КОРМІВ

Н. М. ОМЕЛЬЧЕНКО, здобувач, старший викладач кафедри біотехнології та екології

Національний технічний університет «Харківський політехнічний інститут», Чернівецький факультет

Г. В. ДРОНИК, доктор біологічних наук, професор, академік НААН
Буковинська державна сільськогосподарська дослідна станція НААН

В. А. КУЧЕРЯВА, старший викладач кафедри біотехнології та екології
Національний технічний університет «Харківський політехнічний інститут», Чернівецький факультет

E-mail: bioprofy@gmail.com

Анотація. Використання результатів генетичної інженерії за виробництва сільськогосподарської сировини продовжує викликати серйозні суперечки серед дослідників. Неконтрольоване поширення на території України раундап стійкої сої (30-90 % площ посівів) може бути причиною потрапляння її у харчовий раціон споживачів.

Експеримент проводили у віварії кафедри "Промислова біотехнологія" Чернівецького факультету НТУ "ХПІ". Використано три групи щурів лінії Вістар обох статей. Контрольні тварини одержували стандартний віварійний корм. Дві дослідні групи отримували стандартний раціон із заміною 35 % його за протеїном на боби нативної та трансгенної сої відповідно. Дослідження проведені на трьох поколіннях щурів. Через 6 місяців споживання експериментального раціону проводили розтин тварин, відбирали та зважували внутрішні органи. Розраховували індекси маси серця, легенів, нирок, селезінки, печінки.

Встановлено, що вираженого впливу генетично модифікованої сої у раціоні харчування на індекси маси серця та легенів щурів обох статей трьох досліджуваних поколінь не спостерігається. За споживання трансгенної сої у тварин батьківського покоління відмічено збільшення маси печінки в порівнянні з контрольною групою: у самок – на 23,5 %, у самців – на 15,7 %.

Ключові слова: трансгенна соя, щури, вплив, індекс маси органу

Актуальність проблеми. У світі спостерігається незворотний процес використання генетично модифікованих рослин в аграрному секторі, що обумовлено зростанням виробництва продовольства у зв'язку зі збільшенням чисельності населення, а також підвищенням попиту на продовольчі культури як сировину для виробництва біопалива [1].

Використання результатів генетичної інженерії за виробництва сільськогосподарської сировини продовжує викликати серйозні суперечки

серед дослідників та широких верств споживачів. Аргументи на користь розробки й застосування трансгенних рослин – підвищена врожайність, стійкість до хвороб і шкідників, екологічні переваги. З іншого боку – відсутність впевненості у безпечності отриманих продуктів харчування та неоднозначність їх впливу на здоров'я людини [2]. Тому особлива увага вчених прикута сьогодні до досліджень у сфері генної інженерії та використання генетично модифікованих організмів для виготовлення харчових продуктів.

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Біотехнологічні культури вирощуються у світі більше ніж 20 років. За даними International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications [3] спостерігається розширення площ під вирощування генно-модифікованих рослин. Світові площі, на яких поширені ці рослини, зросли у 2016 році до 185,1 млн. га, що на 3 % більше за дані попереднього року.

Світова наука одержала понад 120 видів біотехнологічних рослин, але найбільш поширеною із них є соя. Загальна площа її посівів постійно зростає, за даними [3] у 2016 році вона складала 33,87 млн. га. Близько 94 % – це трансгенні рослини з гербіцидною стійкістю Roundup Ready. Значну частину вирощеної у світі генетично модифікованої сої використовують для виробництва палива – біодизелю. Однак, корисні властивості сої сприяють використанню її й у харчовій та сільськогосподарській промисловості. Боби сої можуть накопичувати 38-42 % білка, що містить вісім незамінних амінокислот, 16-27 % жирів, цілий спектр макро- та мікроелементів, вітаміни [4]. З насіння сої виготовляють олію, соєве борошно, соєве молоко, сири, додають продукти її переробки як наповнювачі у ковбасні вироби, шоколад, цукерки, хліб та хлібобулочні вироби тощо. Неконтрольоване поширення на території України раундапостійкої сої (30-90 % посівів цієї культури) може бути причиною потрапляння її у харчовий раціон споживачів [5].

Значне розповсюдження і широке використання у харчуванні людей і годівлі тварин продукції, виготовленої із використанням генетично модифікованої сої, може стати причиною виникнення патологічних змін в їх організмах. Тестування безпечності генетично-модифікованих організмів, які існують нині – недосконале. Вчені стверджують, що вплив модифікованих продуктів на організм людини неможливо повністю передбачити чи перевірити, адже зміни, які можуть виникнути в організмі живої істоти, яка споживає продукти зі вмістом ГМО, одразу себе не проявляють – потрібно, щоб пройшло не одне покоління, аж поки можна буде прослідкувати процеси модифікації в генотипі [6].

У зв'язку з цим, створення чіткого уявлення про віддалені наслідки впливу на живі організми генно-модифікованих рослин і харчових продуктів зі вмістом ГМО необхідні тривалі багатосторонні дослідження.

Мета дослідження – вивчення впливу нативної та генетично модифікованої сої на масометричні показники внутрішніх органів досліджуваних лабораторних тварин.

Матеріали і методи дослідження. У експерименті, який проводився у віварії кафедри Промислової біотехнології Чернівецького факультету НТУ "ХПІ", використано три групи щурів лінії Вістар обох статей: контрольна група – інтактні тварини, група «Дослідна 1» – тварини, які отримували

стандартний раціон із заміною 35% його за протеїном на боби нативної сої, група «Дослідна 2» – тварини, які отримували стандартний раціон із заміною аналогічної частини його на боби генетично модифікованої сої (*Roundup*[®] лінії GTS 40-3-2, який містить трансгени *cp4epsps* та регуляторні елементи – промотор 35S і термінатор NOS). Перед згодовуванням для знешкодження антипоживних речовин та зниження уреазної активності боби сої піддавали термічній обробці [7]. Контрольні тварини одержували стандартний віварійний корм із дотриманням встановленого режиму харчування. Тварини усіх груп мали доступ до води без обмежень протягом усього періоду досліджень.

Групи тварин сформовані зі щурів 3-4 місячного віку, беручи до уваги критерій маси тіла (маса тварин не відрізнялася більше ніж на 20 % від середньої маси тварин однієї статі).

Контрольні та дослідні тварини знаходились в ідентичних умовах, забір та обробку матеріалу здійснювали паралельно [8]. Експерименти на тваринах були проведені з дотриманням вимог Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження», «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», схвалених Національним конгресом з біоетики й узгоджених з положеннями «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях».

Щурі батьківського покоління споживали експериментальний раціон протягом 6 місяців і виводились із експерименту у віці 9 місяців декапітуванням з використанням легкого хлороформного наркозу. У нащадків першого та другого поколінь періоди внутрішньоутробного розвитку і материнського вигодовування протікали на фоні споживання самками експериментального раціону, в подальшому протягом 6 місяців тварини самостійно споживали дослідний раціон. Проводили патологоанатомічний розтин, відбирали і зважували органи. У тварин контрольної та дослідних груп розраховували індекси маси серця, легенів, нирок, селезінки, печінки (відношення маси органа, вираженої у грамах, до 100 г маси тіла тварини).

Дані досліджень статистично оброблялися з визначенням середніх арифметичних величин (M), середньої квадратичної похибки (m) і ступеня вірогідності різниці (P) між показниками.

Результати досліджень та їх обговорення. Порівняння індексів маси серця та легенів щурів обох статей батьківського, першого та другого поколінь показало, що показники між собою вірогідно не відрізняються (таблиці 1-3). Це вказує на відсутність вираженого впливу згодовування бобів нативної та генетично модифікованої сої у складі раціону на розвиток даних органів.

1. Індекс маси внутрішніх органів щурів батьківського покоління (F0) за згодовування нативної та трансгенної сої ($M \pm m$, $n = 6$)

Вид корму	Стать	Індекс маси органів, г/100 г маси тіла			
		серце	легені	нирки	селезінка
Контроль	♀	0,41 ± 0,07	0,84 ± 0,08	0,91 ± 0,18	0,52 ± 0,06

Дослідна 1	♀	0,43 ± 0,08	0,81 ± 0,12	0,90 ± 0,15	0,53 ± 0,09
Дослідна 2	♀	0,42 ± 0,05	0,82 ± 0,08	0,92 ± 0,12	0,47 ± 0,09
Контроль	♂	0,36 ± 0,04	0,80 ± 0,13	0,86 ± 0,11	0,39 ± 0,06
Дослідна 1	♂	0,39 ± 0,07	0,78 ± 0,14	0,88 ± 0,12	0,44 ± 0,08
Дослідна 2	♂	0,38 ± 0,03	0,76 ± 0,06	0,90 ± 0,06	0,43 ± 0,04

2. Індекс маси внутрішніх органів щурів (F1) за згодовування нативної та трансгенної сої ($M \pm m$, $n = 6$)

Вид корму	Стать	Індекс маси органів, г/100 г маси тіла			
		серце	легені	нирки	селезінка
Контроль	♀	0,43 ± 0,03	0,85 ± 0,05	0,91 ± 0,15	0,50 ± 0,07
Дослідна 1	♀	0,42 ± 0,06	0,81 ± 0,08	0,88 ± 0,06	0,46 ± 0,07
Дослідна 2	♀	0,43 ± 0,04	0,83 ± 0,13	0,90 ± 0,13	0,45 ± 0,08
Контроль	♂	0,42 ± 0,07	0,77 ± 0,12	0,87 ± 0,11	0,40 ± 0,08
Дослідна 1	♂	0,42 ± 0,04	0,75 ± 0,08	0,88 ± 0,05	0,45 ± 0,07
Дослідна 2	♂	0,41 ± 0,04	0,75 ± 0,07	0,86 ± 0,08	0,45 ± 0,06

Нирки – орган, який забезпечує підтримання водно-електролітного балансу організму, кислотно-лужного і осмотичного гомеостазу. Вони здатні в широких межах і з високою вибірковістю змінювати інтенсивність екскреції води та іонів, забезпечувати сталість складу рідин внутрішнього середовища.

3. Індекс маси внутрішніх органів щурів (F2) за згодовування нативної та трансгенної сої ($M \pm m$, $n = 6$)

Вид корму	Стать	Індекс маси органів, г/100 г маси тіла			
		серце	легені	нирки	селезінка
Контроль	♀	0,43 ± 0,05	0,85 ± 0,16	0,93 ± 0,11	0,52 ± 0,07
Дослідна 1	♀	0,45 ± 0,03	0,82 ± 0,06	0,96 ± 0,03	0,53 ± 0,09
Дослідна 2	♀	0,44 ± 0,04	0,85 ± 0,07	0,99 ± 0,10	0,57 ± 0,06
Контроль	♂	0,39 ± 0,06	0,79 ± 0,13	0,87 ± 0,05	0,39 ± 0,06
Дослідна 1	♂	0,40 ± 0,03	0,75 ± 0,06	0,84 ± 0,06	0,45 ± 0,06
Дослідна 2	♂	0,41 ± 0,04	0,75 ± 0,09	0,85 ± 0,09	0,44 ± 0,08

Індекс маси нирок у самок та самців щурів трьох поколінь за споживання немодифікованої сої протягом експерименту суттєво не відрізнявся від такого в групі інтактних тварин, а за споживання бобів ГМ-сої спостерігається тенденція до незначного збільшення даного показника у самців батьківського покоління, а у самок другого покоління – збільшення на 6,5 %. За зовнішнього огляду тканина нирок тварин групи «Дослідна 2» повнокровніша і темніша, ніж у тварин контрольної групи.

Селезінка оперативно реагує на кожну ситуацію, за якої шкідливі речовини можуть потрапити до організму. У досліджуваних самок щурів групи «Дослідна 2» батьківського і першого поколінь спостерігається

тенденція до зменшення індексу маси селезінки. Це можна пояснити тривалим надходженням з кормами токсинів у малих дозах.

Незначне збільшення селезінки спостерігається у самок щурів другого покоління та самців першого і другого поколінь. Можна припустити, що відбувається порушення функції органу, що полягає в очищенні кров'яних потоків і знищенні патологічних процесів.

Печінка відіграє провідну роль у метаболізмі та біотрансформації переважної більшості речовин, які потрапляють до організму зовні. Дослідження індексу маси печінки (ІМП) самок виявило, що у тварин груп «Дослідна 1» та «Дослідна 2» спостерігається збільшення даного показника в порівнянні з контрольною групою у щурів батьківського покоління на 23,5 % (рис. 1). У тварин наступних двох поколінь зберігається ще тенденція до зростання даного показника, але вже не така чітко виражена.

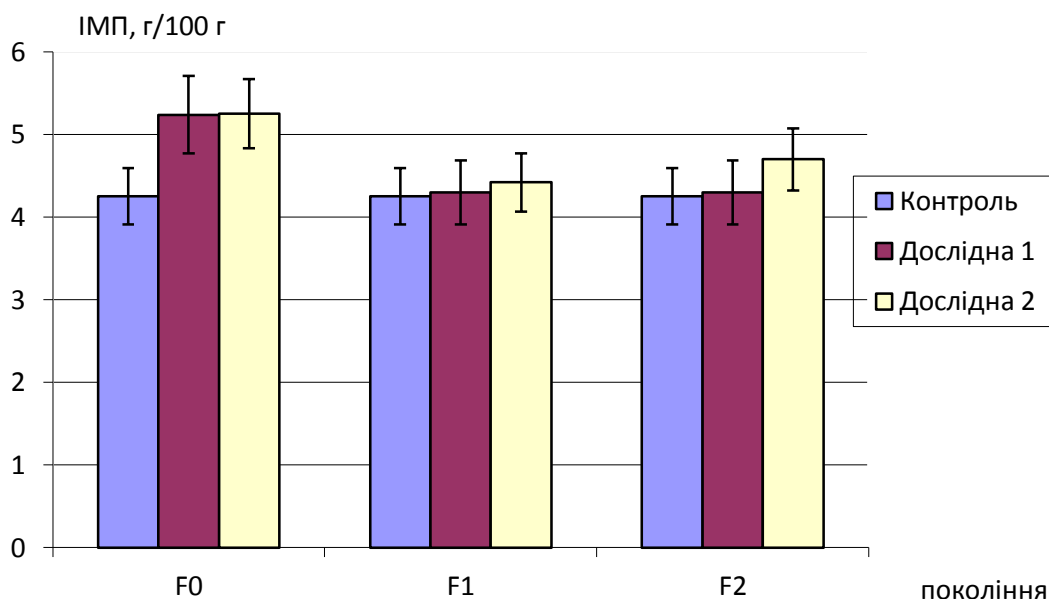


Рис.1. Зміна індексів маси печінки (ІМП) самок щурів трьох поколінь за згодовування нативної та трансгенної сої

Дослідження індексу маси печінки самців показало, що у тварин групи «Дослідна 2» спостерігається збільшення даного показника в порівнянні з контрольною групою у батьківського покоління на 15,7 %. У тварин першого та другого поколінь тенденція збільшення ІМП залишається, але є менш вираженою (рис. 2). Вірогідного відхилення даного показника у нащадків від величини ІМП у контрольній групі не спостерігається.

Причини збільшеної печінки і селезінки обумовлені інтенсивністю обмінних процесів. Розширення їх розмірів відбувається за рахунок збільшення кількості захоплюваних клітин крові, а це тягне за собою меншу здатність до фільтраційної здатності клітин, через що орган зростає в об'ємі.

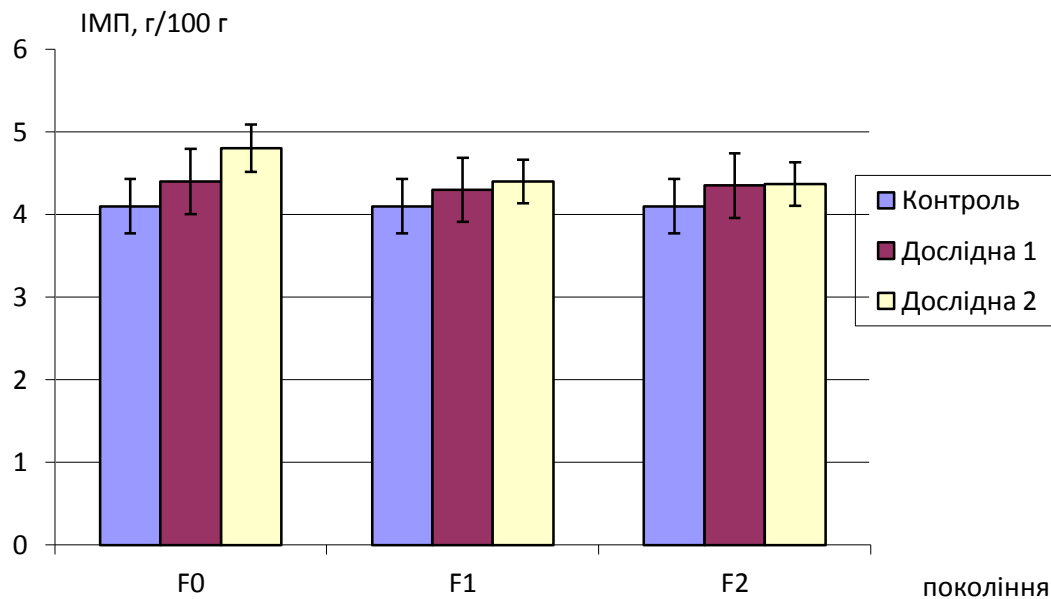


Рис. 2. Зміна індексів маси печінки (ІМП) самців щурів трьох поколінь за згодовування нативної та трансгенної сої

Оскільки печінка відіграє в організмі ще і роль детоксикаційного центру, то можна припустити активацію відповіді організму щурів на вплив певних складників раціону. У деяких випадках печінкові клітини збільшуються в розмірах тільки лише для того, щоб утилізувати надлишок шкідливих токсичних сполук, тобто печінка виконує компенсаторну функцію.

Висновки та пропозиції. Вираженого впливу генетично модифікованої сої у раціоні харчування на індекси маси серця та легенів щурів обох статей трьох досліджуваних поколінь не спостерігається. За споживання трансгенної сої у тварин батьківського покоління відмічено збільшення маси печінки в порівнянні з контрольною групою у самок на 23,5 %, у самців – на 15,7 %.

Перспективи подальших досліджень. Детальніше вплив бобів нативної та генетично модифікованої сої на організм щурів за умов тривалого вживання буде з'ясований під час дослідження наступних поколінь лабораторних тварин.

References

1. Batashova, M. Ye. (2014). Biotechnologichni kultury v suchasnomu ahrarnomu sektori [Biotechnological crops in modern agrarian sector]. Bulletin of poltava state agrarian academy, 4, 35–43.
2. Smoliar, V. I., Petrashenko, H. I. (2009). Henetychno modyfikovani orhanizmy i kharchuvannia naselennia [Genetic modifycate organisms and public nutrition]. Nutrition Problems, 1-2 (20), 35–39.
3. ISAAA Brief 52-2016. Global Status of Commercialized Biotech. GM Crops: 2016. <https://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/52/download/isaaa-brief-52-2016.pdf> (Accessed Apr. 02, 2018).
4. Chymonyna, Y. V., Cybul'skaja, A. A. (2014). Analiz vozdejstvija soi i soevyh produktov na organizm cheloveka [Analysis of the effects of soy and soy products on the human body]. Kant, 2 (11), 92–96.

5. Chekhov, A. S. (2016). Analiz propozyitsii na vitchyznianskomu rynku nasinnia soi [Demand and supply on the Ukrainian soybean market]. Economy Field, 106, 127-134.
6. Varavva, H. (2006). Modyfikovani produkty – poriatunok vid holodu chy svidome vbyvstvo? [Modified foods – salvation from hunger or conscious killing?]. Epoch Times. <http://www.epochtimes.com.ua/health/health/modyfikovani-produkty-porjatunok-vid-golodu-chy-svidome-vbyvstvo-59498.html> (Accessed: 02.04.2018)
7. Omelchenko, N. M., & Dronyk, H. V. (2017). Vplyv tradytsiinoi ta henetychno modyfikovanoi soi na postnatalnyi rozvytok shchuriv [Influence traditional and genetically modified soybeans on postnatal development of rats]. Scientific-technical bulletin SCIVP of veterinary medical products and feed additives. Lviv, 18 (2), 159–164.
8. Zapadnyuk, I. P. et al. (1983). Laboratornye zhivotnye. Razvedenie, soderzhanie, ispol'zovanie v jeksperimente [Experimental animals: Breeding, raising and experimental usage]. Kiev: HighSchool, 243-271.

ИЗМЕНЕНИЯ МАССОМЕТРИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ КРЫС ПРИ УПОТРЕБЛЕНИИ НАТИВНОЙ И ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННОЙ СОИ В СОСТАВЕ КОРМОВ

Н. Н. Омельченко, Г. В. Дроник, В. А. Кучерявая

Аннотация. *Использование результатов генетической инженерии при производстве сельскохозяйственного сырья продолжает вызывать серьезные споры среди исследователей. Неконтролируемое распространение на территории Украины раундапоустойчивой сои (30-90 % площадей посевов) может быть причиной попадания ее в пищевой рацион потребителей.*

Эксперимент проводили в виварии кафедры "Промышленная биотехнология" Черновицкого факультета НТУ "ХПИ". Использованы три группы крыс линии Вистар обоего пола. Контрольные животные получали стандартный виварийный корм. Две экспериментальные группы получали стандартный рацион с заменой 35 % его по протеинам на бобы нативной и трангенной сои соответственно. Исследования проведены на трех поколениях крыс. Через 6 месяцев потребления экспериментального рациона проводили вскрытие животных, отбирали и взвешивали внутренние органы. Рассчитывали индексы массы сердца, легких, почек, селезенки, печени.

Установлено, что выраженного влияния генетически модифицированной сои в рационе питания на индексы массы сердца и легких крыс обоего пола трех исследуемых поколений не наблюдается. При потреблении трансгенной сои у животных родительского поколения отмечено увеличение массы печени по сравнению с контрольной группой: у самок – на 23,5 %, у самцов – на 15,7 %.

Ключевые слова: *трангенная соя, крысы, влияние, индекс массы органа*

CHANGES OF MASOMETRIC INDEXES OF INTERNAL ORGANS RATS IN THE EXERCISED OF NATIVE AND GENETICALLY MODIFIED SOYBEAN IN THE COMPOSITION OF FEED

N. Omelchenko, H. Dronyk, V. Kucheriava

Abstract. *The use of genetic engineering results in the cultivation of agricultural raw materials continues to cause serious controversy among researchers. Uncontrolled spread in Ukraine Roundup resistant soybeans (30-90% of sowing areas) can cause getting it in the diet of consumers.*

The experiment was conducted in vivarium of the Department "Industrial Biotechnology" of the Chernivtsi Faculty of NTU "KhPI". Three groups of rats of the Vistar line of both sexes were used. Control animals received standard vivarium feed. Two experimental groups received a standard diet with a replacement of 35% of its protein per native and transgenic soybean, respectively. Studies have been conducted on three generations of rats. After 6 months, the experimental diet was consumed by animals, internal organs were taken and weighed. Calculated the indexes of the mass of the heart, lungs, kidneys, spleen, liver.

Established that there is no pronounced effect of genetically modified soy in the diet for mass index of heart and lung of both sexes of rats three generations observed. The consumption of transgenic soybeans in animal parental generation is marked increase in liver weight with the control group: females – 23,5 %, males – 15,7 %.

Keywords: *transgenic soybean, rats, influence, body mass index*

**МЕТОД АНАЛІЗУ І ДІАГНОСТИКИ СИТУАЦІЇ (CASE STUDY)
В ПРОФЕСІЙНІЙ ПІДГОТОВЦІ СТУДЕНТІВ
ПРИРОДНИЧОГО СПРЯМУВАННЯ**

С. М. СМІРНОВА, кандидат геологічних наук,
доцент (бвз) кафедри управління земельними ресурсами
Чорноморський національний університет імені Петра Могили
E-mail: smsvetyk78@gmail.com

Т. А. ВАСИЛЬЄВА, кандидат сільськогосподарських наук,
доцент кафедри біології і хімії
**Миколаївський національний університет
імені В.О. Сухомлинського**
E-mail: hurtlocker1@gmail.com

В. М. СМІРНОВ, кандидат геологічних наук,
доцент (бвз) кафедри екології
Чорноморський національний університет імені Петра Могили
E-mail: vsmirnov79@gmail.com

Анотація. Зосереджено увагу на застосуванні методу аналізу і діагностики ситуації (кейс-метод) в професійній підготовці студентів природничого спрямування. Метод спрямований на формування комунікативної компетенцій нетрадиційного аналітичного мислення та предметної компетенції еколого-біологічного спрямування майбутніх фахівців. В основу методу покладено ситуаційний принцип, або випадок (case), що слугує вагомим критерієм прийняття рішення у еколого-біологічних завданнях. В прикладному аспекті проаналізовано евтрофікацію водойм з поетапною реалізацією кейсу за групами: екскурс у проблемну ситуацію, розподіл завдань (проблемних питань) в групах, організація спільної діяльності студентів, аналіз і рефлексія, узагальнення результатів зробленої роботи та їх презентація, формування висновків. Реалізація на практиці цього методу надає можливість використати гнучкість у прийнятті спільних рішень з постійною спрямованістю на колективну критику та здатність переосмислювати свій професійний і особистісний досвід.

Ключові слова: кейс-метод, евтрофікація водойм, еколого-біологічні завдання, природниче спрямування

Актуальність. Спрямування вищої освіти в Україні до консолідації в європейський освітній простір має гармонійно поєднувати національні та міжнародні стандарти в контексті Болонського процесу. Володіння інноваційними методиками викладання є базовим завданням професійної підготовки в сучасному ВУЗі та спрямоване на володіння комунікативними компетенціями, що здатні забезпечити професійну підготовку та задовольнити професійні потреби та подальший саморозвиток. Саме тому напрацювання новітніх методичних підходів при організації викладання

природничих дисциплін (екології, моніторингу природного середовища тощо) студентам-біологам (екологам) заслуговує на увагу.

На сучасному етапі реформування вищої освіти відповідно до Закону України «Про вищу освіту» перевага надається формуванню в майбутніх фахівців компетенцій нетрадиційного аналітичного мислення, творчого підходу у розв'язуванні прикладних завдань, саморозвитку та самоосвіти. З метою підготовки фахівця, здатного до пошуку шляхів вирішення проблеми у професійній діяльності, нами запропоновано використовувати в освітньому процесі викладання природничих дисциплін уніфікований інтерактивний *метод аналізу і діагностики ситуації* (або кейс-метод, метод конкретних ситуацій).

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Метод аналізу і діагностики ситуації застосовують вже понад сто років в навчальних закладах країн Західної Європи, проте в Україні він відомий лише останні кілька десятиліть. Саме навчання студента-біолога (еколога) за кейс-методом з метою дослідження конкретної ситуації, формує новітню *компетенцію, яка реалізується у нетрадиційному аналітичному мисленні*, а саме [1]: проаналізувати історичний, хронологічний аспект ситуації; здатність виділити ключові аспекти проблемної ситуації; простежити причинно-наслідкові зв'язки; аналіз проблемно-пов'язаних питань, додаткової інформації; спрогнозувати тенденції розвитку подій.

В залежності від цілей навчання ситуаційні моделі різняться за змістом та структурою поданого матеріалу [2,3]: кейси, що навчають аналізу та оцінці ситуації; кейси, що зорієнтовані на прийняття рішень; кейси, здатні проілюструвати проблему, рішення або концепцію в цілому тощо.

Окремо слід наголосити на функціональній спрямованості кейсів, яка полягає у наступних конкретизації означених завдань [4,5]: практична - формування досвіду та навиків під час вирішення прикладних задач; гностична - розвиток неформального мислення, пошук творчих ідей; соціально-психологічна - формування комунікативних навиків спілкування; індивідуальна - розвиток інтелектуальних, емоційно-вольових, пізнавальних умінь; виховна - розподіл єдиного процесу співпраці, виникнення міжособистісних відносин.

Цінність цього методу полягає в уніфікованому поєднанні сукупності методів, які спрямовані на інтенсивний розвиток сприйняття інформації, результативну роботу пам'яті, розвиток стійкості уваги, здатність аналізувати ситуацію та пропонувати власні варіанти її вирішення, вироблення спільної стратегії взаємодії в групі тощо. Під час опрацювання прикладної життєвої ситуації реалізуються наступні методи [6,7]: моделювання (побудова моделі ситуації); метод класифікацій (створення впорядкованості подій під час дослідження певного процесу); аудіовізуальний (використання зорово-слухової наочності — діафільмів, кінофільмів, ютуб-роликів тощо); проблемний метод (уявлення проблеми, що лежить в основі ситуації); системний аналіз (системний виклад ситуації); «мозкова атака» (генерування ідей відносно ситуації); дискусія (обмін поглядами з приводу проблеми та шляхи її вирішення); узагальнення (обґрунтування етапів розвитку процесу, обговорення пошуково-концептуальних напрямків вирішення проблеми).

Мета дослідження: адаптувати сучасні методи викладання екології до інтерактивної методики аналізу і діагностики ситуації для студентів природничих факультетів. Задля досягнення мети необхідна реалізація наступних завдань:

формування комунікативної компетенцій нетрадиційного аналітичного мислення та предметної компетенції еколога-біологічного спрямування;

– розробка поетапної стратегії реалізації кейс-методу в конкретній ситуації.

Матеріал і методи дослідження. Матеріалом дослідження слугували праці сучасних науковців, які піднімають важливе питання використання інноваційних методів у навчально-виховному процесі [1-8], власні лекційні та практичні матеріали еколога-біологічного спрямування. В роботі застосовані наступні методи: аналіз наукових джерел екологічної тематики; синтез, як результат обробки інформації на рівні педагогічної майстерності; конкретизація, що спрямована на висвітлення кейс-методу в конкретній ситуації; узагальнення, як результат підведення висновків та перспектив подальших досліджень.

Результати дослідження та їх обговорення. Прикладний аспект застосування кейс-методу полягає у наступній послідовності реалізації етапів (рис. 1):

I Етап. Викладач проводить короткий екскурс у проблемну ситуацію.

У нашому випадку мова йдеться про історичні аспекти формування концепції евтрофікації, основні складові цього процесу, природні та антропогенні чинники його виникнення, зовнішні ознаки евтрофікованої водойми тощо. Викладач висвітлює змістовні моменти, на які студентам-біологам (екологам) потрібно звернути увагу під час вирішення даної прикладної задачі, висуває основні питання, які потребують дискусійного обговорення перед початком роботи над груповим завданням.

Пропонуємо інструкція для роботи над кейсом «Евтрофікація водойми»:

1. Уважно ознайомтеся з сучасною концепцією евтрофікації водойми.
2. Зверніть увагу на наступні питання: Яка роль біогенних елементів в процесі евтрофікації? Які основні джерела надходження їх у водойму? Який механізм впливу гіпер-евтрофікації на екосистеми водойм? Які зовнішні ознаки забруднення водойми? Яким чином евтрофікація впливає на біопродуктивність водойми? Які відбуваються зміни в ланках гідроекосистеми в процесі евтрофікації?
3. Визначте незрозумілі аспекти кейсової ситуації з метою подальшого їх обговорення перед початком роботи над завданням.



Рис. 1. Послідовність реалізації методу аналізу і діагностики ситуації

II Етап передбачає вирішення організаційних питань щодо поділу студентів на групи. Кожний з груп викладач видає опис ситуації (моделі), яка має реальне місце в житті, та розподіляє завдання (проблемні питання) в групах.

Завдання для I групи. Студенти отримують перелік подій, які відбуваються у водоймі в процесі евтрофікації та мають скласти ланцюг послідовності подій за темою «Наслідки антропогенного насичення водойм біогенними речовинами».

Завдання для II групи. Студенти, аналізуючи наукові статі, монографії, звіти щодо стану природного середовища, мають висунути перелік пропозицій у вигляді схеми, які попереджають евтрофікацію водойм.

Завдання для III групи. Студенти мають проаналізувати основні методи очищення евтрофікованих водойм у табличному варіанті.

Окрім тематичного введення у кейсову ситуацію, викладач оголошує основні показники виконаного групового та індивідуального завдання, бальну систему та критерії оцінювання студентів (табл. 1).

1. Показники оцінювання результатів вирішення ситуації

Груповий показник	Індивідуальний показник
Повнота виконання завдання	Ініціативність та активність
Оригінальність та інноваційність рішень	Етика ведення дискусії
Використання раніше вивченого матеріалу	Індивідуальний аналіз ситуації
Пошук, аналіз та використання додаткової інформації	Аргументованість власної позиції
Презентація та захист власних результатів виконання завдання	Ступінь участі у підготовці групового проекту

III Етап передбачає організацію спільної діяльності в групах, пов'язану із збором інформації з проблемного питання з метою висунування

конкретних пропозицій щодо вирішення кейсової ситуації. Призначений голова групи виступає у ролі координатора, спрямовує дискусію, може призначати кожному учаснику групи індивідуальну роботу, яка включає знайомство з ситуацією, іншими інформаційними матеріалами, їх аналіз та інтерпретація, пошук проблеми, її причин виникнення. Важливим аспектом даного етапу є обмін результатами самостійної роботи студентів, обговорення різних точок зору та їх об'єктивний аналіз з метою розробки оптимального варіанту вирішення проблеми.

IV Етап *спрямований на аналіз та рефлексію спільної діяльності.* На цьому етапі викладач спонукає студентів до повноцінної роботи над завданням, вироблення спільного рішення та його презентацію. Рефлексія спільної діяльності спрямована на готовність діяти кооперуючись в ситуаціях з високим рівнем невизначеності, розроблення стратегії, спрямованої на пошук нових, нестандартних шляхів розв'язання професійних завдань та прагнення до реалізації нововведень і інновацій. В дію вступає специфічний механізм професійного становлення й самовизначення на засадах сформованої професійної діяльності з задіяним особистісно-смысловим професійним рівнем. Кінцева мета цього етапу – це підведення заключних підсумків, формування висновків, узагальнення результатів зробленої роботи та їх презентація. Також підводяться підсумки індивідуальної роботи кожного учасника.

Результати виконання завдань у групах:

I група запропонувала ланцюг послідовності подій за темою «Наслідки антропогенного насичення водойм біогенними речовинами»:

Надходження у водойму біогенних речовин → масовий розвиток синьо-зелених водоростей, що викликають «цвітіння» води → перебудова структури трофічних рівнів у водоймі, зростання маси фітопланктону → масове відмирання водоростей, яке спричиняє гіпоксію (нестачу кисню) → погіршення якості води та умов життя гідробіонтів за рахунок гниття відмерлих тварин та рослин: виділенням CO_2 , CH_4 , H_2S , індолу, скатолу, птомаїнів (ptomaine) → зменшення різноманітності видів → зниження здатності до гомеостазу і саморегуляції гідроекосистеми.

II група запропонувала графічну інтерпретацію виконання завдання (рис 2).

III група запропонувала методи очищення евтрофікованих водойм (табл. 2).

V Етап – це завершення роботи над кейсом. Викладач підводить підсумки за проведеним кейсом, коментує дискусію у групах, результати роботи та висновки кожної групи. Також коментує варіанти рішень, можливі упущення або помилки, які мали місце в ході виконання завдань. На підставі запропонованих критеріїв оцінювання викладач дає індивідуальну оцінку роботи кожного студента, прислухаючись до підсумків індивідуального оцінювання в групах.

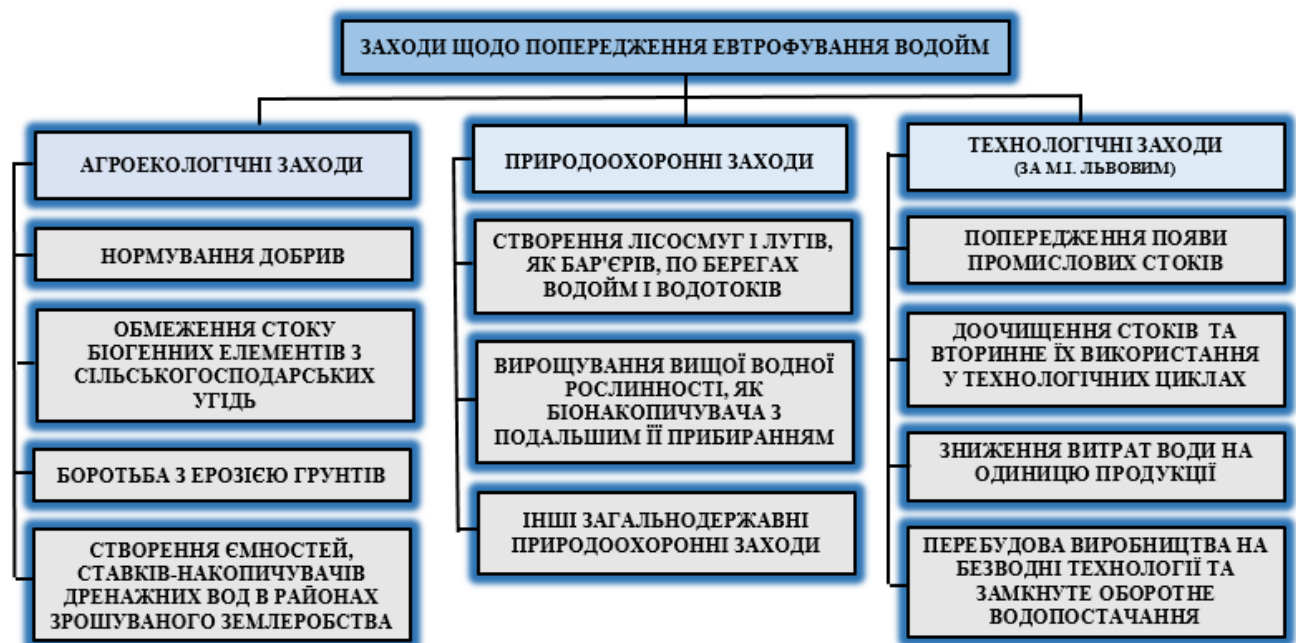


Рисунок 2. «Боротьба з евтрофікацією водойм».

2. Сучасні методи очищення евтрофікованих водойм

Метод	Основний зміст
Механічний	Метод передбачає позбавлення водної товщі водойми від завислих речовин за допомогою перекачування води насосом через фільтри.
Гідромеханізація	Метод передбачає використання гідромеханізованого обладнання, яке дозволяє за допомогою потужних насосів транспортувати доні відклади з дна водойми на підготовлений майдан.
Біологічний	Метод включає використання бактерій і мікроорганізмів, що здатні нормалізувати біогенний баланс у водоймі та попереджають розмноження анаеробних форм.
Ультрафіолетове випромінювання	Використовують ультрафіолетові промені спеціальних приладів, що зменшують можливість мікроорганізмів до відтворення.
Хімічний	Метод ґрунтується на додаванні в ставок реагентів, які з часом нормалізують кисло-лужний і біогенний баланс водойми.

Висновок та перспективи. Застосування інтерактивної методики аналізу і діагностики ситуації (Case Study) в професійній підготовці студентів природничого спрямування сприяє формуванню у майбутніх фахівців професійних, конструктивних вмінь еколого-біологічної діяльності, яка орієнтована на розвиток новітньої компетенції щодо нетрадиційного аналітичного мислення. Практичні навички застосування кейс-методу дозволяють імітувати реальні ситуації та розвивати професійні вміння, варіативне мислення, ініціативність, імпровізацію.

Подальші дослідження спрямовані на вивчення особливостей застосування інтерактивних методів у процесі підготовки майбутніх фахівців природничого спрямування та їх значення для формування компетенцій

еколого-біологічної діяльності (пізнавальних, спеціальних творчих, комунікативних тощо).

References

1. DSTU 3041-95 System of standards in the field of environmental protection and rational use of resources. Hydrosphere. Use and protection of water. Terms and definitions : Order of the State Standard of Ukraine No. 91 dated March 28, 1995, UKRN: 01.040.13; 13.060.01. - 1995. - p. 37
2. Surmin Yu.P. Situational Analysis or Anatomy of the Case Method / Yu. P. Surmin. - K.: Center for Innovation and Development, 2002. - 236 p.
3. Skyba M. Application of case-method for formation of constructive and projective skills of ecological-pedagogical activity / M. Skyba // Pedagogical sciences: theory, history, innovative technologies. - 2016. - No. 4. - P. 354-362. - Access mode: http://nbuv.gov.ua/UJRN/pednauk_2016_4_50.
4. Vaganova O.I. Case study method in vocational training: educational and methodical manual [Electronic resource] / O. I. Vaganova. - N. Novgorod: VGIPU, 2011. - 57 p. - Access mode: <https://vgipuvaganova.files.wordpress.com/..../d0b2d0b0d0b3d0b0d0bdd>.
5. Pashchenko T. M. Case method as a modern technology of training of special disciplines [Electronic resource] / T. M. Pashchenko. // Youth and Market: Monthly Scientific and Pedagogical Journal of the Ivan Franko Drohobych State Pedagogical University. - 2015. - Output 8(127). - pp. 94-99. - Mode of access: <http://lib.iitta.gov.ua/10441/1/PaschenkoKeyes.pdf>
6. Smolyaninova OG Information Technologies and Case Study Methods in Professional Training of Students at the Pedagogical University [Text] / O. G. Smolyaninova // Proceedings of the II All-Russian scientific-methodical conference "Education XXI century: innovative technologies, diagnostics and management for the purpose of informatization and humanization". Krasnoyarsk, 2000.
7. Eremin AS The final stage of the analysis of training cases and the assessment of students' work using the case-method / AS Eremin // Innovations in education. - 2010. - No. 8. - P. 120-141.
8. Grebenkova G.V. Case method in vocational training [Electronic resource] / GV Grebenkova // Proftehosvit Odessa. - 2009. - Vip. 2. - Mode of access : site <http://nmc-odessa-com.ucoz.ru/keis-metod.doc>.

МЕТОД АНАЛИЗА И ДИАГНОСТИКИ СИТУАЦИИ (CASE STUDY) В ПРОФЕССИОНАЛЬНОЙ ПОДГОТОВКЕ СТУДЕНТОВ ЕСТЕСТВЕННОГО НАПРАВЛЕНИЯ

С. М. Смирнова, Т.А. Васильева, В.Н. Смирнов

Аннотация. *Сосредоточено внимание на применении метода анализа и диагностики ситуации в профессиональной подготовке студентов естественного направления. Метод направлен на формирование коммуникативной компетенции нетрадиционного аналитического мышления и предметной компетенции эколого-биологического направления будущих специалистов. В основу метода положен ситуационный принцип, или случай (case), что служит весомым критерием принятия решения в эколого-биологических задачах. В прикладном аспекте проанализирована эвтрофикация водоёмов с поэтапной реализацией кейса по группам: экскурс в проблемную ситуацию, распределение задач (проблемных вопросов) в*

группах, организация совместной деятельности студентов, анализ и рефлексия, обобщение результатов проделанной работы и их презентация, формирование выводов. Реализация на практике этого метода позволяет использовать гибкость в принятии совместных решений с постоянной направленностью на коллективную критику и способность переосмысливать свой профессиональный и личный опыт.

Ключевые слова: кейс-метод, эвтрофикация водоёмов, эколого-биологические задачи, естественное направление

METHOD OF CASE STUDY ANALYSIS AND DIAGNOSTICS IN PROFESSIONAL PREPARATION OF STUDENTS OF NATURAL DIRECTION

S. M. Smyrnova, T.A. Vasilieva, V. M. Smyrnov

Abstract. *Attention is focused on the application of the method of analysis and diagnostics of the situation in the professional training of students of natural sciences. The method is aimed at forming the communicative competences of non-traditional analytical thinking and subject competence of the ecological and biological direction of future specialists. The situation or the case is the basis of the method, which serves as an important criterion for decision making in environmental and biological tasks. Eutrophication of reservoirs is analyzed in the applied aspect with the phased implementation of the case in groups: introduction into the problem situation, distribution of tasks (problem issues) in groups, organization of joint activities of students, analysis and reflection, synthesis of the results of the work and their presentation, formation of conclusions. Implementing the method in practice allows you to use flexibility in making joint decisions with a constant focus on collective critique and the ability to rethink your professional and personal experience.*

Key words: *case method, eutrophication of reservoirs, ecological-biological tasks, natural sciences*

ПОЛІМОРФІЗМ ІНТРОНІВ ГЕНІВ АКТИНУ ЯК ІНСТРУМЕНТ ГЕНОТИПУВАННЯ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДИНИ SOLANACEAE

А. С. ПОСТОВОЙТОВА, аспірант*

Я. В. ПІРКО, кандидат біологічних наук, зав. відділу популяційної генетики

Я. Б.БЛЮМ, доктор біологічних наук,

директор ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»

ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»

E-mail: nastya.postovoytova@gmail.com

Анотація. У сучасній селекції ДНК-маркери є незамінним інструментом для ідентифікації та добору генотипів господарсько цінних культур. Новим та багатообіцяючим напрямом розробки молекулярних маркерних систем є ген-специфічні ДНК-маркери (GTMs), зокрема маркери, що ґрунтуються на виявленні поліморфізму довжин інтронів цільових генів (ILP).

Метою роботи було оцінити можливість використання поліморфізму інтронів генів актину, а саме довжин ІІ-го інтрону генів актину (ABP-actin base polymorphism) для ДНК-профілювання сортів томату та картоплі (Solanaceae). ДНК виділяли із проростків за допомогою ЦТАБ-методу. Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили з використанням власноруч розроблених універсальних праймерів. Продукти реакції розділяли за допомогою електрофорезу в 6 %-му поліакриламідному гелі з подальшою візуалізацією шляхом забарвлення нітратом срібла. За результатами аналізу 12 сортів томату та 4 сортів картоплі виявлено, що кожен із сортів томату містив не менше 7 ампліконів ІІ-го інтрону генів актину та лише в одному з них виявлений поліморфізм. АВР-профілі сортів картоплі виявилися більш гетерогенними і мали значно більше фрагментів. В цілому маркерна система, що ґрунтується на оцінці поліморфізму інтронів генів актину (ABP-маркерна система) дозволила диференціювати різні сорти томату та картоплі. Показана значна різниця між профілями проаналізованих видів. Загалом поліморфізм інтронів генів актину виявився надійним джерелом генетичної інформації і може використовуватися як додаткова для генотипування та генетичної диференціації господарсько цінних рослин родини Solanaceae.

Ключові слова: ДНК-маркер, гени актину, інтрон, поліморфізм довжини, томати, картопля

Актуальність. В результаті селекційної роботи з кожним роком збільшується кількість сортів цінних сільськогосподарських культур. Це спонукає до постійного вдосконалення систем їх генотипування. ДНК-маркери стали незамінним інструментом у вирішенні цього питання. Зокрема за їх допомогою проводиться оцінка батьківських форм генотипів, вивчення

* Науковий керівник - доктор біологічних наук, директор ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», Я. Б.Блюм

генетичної однорідності сортів, створених в результаті селекції, а також оцінюється генетична мінливість, створюються карти геномів господарсько цінних культур тощо [1, с. 1044-1054, 2, с. 554–560].

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Сьогодні існує велика кількість різних ДНК-маркерних систем, які досить успішно реалізують себе в сучасній генетиці та молекулярній селекції. Більшість з них належить до великої групи довільних ДНК-маркерів (Random DNA markers), які використовують для аналізу некодуючих ділянок геному або ділянок з невизначеною функцією. Найбільш поширені такі маркерні системи, як RAPD (random amplified polymorphic DNA) [3, с. 887–898], AFLP (amplified fragment length polymorphism) [4, с. 29–40], RFLP (restriction fragment length polymorphism) [4, с. 29–40] та SSR (simple sequence repeats) [5, с. 685–691]. Однак, зважаючи на інтенсивний розвиток програм зі секвенування геномів господарсько-цінних видів рослин, загальнодоступною стала інформація щодо послідовностей закодованих генів, їх структури, копійності, розташування в хромосомах тощо. Такі дослідження дали поштовх щодо створення нових, цільових ДНК-маркерних систем. Саме тому сьогодні в генетико-селекційних дослідженнях спостерігається перехід від довільних ДНК-маркерів до ген-специфічних маркерів (gene-targeted markers (GTMs) [6, с. 139–162]. Ключовою відмінністю GTMs є використання генів із розшифрованими послідовностями та функціями. Одним з перспективних напрямів розробки GTMs є вивчення поліморфізму довжин інтронів генів – ILP (intron length polymorphism) [7, с. 417–427]. Екзони часто є найконсервативнішими ділянками генів, а інтрони – гіперваріабельними, тобто потенційно можуть бути джерелом генетичного поліморфізму [8]. Шляхом підбору ген-специфічних праймерів до консервативних ділянок екзонів під час проведення ПЛР можна отримати копії інтронів та в подальшому виявити їх поліморфізм.

Родина Пасльонові (*Solanaceae*) є однією з найчисельніших родин покритонасінних рослин. Згідно з інформацією бази даних The Plant List (www.theplantlist.org) ця родина налічує близько 2 678 видів рослин, які поділені на 115 родів. Серед представників *Solanaceae* велика кількість господарсько цінних культур, зокрема томат (*Solanum lycopersicum*) та картопля (*Solanum tuberosum*). Також ці види вважаються модельними об'єктами родини та найбільш широко вивчаються сучасними генетиками та селекціонерами. В межах родини *Solanaceae* ДНК-маркери широко використовуються для встановлення філогенетичних зв'язків, створення генетичних карт господарсько цінних ознак, а також в порівняльній геноміці та селекційному доборі [9, с. 21-30]. Зокрема для томату та картоплі розроблено та протестовано різні ДНК-маркери, а саме: RAPD [3, с. 887–898, 10, с. 127–136], RFLP, AFLP [4, с. 29–40, 10, с. 127–136], SSR [5, с. 685–691, 10, с. 127–136] тощо.

Порівняно нещодавно були опубліковані дані щодо повного секвенування геному томату (The Tomato Genome Consortium 2012) [11, с. 635–641] та картоплі (The Potato Genome Sequencing Consortium 2011) [12, с. 189-195], в результаті чого стало можливим створення ген-специфічних ДНК-маркерних систем. Однією з таких маркерних систем є ABP (actin based polymorphism), що базується на виявленні поліморфізму довжин другого інтрону генів актину.

Мета дослідження. Метою даної роботи була оцінка можливості використання поліморфізму інтронів генів актину для генотипування та диференціації різних сортів томату та картоплі.

Матеріали і методи дослідження. Було проаналізовано 12 сортів томату (*S. lycopersicum*): Money Maker, Перлина, Волгоградський, Балконне Чудо золоте, Де Барао чорний, Тарасенко рожевий, Ефемер, Шапка Мономаха, Валютній, Американський Синій, Золотий Горіх та Де Барао рожевий, та 4 сорти картоплі (*S. tuberosum*): Зарево, Світанок, Левада та Вернісаж.

Тотальну геномну ДНК з десятиденних проростків виділяли за допомогою ЦТАБ-методу [13]. Кількість виділеної ДНК перевіряли спектрофотометрично на біофотометрі «Eppendorf» (США) з визначенням її концентрації, а також використовуючи 1,5 %-вий агарозний гель. ДНК зберігали за температури -20 °С.

ПЛР проводили за допомогою ампліфікатора ThermalCycler 2720 («Applied Biosystems», США). Реакційна суміш (об'ємом 10 мкл) містила десятикратний ПЛР буфер з 200 мМ сульфатом амонію, 2,5 мМ MgCl₂, 50 нг рослинної ДНК, 1 мкМ кожного з праймерів, 0,2 мкМ кожного dNTPs, 0,5 од. Taq полімерази («Fermentas», Литва). Ампліфікацію проводили з використанням наступного протоколу: початкова денатурація (95 °С) – 3 хв, 40 циклів ампліфікації (денатурація 95 °С – 45 с, віджиг праймерів 59 °С – 1хв, подовження 72 °С – 1 хв), кінцеве подовження 72 °С – 7 хв, 10 °С – утримання. Кожну ПЛР-реакцію проводили як мінімум в двократній повторності, щоб при подальшому електрофоретичному аналізі мати можливість виявити неспецифічні продукти ампліфікації.

Для виявлення поліморфізму довжин II-го інтрону генів актину використовували власноруч розроблені вироджені праймери, дизайн яких був здійснений на підставі аналізу консенсусних послідовностей генів актину рослин, представлених у базі даних Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>):

ABP-F: 5'- TGG CAT CAY ACN TTY TAC AAY GA -3'

ABP-R: 5'-CCMCCACTTDAGVACRATGTT -3'.

Розділення утворених під час ПЛР фрагментів проводили з використанням електрофорезу в 6 %-вому неденатуруючому поліакриламідному гелі в 1X TBE-буфері [13]. В кожен лунку наносили по 1 мкл зразку. Для визначення довжин фрагментів застосовували ДНК-маркер молекулярної маси (O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, ready-to-use; «Fermentas», Литва). Розділені фрагменти візуалізували за допомогою забарвлення їх нітратом срібла [14, с. 339–348]. Цифрові зображення гелів аналізували використовуючи програму GelAnalyzer (<http://www.gelanalyzer.com/>).

Результати дослідження та їх обговорення. Як відомо, актин – є основним білком мікрофіламентів клітини [15, с. 2009–2019] та характеризується значною консервативністю екзонних ділянок генів. Одночасно інтронам генів притаманна гіперваріабельність нуклеотидних послідовностей, що свідчить про можливість детекції поліморфізму довжин інтронів та подальшу оцінку генетичної мінливості вибірок за цією ознакою. Варто зазначити, що подібна робота проводилася з використанням різних

сортів льону-довгунця [16, с. 38–42, 17, с. 34] на підставі аналізу поліморфізму інтронів генів β -тубуліну – TBP (tubulin based polymorphism) [18, с. 281–291]. На сьогодні TBP широко використовується для вивчення мінливості та генотипування різноманітних рослин. Зокрема, показана доцільність використання TBP для генотипування сортів льону [19, с. 1–10], пшениці, ячменю [20, с. 82–86], вивчення генетичної мінливості популяцій егілопсу [21], тощо.

На рис. 1 представлені результати аналізу 12 сортів томату за допомогою АВР. На електрофореграмі спостерігаються чіткі смуги інтронів, що мають довжину в діапазоні від 700 п. н. до 1500 п. н. Кожен із досліджуваних зразків (сортів) містить не менше ніж по 7 ампліконів. Довжини утворених фрагментів у більшості сортів складали близько 1486, 1411, 1033, 963, 870, 846 п. н. Варто зазначити, що нижня смуга складається з двох фрагментів 753 п. н. та 743 п. н., які під час електрофорезу погано розділяються. Проаналізовані сорти за електрофоретичними спектрами виявилися достатньо однорідними, однак у зразку 10 (сорт Американський Синій) був виявлений амплікон, довжиною близько 1351 п. н. (на рис. 1 позначено стрілкою), який вирізняє цей сорт з поміж інших.

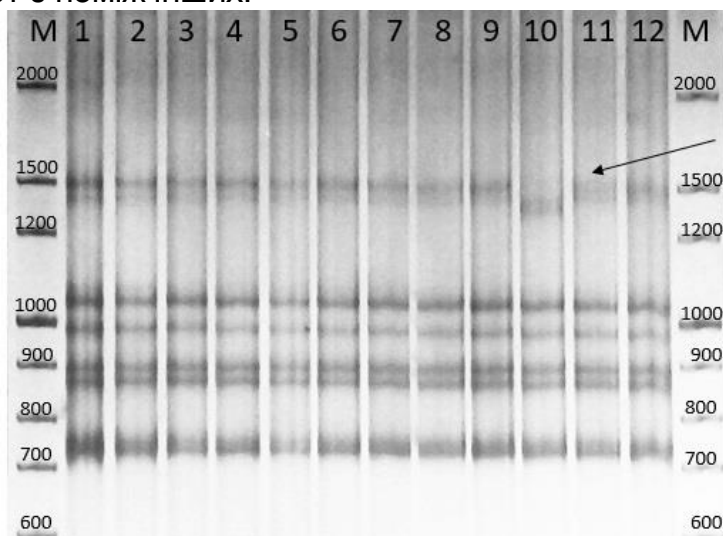


Рис. 1. АВР-профілі 12 сортів томату (*S. lycopersicum*); М – маркер; 1 – 12 (у верхній частині рисунків) – номери зразків: 1 – MoneyMaker, 2 – Перлина, 3 – Волгоградський, 4 – Балконне Чудо золоте, 5 – Де Барао чорний, 6 – Тарасенко рожевий, 7 – Ефемер, 8 – Шапка Мономаха, 9 – Валютний, 10 – Американський Синій, 11 – Золотий Горіх, 12 – Де Барао рожевий; стрілкою позначена поліморфна зона

На електрофореграмі (рис. 2) показані результати аналізу 4 сортів картоплі з використанням АВР-аналізу. АВР-профілі картоплі мають значну кількість фрагментів, що розподіляються в діапазоні від 780 п. н. до 2000 п. н. Смуги, які розташовуються в зоні вище 2000 п. н. не аналізувалися, оскільки вони є нечіткими, нестабільними та не були передбачені біоінформаційним аналізом (відсутні інтрони такої довжини на підставі аналізу геному картоплі в базі даних Phytozome). В межах кожної проби візуалізується не менше 15 ампліконів різної довжини. Найбільш щільний розподіл фрагментів спостерігається в діапазоні від 700 п. н. до 900 п. н. Серед чотирьох проаналізованих сортів картоплі визначено різні фенотипи

через присутність різної кількості поліморфних зон (на рис. 2 деякі позначені стрілками). Наприклад, у зразку 3 (сорт Зарево) був виявлений унікальний амплікон, довжиною близько 630 п. н.

Таким чином, в результаті проведеного аналізу було порівняно АВР-профілі двох сільськогосподарських культур родини *Solanaceae*: томату (*S. lycopersicum*) та картоплі (*S. tuberosum*). Виявилося, що види *S. lycopersicum* та *S. tuberosum* значно відрізняються між собою як за кількістю фрагментів, так і за їх розподілом на електрофореграмах, однак безперечно мають спільні амплікони, що свідчить про їх генетичну спорідненість та спільні філогенетичні зв'язки. Значно більша кількість ампліконів візуалізувалася у сортів картоплі. Також АВР-профілі картоплі виявилися більш гетерогенними. Імовірно це пов'язано з особливостями селекційного добору сортів картоплі та томату, а також з особливостями запилення представників родини *Solanaceae*.

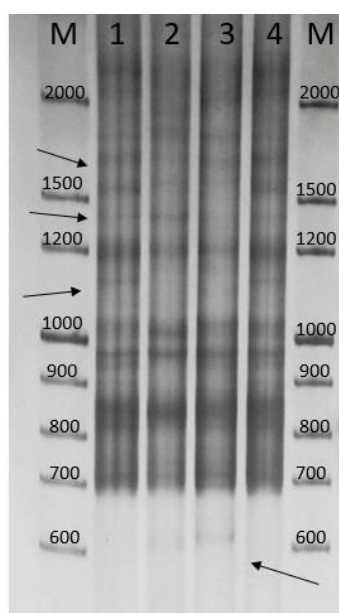


Рис. 2. АВР-профілі 4 сортів картоплі (*S. tuberosum*); М – маркер; 1 – 4 (у верхній частині рисунків) – номери зразків: 1 – Світанок, 2 – Левада, 3 – Зарево, 4 – Вернісаж; стрілками позначені поліморфні зони

Висновки та перспективи. АВР – маркерна система, що заснована на оцінці поліморфізму довжин другого інтрону генів актину, в цілому виявилася придатною для ДНК-профілювання сортів томату та картоплі, незважаючи на те, що диференціація сортів томату за цим видом маркерів виявилася невисокою. Ймовірно, що АВР доцільно використовувати разом з іншими молекулярними маркерами для генотипування та диференціації сортів рослин під час проведення генетико-селекційних досліджень.

References

1. Khlestkina, E. K. (2013). Molecular markers in genetic studies and breeding. Vavilov J. Genetics Breed., 17, 1044-1054. doi:10.1134/S2079059714030022
2. Andersen, J. R., Lubberstedt, T. (2003). Functional markers in plants. Trends Plant Sci., 8, 554–560.
3. Bernatzky, R., Tanksley, S. D. (1986). Toward a saturated linkage map in tomato based on isozymes and random cDNA sequences. Genetics, 112, 887–898.

4. Saliba-Colombani, V., Causse, M., Gervais, L., Philouze, J. (2000). Efficiency of RFLP, RAPD, and AFLP markers for the construction of an intraspecific map of the tomato genome. *Genome*, 43, 29–40. doi: 10.1139/gen-43-1-29
5. Ohyama, A., Asamizu, E., Negoro, S., Miyatake, K., Yamaguchi, H., Tabata, S., Fukuoka, H. (2009). Characterization of tomato SSR markers developed using BAC-end and cDNA sequences from genome databases. *Mol. Breed.*, 23, 685–691. doi:10.1007/s11032-009-9265-z
6. Gupta, P. K., Rustgi, S. (2004). Molecular markers from the transcribed/expressed region of the genome in higher plants. *Funct. Integr. Genomics.*, 4, 139–162. doi: 10.1007/s10142-004-0107-0
7. Wang, X., Zhao, X., Zhu, J., Wu, W. (2005). Genome-wide investigation of intron length polymorphisms and their potential as molecular markers in rice (*Oryza sativa* L.). *DNAREs.*, 12, 417–427. doi:10.1093/dnares/dsi019
8. Postovoitova, A. S., Bayer, G. Ya., Pydiura, N. A., Pastukhova, N. L., Pirko, Ya.V., Yemets, A. I., Blume, Ya.B. (2015). Poshuk ta analiz poslidovnostey geniv aktinu v genomi l'onu [Search and analysis of sequences of the actin genes in flax genome]. *NUBIP scientific reports*, 8(57). UPL: http://nd.nubip.edu.ua/2015_8/index.html/
9. Shirasawa, K., Hirakawa, H. (2013). DNA marker applications to molecular genetics and genomics in tomato. *Breed. Sci.*, 63, 21–30. doi:10.1270/jsbbs.63.21
10. Milbourne, B. D., Meyer, R., Bradshaw, J. E., Baird, E., Bonar, N., Provan, J. (2010). Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. *Mol. Breed.*, 3(2), 127–136.
11. Sato, Sh., Tabata, S., Hirakawa, H., Asamozu, E. (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, 485, 635–641. doi:10.1038/nature11119
12. Xu, X., Pan, S., Cheng, S., Zhang, B. (2011). Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature*, 475(7355), 189–195. doi:10.1038/nature10158
13. Sambrook, J., David, W. R. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manua*. Cold Spring Harbor, 2, 2344.
14. Rahman, M. H., Jaquish, B., Khasa, P. D. (2000). Optimization of PCR protocol in microsatellite analysis with silver and SYBR stains. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 18, 339–348.
15. Gunning, P. W., Ghoshdastider, U., Whitaker, S., Popp, D., Robinson, R. C. (2015). The evolution of compositionally and functionally distinct actin filaments. *J. Cell Sci.*, 128(11), 2009–2019. doi: 10.1242/jcs.165563
16. Postovoitova, A. S., Pirko, Ya.V., Blume, Ya.B. (2016). Polimorfizm dovgin drugogo intronu geniv aktinu v genomi *Linum usitatissimum* L. [The second intron length polymorphism of actin genes in *Linum usitatissimum* L. genome]. *Factors of experimental evolution of organisms*, 19, 38 – 42.
17. Postovoitova, A. S., Yotka, O. Y., Pirko, Ya. V., Blume, Ya. B. (2017). Analysis of polymorphism of the lengths of introns of actin genes in representatives of the genus LINUM. *Plant biology and biotechnology: materials of the III conference of young scientists*. Kyiv (Ukraine), 34.
18. Bardini, M., Lee, D., Donini, P., Mariani, A., Giani, S., Toschi, M., Lowe, C., Breviario, D. (2004). Tubulin-based polymorphism (TBP): a new tool, based on functionally relevant sequences, to assess genetic diversity in plant species. *Genome*, 47, 281–291. doi: 10.1139/g03-132
19. Rabokon, A. N., Pirko, Ya.V., Demkovych, A. Ye., Blume, Ya.B. (2018). Comparative analysis of the efficiency of intron-length polymorphism of β -tubulin genes and microsatellite loci for flax varieties genotyping. *Cytol. Genet.*, 52(1), 1–10.
20. Rabokon, A. N., Demkovych, A., Pirko, Ya., Blume, Ya. (2015). Doslidgennya polimorfizmu dovgeni introniv geniv β -tubulinu u sortiv *Triticum aestivum* L. ta *Hordeum vulgare* L. [Studing of β -tubulin gene intron length polymorphism of *Triticum aestivum* L.

and *Hordeum vulgare* L.varieties]. Factors of experimental evolution of organisms, 1, 82 – 86.

21. Rabokon, A., Demkovych, A., Sozinov, A., Kozub, N., Sozinov, I., Pirko, Ya., Blume, Y. (2017). Intron length polymorphism of β -tubulin genes of *Aegilops biuncialis* Vis. Cell Biol. Intl. doi: 10.1002/cbin.10886.

POLYMORPHISM OF ACTIN GENE INTRONS AS AN INSTRUMENT FOR GENOTYPING OF THE REPRESENTATIVES FROM SOLANACEAE FAMILY

A. S. Postovoitova, Ya. V. Pirko, Ya. B. Blume

Abstract. In modern selection, DNA markers are an indispensable tool for identifying and selecting genotypes of economically valuable crops. New and promising direction of development of molecular markers is a gene-targeted markers (GTMs), namely markers, which are based on the identified intron length polymorphism of genes (ILP). The aim of the study is to evaluate the usefulness of the length polymorphism of the second actin gene intron (ABP-actin base polymorphism) for DNA-profiling varieties of plants from family Solanaceae. DNA was isolated from seedlings using CTAB-method. PCR was conducted using our own universal ABP primers. The fragments were separated by electrophoresis in a 6% polyacrylamide gel, and visualized by silverstains. 12 varieties of tomato (*S. lycopersicum*) and 4 potato varieties (*S. tuberosum*) were analyzed. Each tomato variety contained at least 7 fragments of II-nd intron, but only one polymorphic bend was detected. The ABP-profiles of the potato varieties were more heterogeneous. The different varieties of tomatoes and potatoes were identified by ABP marker system. It was shown the significant difference between the profiles of the analyzed species. In general, ABP-markers are a reliable source of genetic information and can be widely used for genotyping and evaluating of the differentiation of commercially valuable plants of Solanaceae.

Keywords: DNA marker, actin genes, intron, length polymorphism, tomato, potato.

ПОЛИМОРФИЗМ ИНТРОНОВ ГЕНОВ АКТИНА КАК ИНСТРУМЕНТ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА SOLANACEAE

А. С. Постовойтова, Я. В. Пирко, Я. Б. Блюм

Аннотация. В современной селекции ДНК-маркеры являются незаменимым инструментом для идентификации и отбора генотипов хозяйственно ценных культур. Новым и перспективным направлением разработки молекулярных маркерных систем являются ген-специфические ДНК-маркеры (GTMs), в том числе маркеры, основанные на выявлении полиморфизма длины интронов целевых генов (ILP).

Целью работы было оценить возможность использования полиморфизма интронов генов актина, а именно длин II-го интрона генов актина (ABP-actin base polymorphism) для генотипирования сортов томата и картофеля (*Solanaceae*). ДНК выделяли из проростков с помощью ЦТАБ-метода. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с использованием собственноручно разработанных универсальных

праймеров. Продукты реакции разделяли с помощью электрофореза в 6 %-ном полиакриламидном геле с последующей визуализацией путем окраски нитратом серебра. В результате анализа 12 сортов томата и 4 сортов картофеля обнаружено, что каждый из сортов томата содержал не менее 7 ампликонов II-го интрона генов актина и только в одном из них обнаружен полиморфизм. АВР-профили сортов картофеля оказались более гетерогенными и имели значительно больше фрагментов. Маркерная система, основанная на оценке полиморфизма интронов генов актина (АВР-маркерная система), позволила идентифицировать различные сорта томата и картофеля. Показана значительная разница между профилями проанализированных видов. В общем полиморфизм интронов генов актина оказался надежным источником генетической информации и может использоваться для генотипирования и генетической дифференциации хозяйственно ценных растений семейства Solanaceae.

Ключевые слова: ДНК-маркер, гены актина, интрон, полиморфизм длины, томат, картофель

ВИКОРИСТАННЯ ІНТЕГРАЛЬНИХ ПОКАЗНИКІВ СТАНУ ПАРКОВИХ ЛІСОВИХ ЕКОСИСТЕМ ДЛЯ БІОІНДИКАЦІЇ АНТРОПОГЕННОГО НАВАНТАЖЕННЯ

Н. В. МІРОШНИК, кандидат біологічних наук, науковий співробітник

ДУ «Інститут еволюційної екології НАН України»

О. В. ТЕРТИЧНА, доктор біологічних наук, старший науковий співробітник

Інститут агроекології і природокористування НААН

І. К. ТЕСЛЕНКО, провідний інженер

ДУ «Інститут еволюційної екології НАН України»

E-mail: miroshnik_n_v@mail.ru, olyater@ukr.net

Анотація. Пріоритетним напрямом сучасних екологічних досліджень є біоіндикаційна оцінка наслідків антропогенного навантаження для довкілля. Метою статті є удосконалення методичних основ інтегрального оцінювання стану паркових лісових екосистем в умовах антропогенного навантаження та визначення напряму процесів, що в них відбуваються. Розроблено систему інтегрального оцінювання стану паркових екосистем, що включає розрахунок індексу антропогенного навантаження ($J_{ан}$) на основі 17 базових показників, індексів розвитку деградаційних процесів, структурного різноманіття (модифікованого), оцінку ризику для визначення напряму процесів та рівня дестабілізації екосистем. Додатково запроваджено коефіцієнти W , P , що враховують рівень реального рекреаційного навантаження на парки та характеристики фітоценозу як індикатори стану урбоекосистем. Для інтегрального оцінювання стану парків та біоіндикації антропогенного навантаження запропоновано застосовувати екосистемний та структурний підходи із включенням трьох векторів організації складних систем (структурно-функціональний, рівні організації живого, диференціація за екологічними нішами), з наступним аналізом ризику дестабілізації екосистем. Застосовано новий підхід до інтегрального оцінювання стану та рівня дестабілізації парків в умовах антропогенного впливу за трьома блоками. Надалі можливе зонування території, картографування з відображенням структури та векторів їх трансформації для прийняття рішень щодо збереження, відновлення та підтримання стабільності урбоекосистем.

Ключові слова: інтегральні показники; паркові лісові екосистеми; антропогенний вплив; системний, структурний підходи

Актуальність. Необхідною умовою підтримання стійкості урбоекосистем є наявність природних або частин природних екосистем у їх складі. Пріоритетним напрямом сучасних екологічних досліджень є оцінювання масштабів антропогенного навантаження, зокрема, методами

біоіндикації. Найточнішими індикаторами стану екосистем є кількісні співвідношення між різними показниками, а не абсолютні їх дані. Зокрема, для індикації динаміки і стійкості екосистем пропонують використовувати метод рангового розподілу таксонів [10]. Інтегральні показники, як об'єднання багатьох вихідних змінних в одну характеристику, можуть бути інструментом критеріальної оцінки, порівняння об'єктів між собою, вибору найкращої альтернативи, опису динаміки змін та прогнозування стану. Інформативність, точність та достовірність такого індекса залежить від правильного вибору методу обробки даних на певному етапі відповідно до поставлених завдань [1]. Тому необхідним є аналіз меж застосованості цих індексів на реальних об'єктах, що ми здійснюватимемо у паркових лісових екосистемах (ПЛЕ) м. Києва.

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Інтегральне оцінювання стану екосистем у межах поселень людей проводять у Німеччині [38], Росії [33, 39]. Комплексний підхід до оцінки екосистемних послуг, запобігання екологічних ризиків для лісових та урбоекосистем – у США [26, 30], Польщі [34], Чехії [37], Китаї [22, 28, 42], Кореї [25] та інших країнах [23, 29, 32, 36]. Стан фітоценозів та зелених насаджень парків за градієнтами урбанізації у межах великих міст досліджують за різними структурними ланками лісових екосистем [24, 27, 31, 38, 40] та принципами індикації їх стійкості [35, 42]. Здійснюють інтегральне оцінювання ризиків втрати екосистем [9], ступеня окультуреності або гемеробії на видовому, екосистемному рівні [10, 27]. Розроблені індекси інтегральної оцінки антропогенного навантаження за різними показниками [5, 6, 15–17, 21]. Використовують різні комбінації характеристик екосистем, біотопів або територій [10, 13], але інтегрального індекса оцінювання стану ПЛЕ ще не існує. Нами запропонована система критеріїв і показників оцінювання антропогенного навантаження на парки м. Києва [20], модифіковано індекс структурного різноманіття (H_{str}) для характеристик ПЛЕ [19], що дає змогу оцінити вплив комплексного антропогенного навантаження на стан ПЛЕ міста, виявити найгостріші екологічні проблеми та запропонувати заходи, спрямовані на їх збереження та підтримання.

Метою дослідження є удосконалення методичних основ інтегрального оцінювання стану паркових лісових екосистем в умовах антропогенного навантаження та визначення напряму процесів, що в них відбуваються.

Матеріали і методи дослідження. Методика досліджень базується на використанні методів системного, порівняльного аналізу, польових, камеральних досліджень, аналітичній, математичній, статистичній і картографічній обробці фактичних і фондових матеріалів щодо формування і розвитку паркових екосистем у межах міста.

Результати дослідження та їх обговорення. У нашій роботі паркова лісова екосистема (ПЛЕ) – природна чи природно-антропогенна неповночленна, субсидована людиною екосистема із деревостаном чи деревно-чагарниковим фітоценозом, у межах якої просторово організовані і гармонізовані в систему природні компоненти, ландшафтні комплекси та малі архітектурні споруди, поєднані дорожньо-транспортною мережею, що разом створюють певний архітектурний ландшафтний об'єкт, природна

стійкість і структура якого підтримуються людиною; основною функцією ПЛЕ є стабілізація урбоекосистеми.

Для достовірної, точної, репрезентативної оцінки впливів на ПЛЕ використовують кількісні методи. Їх недоліком є неузгодженість точності, детальності оцінки та широти охоплення всіх чинників, що звужує область їх використання, потребує уточнень, розпорошує результати, заважає сформувати цілісне уявлення про стан ПЛЕ в даний відрізок часу (табл. 1). Тому використання інтегрованого індексу стану ПЛЕ доцільним в тих випадках, коли зручніше користуватися однозначною оцінкою: для планування природоохоронної діяльності, здійснення районування, картографування тощо.

Нами використано інтегральний індекс антропогенного навантаження ($J_{ан}$), запропонований [6, 11, 17]. На його основі модифікована для особливостей регіону, об'єкту дослідження та сформована система з 17 базових показників (табл. 2), за трьома блоками, що відображають аерозабруднення, рекреаційне навантаження, зміни біотичної складової та характеризують стан ПЛЕ в умовах урбосередовища. В $J_{ан}$ може бути введено довільну кількість різноякісних показників залежно від особливостей території та впливу, який оцінювали [5, 6, 11, 16]. Перетворення окремих базових показників у похідні здійснюватимемо шляхом нормування одним із способів [18]:

$$q = \frac{(J - \bar{J})}{\sigma}; q = \frac{J}{\bar{J}}; q = \frac{J}{J'}; q = \frac{J}{J_{max}}; q = \frac{(J - \bar{J})}{(J_{max} - J_{min})}, \quad (1)$$

де q – нормоване значення параметра J ;

J – поточне значення параметра;

$\bar{J}$ – середнє значення параметра;

σ – середнє квадратичне відхилення;

J – деяке нормативне (контрольне) значення параметра;

J_{max} – найбільше значення параметра;

J_{min} – найменше значення параметра J .

1. Характеристика методів кількісного інтегрального оцінювання ПЛЕ, за [14], з доповненнями

Характеристики	Методи кількісного інтегрального оцінювання					
	аналі- тичний	ста- тис- тичний	індекс- ний	аналізу чутли- вості	Дере- ва рішень	експерт- них оцінок
Оцінка	відносна	абсо- лютна	віднос- на	відносна	абсо- лютна	віднос- на
Точність оцінки	+	–	+	+	+	–
Ефективність (коректність)						
відображення реальних процесів у ПЛЕ	+	–	+	+	–	–
Урахування окремих чинників	–	–	+	–	+	–

Нами введено показник W , як характеристику загального стану процесів у ПЛЕ та індекси ступеня антропогенної трансформації, запропоновані Гончаренком [8]. ITG – нормоване співвідношення кількості геофітів і терофітів у видовому складі, має діапазон значень $[-1;1]$. ISR – співвідношення у видовому складі кількості видів (або частки, %) стрес-толерантної (S) та рудеральної (R) стратегії, діапазон значень $[-1;1]$. ICR – нормоване співвідношення віолентів та експлерентів у видовому складі [8], де T – терофіти, G – геофіти, S –патієнти, R –експлеренти, C – віоленти.

Запропоновано нормований показник P для відображення навантаження населення (та наслідків рекреації) на ПЛЕ, оскільки населення одночасно є і об'єктом впливу антропогенного навантаження, і одним з його факторів.

Для розрахунку індексу антропогенного навантаження ($J_{ан}$) на основі робіт [5, 6, 11, 16, 17] запропонована формула:

$$J_{ан} = (P \cdot W \cdot k) \cdot \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n J_i \quad (2)$$

де J_i – нормований базовий показник (табл. 2);

k –розмірний множник, $k=10$;

n – число параметрів, $n = 17$.

W – інтегрований показник вагомості впливу [20], враховує узагальнені показники стану ПЛЕ та тенденції змін.

2. Структура базових показників інтегрального оцінювання стану ПЛЕ

№ п/п	Назва	Умовні позначення
<i>Блок 1. Аерозабруднення</i>		
1	Концентрація фітотоксикантів (середньодобова, NO_2), mg/m^3	J1
2	Кількість автомобілів, приведених одиниць	J2
<i>Блок 2. Рекреаційне навантаження</i>		
3	Кількість несанкціонованих звалищ на одиницю площі ПЛЕ (шт.); кількість слідів вогнищ (шт.) *	J3
4	Коефіцієнт рекреації [7], ум. од.	J4
5	Наявність ерозії, кількість її видів на території парку, бали *	J5
<i>Блок 3. Зміни біотичної складової</i>		
6	Індекс стану паркових насаджень [4], ум. од. *	J6
7	Наявність підросту, підліску, бали *	J7
8	Індекс адвентизації [3], ум. од.	J8
9	Індекс оцінки біорізноманіття фітоценозу та авіфауни (Індекс Шеннона)	J9
10	Індекс синантропізації угруповань птахів, що гніздяться (Jedrzcowski; Клауснітцер, 1990)	J10

11	Таксономічний склад фітоценозу *	J11
	<i>Аналіз структури трав'яного ярусу</i>	
12	Співвідношення видів у родинях (<i>Asteraceae</i> + <i>Brassicaceae</i>) / <i>Rosaceae</i> [10]	J12
13	Співвідношення видів (фанерофіти+хамефіти) / терофіти [10]	J13
14	$ITG = (G - T) / (G + T)$ [8, с. 57]	J14
15	$ISR = (S - R) / (S + R)$ [8]	J15
16	$ICR = (C - R) / (C + R)$ [8] Похідний показник	J16
17	Інтегрований показник вагомості впливу (W)* [20]	J17

Примітка: * – показники, запропоновані нами вперше у якості базових показників

$$P = \frac{P_i}{P_{сер}}, \quad (3)$$

$$\text{де } P_i = \frac{\text{кількість населення району, чол.}}{S_1}, \text{ чол./га;} \quad (4)$$

$$P_{сер} = \frac{\text{кількість населення міста, чол.}}{S_2}, \text{ чол./га;} \quad (5)$$

S_1 – площа зелених насаджень району, га; S_2 – площа зелених насаджень міста, га.

Відмінність нашої формули від інших агрегаційних індексів [5, 6, 17] в тому, що додатково запропоновано коефіцієнти W , P , що враховують рівень реального рекреаційного навантаження на ПЛЕ та базові показники за трьома блоками, а також характеристики фітоценозу.

Наступним етапом обробки даних буде вирахування класового інтервалу за формулою [12]:

$$C = \frac{[(X_{\max} - X_{\min}) \cdot \lg 2]}{\lg N}, \quad (6)$$

де $X_{\max}$ – максимальне значення індексу антропогенного навантаження;

$X_{\min}$ – мінімальне значення індексу антропогенного навантаження;

N – об'єм вибірки, що відповідає числу значень індексу антропогенного навантаження у межах інтервалу (min÷max).

Статистична обробка, перевірка відповідності з нормальним розподілом, картування ПЛЕ м. Києва за рівнем антропогенного навантаження та згідно класових інтервалів індексу антропогенного навантаження ($J_{ан}$) є логічними стадіями завершення оцінювання ПЛЕ.

У діагностиці перехідних станів важливими є показники, які характеризують реакцію екосистеми на прямі і опосередковані, одиночні і комплексні, гострі і хронічні, тривалі і короткі (і т.п.) впливи антропогенних чинників. Тому розглянемо альтернативний підхід до оцінювання стану ПЛЕ,

що базується на показниках навантаження та відповіді екосистем на негативні дії чинників за трьома блоками:

Блок 1 (I_1). Аерозабруднення (NO_2 , як фітотоксикант, або інші забрудники, де $I_1 = C_i/\text{ГДК}$).

Блок 2 (I_2). Рекреаційне навантаження (показники рекреаційного впливу: частка вищипаного ґрунтового покриву; кількість несанкціонованих звалищ, слідів вогнищ, механічних пошкоджень рослин).

Блок 3 (I_3). Зміни біотичної складової (реакція екосистеми на вплив):

$$I_3 = \frac{I_c + I_{ad} + I_{зф} + I_{снт} + I_{макс}}{5}, \quad (7)$$

де I_c – індекс стану деревостану [4];

I_{ad} – індекс адвентивізації [3];

$I_{зф}$ – індекс геофітзації (частка геофітів у трав'яному ярусі) [8];

$I_{снт}$ – індекс синантропізації угруповань птахів, що гніздяться (Jedrzczykowski; Клауснітцер, 1990);

$I_{макс}$ – таксономічний склад фітоценозу (нормований до площі ПП).

Наступним етапом є оцінювання чинників довільних процесів дестабілізації і стабілізації стану ПЛЕ. Всі ці інформаційні показники ми пропонуємо згорнути в інтегральний індекс розвитку деградаційних процесів ($I_{дег}$) у ПЛЕ, який визначаємо за формулою (рис. 1):

$$I_{дег} = (I_1 + I_2 + I_3)/3. \quad (8)$$

Результати загального аналізу стану і змін в ПЛЕ можна подати у вигляді ризик-оцінки [14]:

$$Risk = R_n \cdot \ln(1 - R_n), R_n = \sum I_{дес} / \sum I_{рв}, \quad (9)$$

де $I_{дес}$ – сума причин (векторів впливу), т.б. кількість процесів дестабілізуючої дії на систему дослідження (J1–J5);

$I_{рв}$ – сума показників стану та відповідей екосистеми на дестабілізуючий вплив (J6–J17).

Масштабність деталізації оцінювання залежить від параметрів: цілісність (ємерджентність), ієрархічність об'єкта дослідження, складність структури і функцій, характеристик і підпорядкованості зв'язків між його елементами. У проведеному дослідженні передбачено початкову деталізацію оцінювання, а потім згортання інформації в інтегральні індекси ($J_{ан}$ – ф-ла 2; $I_{дег}$ – ф-ла 8; $Risk$ – ф-ли 9, 10). Вищий рівень оцінювання стану ПЛЕ розглядає їх як цілісну систему, не виділяючи її елементи і не встановлюючи зв'язки між ними (рис. 1).



Рис. 1. Блок-схема системи інтегрального оцінювання стану ПЛЕ в умовах комплексного антропогенного навантаження

Результатом оцінювання на основі запропонованої системи є кількісні показники, які можна використати як індикатори стану урбоєкосистем; отримана таким чином інформація про біорізноманіття може бути введена у базу даних за допомогою ГІС та візуалізована, для надання можливості покращення заходів зі збереження, підтримання, відновлення та охорони біорізноманіття. Далі можливий розрахунок порогових величин навантажень, прогнозування стану, картування джерел ризиків, моніторинг змін, а це, у свою чергу, дозволить виявити причини та наслідки цих змін або встановити чинники, що уповільнюють або прискорюють наближення екосистем до критичного стану.

Висновки і перспективи. Для кількісного інтегрального оцінювання стану ПЛЕ та біоіндикації антропогенного навантаження запропоновано застосування екосистемного і структурного підходів із включенням трьох векторів організації складних систем (структурно-функціональний, рівні організації живого, диференціація за екологічними нішами), з наступним аналізом ризику дестабілізації екосистем. Застосовано новий підхід до інтегрального оцінювання стану та рівня дестабілізації ПЛЕ в умовах антропогенного впливу за трьома блоками в три етапи. Запропоновано систему інтегрального оцінювання стану ПЛЕ в умовах комплексного антропогенного навантаження, що включає інтегральний індекс антропогенного навантаження (J_{an}) на основі 17 базових показників, Індекс розвитку деградаційних процесів, Індекс структурного різноманіття (H_{str}) модифікований, оцінка ризику для визначення напрямку деградаційних процесів та рівня дестабілізації паркових екосистем. Додатково

запроваджено коефіцієнти W , P , що враховують рівень реального рекреаційного навантаження на ПЛЕ та базові показники за трьома блоками, а також характеристики фітоценозу. Використання інтегрального та системного підходів може дати цікаву нову інформацію та поштовх до нових ідей та рішень. За допомогою інтегрального оцінювання надалі можливе раціональне природоохоронне зонування території, картографування з відображенням структури та векторів трансформації ПЛЕ для прийняття рішень щодо збереження та відновлення порушених екосистем, підтримання стабільності урбоекосистем великих міст.

References

1. Antomonov, M. Iu., Rusakova, L. T., Pashynska, S. L., Voloshchuk, O. V. (2014). Informatsiina tekhnolohiia konstruiuvannia intehralnykh otsinok v ekolohichnykh ta hiiienichnykh doslidzhenniakh. V kn. Aktualni pytannia zakhystu dovkillia ta zdorovia naselennia Ukrainy (rezultaty naukovykh rozrobok 2014 r.) [Information technology for the design of integrated assessments in environmental and hygienic research. In the book Topical issues of environmental protection and health of the population of Ukraine (results of scientific developments in 2014)], 391–430.
2. Bednova, O. V. (2012). Strukturnoye raznoobraziye lesnykh ekosistem kak indikator ikh narushennosti i osnova dlya prirodookhrannogo planirovaniya prostranstva gorodskikh OOPT [Structural diversity of forest ecosystems as an indicator of their disturbance and the basis for environmental protection planning of urban protected areas]. Lesnoy vestnik, 9, 16–29.
3. Burda, R. I. (2007). Rezystentnist pryrodno-zapovidnoho fondu do fito invazii [Resistance of the natural reserve fund to phytovasions]. Industrial botanist, 7, 11–21.
4. Didukh, Ya. P. (2014). Novyi pidkhid do otsinky stiiikosti ta ryzykiv vtraty ekosystem [A new approach to assessing the sustainability and risk of ecosystem losses]. References of the National Academy of Sciences of Ukraine, 8, 149–155.
5. Didukh, Ya. P. (2012). Fundamentals of bioindication. Nauk. dumka, 343.
6. Gelashvili, D. B., Basurov, V. A., Rozenberg, G. S.tain. (2003). Ekologicheskoye zonirovaniye territoriy s uchetom roli sokhranivshikhsya estestvennykh ekosistem (na primere Nizhegorodskoy oblasti) [Ecological zoning of territories, taking into account the role of the preserved natural ecosystems (on the example of the Nizhny Novgorod region)]. Volga ecological journal, 2, 99–108.
7. Gelashvili, D. B., Zaznobina, N. I. (2003). Otsenka antropogennoy nagruzki na administrativnyye rayony krupnogo promyshlennogo tsentra (na primere Nizhnego Novgoroda) [Estimation of anthropogenic load on administrative districts of a large industrial center (on the example of Nizhny Novgorod)]. Models and analysis of systems, 3, 13–24.
8. Gensiruk, S. A., Nizhnik, M. S., Voznyak, R.R. (1987). Rekreatsionnoye ispol'zovaniye lesov [Recreational use of forests]. Kyiv: Urozhay, 245.
9. Honcharenko, I.V. (2017). Fitoindykatsiia antropohennoho navantazhennia: monohrafiia [Phytindication of anthropogenic loading]. Dnipro, 127.
10. Vasenko, O.H., Rybalova, O.V., Artemjev, S.R. (2015). Intehralni ta kompleksni otsinky stanu navkolyshnoho pryrodnoho seredovyscha [Integral and integrated assessments of the state of the environment]. Kh: NUHZU, 419.
11. Kolomyts, E.G., Sharaya, L.S. (2013). Metody ischisleniya i kartografirovaniya ustoychivosti lesnykh ekosistem [Methods for calculating and mapping the sustainability of forest ecosystems]. News of the Russian Academy of Sciences. Geographical series, 6, 126–136.

12. Kostina, N. V. (2017). Integral'naya otsenka ustoychivogo razvitiya territoriy volzhskogo basseyna s primeneniym ekspertnoy informatsionnoy sistemy region [Integral assessment of the sustainable development of the Volga basin territories using the REGION expert information system]. Tol'yatti, 22.
13. Kostina, N. V., Rozenberg, G. S., Hasayev, G. R., SHlyakhtin, G. V. (2014). Statisticheskiy analiz indeksa razvitiya chelovecheskogo potentsiala (na primere Volzhskogo basseyna) [Statistical analysis of the human development index (on the example of the Volga basin)]. Izv. Sarat. un-tat. Ser. Chemistry, biology, ecology, 14 (3), 5–70.
14. Kozulia, T. V. (2012). Osoblyvosti otsinky yakosti navkolyshnoho seredovyscha i upravlinnia ekolohichnoiu bezpekoiu z pozytsii staloho rozvytku [Features of environmental quality assessment and environmental safety management from the point of view of sustainable development]. Kyiv, 40.
15. Mandel, I. D. (1988). Klasternyy analiz. Finansy i statistika [Cluster analysis. Moscow: Finance and Statistics], 176.
16. Miroshnyk, N. V., Tertychna, O. V., Teslenko, I. K. (2018). Suchasni metodychni pidkhody do otsiniuvannya stanu parkovykh lisovykh ekosystem [Modern methodological approaches to assessing the status of park forest ecosystems]. Factors of experimental evolution of organisms, 23, 308–315.
17. Miroshnyk, N. V., Teslenko, I. K. (2018). Pidkhody do intehralnogo otsiniuvannya antropohennoho navantazhennia na parkovi lisovi ekosystemy. U kn. «Florystychne i tsenotychne riznomanittia u vidnovlenni ta zberezheni roslynnoho svitu» [Approaches to Integral Assessment of the Complex Anthropogenic Load on Park Forest Ecosystems. Floristic and Coenotic Diversity in the Restoration, Protection and Conservation of the Plant World]. Kyiv: Publishing House Lira-K, 346–367.
18. Rybak, N. V. (2015). Integral'naya otsenka ekologicheskogo sostoyaniya urbanizirovannykh territoriy [Integral assessment of the ecological status of urban areas]. Scientific Bulletin of NLTU of Ukraine, 25.5, 135–145.
19. Voron, V.P., Lavrov, V.V., Bondaruk, M.A., Stelmakhova, T.F. (2011). Diahnostyka ta zonuvannya poshkodzhennia lisiv Ukrainy aerotekhnohennym zabrudnenniam (metodychni rekomendatsii). Monitorynh ta pidvyshchennia stiikosti antropohenno porushenykh lisiv [Diagnostics and zoning of damage of forests of Ukraine by aerotechnogenic pollution (methodical recommendations). Monitoring and increasing the stability of anthropogenically disturbed forests]. Kharkiv: Nove slovo, 113–165.
20. Zaytsev, G.N. (1990). Matematika v eksperimental'noy botanike [Mathematics in Experimental Botany]. Moscow: Nauka, 296.
21. Zaznobina, N.I. (2007). Otsenka ekologicheskoy obstanovki v krupnom promyshlennom tsentre po stepeni antropogennoy nagruzki s pomoshch'yu obobshchennoy funktsii zhelatel'nosti (na primere g. N. Novgoroda) [Assessment of the environmental situation in a large industrial center according to the degree of anthropogenic load using the generalized desirability function (using the example of N. Novgorod)]. Bulletin of Nizhny Novgorod University. N.I. Lobachevsky, 2, 115–118.
22. Bingkui, Qiu, Huilei, Li, Min, Zhou, Lu, Zhang (2015). Vulnerability of ecosystem services provisioning to urbanization: A case of China. Ecological Indicators, 57, 505–513. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.04.025>
23. Burkhard B., Santos-Martin F., Nedkov S., Maes J. (2018). An operational framework for integrated Mapping and Assessment of Ecosystems and their Services (MAES). One Ecosystem. 3: e22831. doi: <https://doi.org/10.3897/oneeco.3.e22831>
24. Buyvolova, A.Y., Trifonova, T.A., Bykova, E.P. (2018). Vegetation Indicators of Transformation in the Urban Forest Ecosystems of “Kuzminki-Lyublino” Park. In: I. Vasenev V., Dovletyarova E., Chen Z., Valentini R. (eds) Megacities 2050: Environmental

- Consequences of Urbanization. ICLASCSD 2016. Springer Geography. Springer, Cham. 118-124. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-319-70557-6_13
25. Choi, H.A., Song, C., Lee, W.K. et al. (2017). Integrated approaches for national ecosystem assessment in South Korea. *KSCE J Civ Eng.* 1–8. doi: [10.1007/s12205-017-1664-9](https://doi.org/10.1007/s12205-017-1664-9)
26. Graham, R.T., Quigley, T.M., Gravenmier, R. (2000). An Integrated Ecosystem Assessment of the Interior Columbia Basin. *Environ Monit Assessment*, 64 (1), 31–40. doi: <https://doi.org/10.1023/A:1006482232447>
27. Hill, M.O., Roy, D.B., Thompson, K. (2002). Hemeroby, urbanity and ruderality: bioindicators of disturbance and human impact. *Journal of Applied Ecology*. 39, 708–720. doi: [10.1046/j.1365-2664.2002.00746.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2664.2002.00746.x)
28. Ji-yuan, L., Watanabe, M., Tian-xiang, Y. et al. (2002). Integrated ecosystem assessment for western development of China. *J. Geogr. Sci.* 12 (2), 127–134. doi: <https://doi.org/10.1007/BF02837466>
29. Lontzek, T.S., Narita, D., Wilms, O. (2016). Stochastic Integrated Assessment of Ecosystem Tipping Risk. *Environ Resource Econ.* 65(33), 573–598. doi: <https://doi.org/10.1007/s10640-016-0054-y>
30. McDonough, K., Hutchinson, S., Moore, T., Hutchinson, J.M. S. (2017). Analysis of publication trends in ecosystem services research. *Ecosystem Services*. 25, 82–88. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoser.2017.03.022>
31. McPherson, E.G. (2006). Urban forestry in North America. *Renewable Res. J.* 4 (3), 8–12.
32. Mendelsohn, R., Rosenberg, N.J. (1994). Framework for Integrated Assessments of Global Warming Impacts. In: Frederick K.D., Rosenberg N.J. (eds) *Assessing the Impacts of Climate Change on Natural Resource Systems*. Springer, Dordrecht. 15–44. doi: https://doi.org/10.1007/978-94-011-0207-0_2
33. Mikhailova, T.A., Pleshanov, A.S., Afanasieva, L.V. (2011). Cartographic assessment of pollution of forest ecosystems on the Baikal natural territory by technogenic emissions. *Miting Adapt Strateg Glob Change*. 16, 247–266. doi: [10.1007/s11027-010-9254-x](https://doi.org/10.1007/s11027-010-9254-x)
34. Mill, W. (2000). Integrated Modelling of Acidification Effects to Forest Ecosystems – Model Sonox. In: Satake K. et al. (eds). *Acid rain 2000*, 1289–1294. Springer, Dordrecht. doi: https://doi.org/10.1007/978-94-007-0810-5_62
35. Muller, F. (2005). Indicating ecosystem and landscape organisation. *Ecological Indicators*. 5 (4), 280–294. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2005.03.017>
36. Nikolov, P., Bratanova-Doncheva, S. (2017). Mapping and assessment of urban ecosystem condition and services using integrated index of spatial structure. *One Ecosystem*. 2, e14499. doi: <https://doi.org/10.3897/oneeco.2.e14499>
37. Pártl, A., Vačkář, D., Loučková, B. et al. (2017). A spatial analysis of integrated risk: vulnerability of ecosystem services provisioning to different hazards in the Czech Republic. *Nat Hazards*. 89 (3), 1185–1204. doi: <https://doi.org/10.1007/s11069-017-3015-z>
38. Seidling, W. (2005). Outline and examples for integrated evaluations of data from the intensive (Level II) monitoring of forest ecosystems in Germany. *Eur J Forest Res.* 124 (4), 273–287. doi: <https://doi.org/10.1007/s10342-005-0083-5>
39. Venevsky, S.A. (2006). Method for Integrated Assessment of Vulnerability to Climate Change in Siberian Forests: Example of Larch Area. *Mitig Adapt Strat Glob Change*. 11 (1), 241–268. doi: <https://doi.org/10.1007/s11027-006-1024-4>
40. Veselkin, D.V., Galako, V.A., Vlasenko, V.E. et al. (2015). Relationship between the characteristics of the state of Scots pine trees and tree stands in a large industrial city. *Contemp. Probl. Ecol.* 8, 243.

41. Vogt, K.A., Gordon, J.C., Wargo, J.P. et al. (1997). Detecting Resistance and Resilience of Ecosystems. In: Ecosystems. Springer, New York, NY. 187–265. doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1908-8_4.

42. Xu, X., Xu, L., Yan, L. et al. (2015). Integrated regional ecological risk assessment of multi-ecosystems under multi-disasters: a case study of China Environ Earth Sci. Environmental Earth Sciences. 74 (1), 747–758. doi: <https://doi.org/10.1007/s12665-015-4079-2>.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИНТЕГРАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СОСТОЯНИЯ ПАРКОВЫХ ЛЕСНЫХ ЭКОСИСТЕМ ДЛЯ БИОИНДИКАЦИИ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКИ

Н. В. Мирошник, О. В. Тертичная, И. К. Тесленко

Аннотация. Приоритетным направлением современных экологических исследований является биоиндикационная оценка последствий антропогенной нагрузки для окружающей среды. Цель – усовершенствование методических основ интегрального оценивания состояния парковых лесных экосистем в условиях антропогенной нагрузки и определения направления процессов, в них происходящих. Разработана система интегрального оценивания состояния парковых экосистем, включающая расчет индекса антропогенной нагрузки на основе 17 базовых показателей, Индекса развития деградационных процессов, Индекса структурного разнообразия (модифицированного), оценку риска для определения направления процессов и уровня дестабилизации экосистем. Дополнительно введены коэффициенты W , P , учитывающие уровень реальной рекреационной нагрузки на парки и характеристики фитоценоза, как индикаторы состояния урбоэкосистем. Для интегрального оценивания состояния парков и биоиндикации антропогенной нагрузки предлагается применять экосистемный и структурный подходы с включением трех векторов организации сложных систем (структурно-функциональный, уровни организации живого, дифференциация по экологическим нишам) с последующим анализом риска дестабилизации экосистем. Применен новый подход к интегральному оцениванию состояния и уровня дестабилизации парков в условиях антропогенного воздействия по трем блокам. В дальнейшем возможно зонирование территории, картографирование с отражением структуры и векторов их трансформации для принятия решений относительно сохранения, восстановления и поддержания стабильности урбоэкосистем.

Ключевые слова: интегральные показатели; парковые лесные экосистемы; антропогенное воздействие; системный, структурный подходы

THE USE OF INTEGRAL INDICATORS OF THE CONDITION OF FOREST ECOSYSTEMS PARK FOR BIOINDICATION OF ANTHROPOGENIC LOAD

N. Miroshnyk, O. Tertychna, I. Teslenko

Abstract. *The priority direction of modern environmental research is bioindicating impact assessment of anthropogenic load on the environment. The purpose of the article is improvement of methodical bases of the integrated assessment of the state of forest ecosystems parks in conditions of anthropogenic load and determine the direction of processes in them. The developed system of integrated assessment of the condition of Park ecosystems, including the calculation of the index of anthropogenic load on the basis of 17 indicators, development Index of degradation processes, structural diversity Index (modified), a risk assessment to determine the direction of degradation processes and the level of destabilization ecosystems. Additionally introduced coefficient W , R , taking into account the real level of recreational pressure on parks and the characteristics of phytocenosis, as indicators of the state urbanocosystem. For integral estimation of the state parks and bioindication of anthropogenic load, one should apply ecosystemic and structural approaches with the inclusion of three vectors of the organization of complex systems (structural-functional organization, levels of organization of living, differentiation in ecological niches), with subsequent analysis of risk destabilization of ecosystems. Used a new approach to the integral estimation of the state and the level of destabilization of the parks in conditions of anthropogenic impact with three blocks. In the future possible a territorial zoning reflecting the structure of vectors and their transformation for decision-making concerning conservation, restoration and maintenance of stability of urbanoecosystem.*

Keywords: *integral indices; Park forest ecosystem; human impact; systemic, structural approaches.*

СТВОРЕННЯ СЕЛЕКЦІЙНО-ЦІННОГО МАТЕРІАЛУ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ ЗА УМОВ МУТАГЕННОГО ВПЛИВУ ЗАБРУДНЕНЬ ҐРУНТУ ПЕСТИЦИДАМИ І ТОКСИЧНИМИ ВІДХОДАМИ

Р. А. ЯКИМЧУК, кандидат біологічних наук,
доцент кафедри біології та методики її навчання
Уманський державний педагогічний університет імені Павла Тичини
E-mail: peoplenature16@gmail.com

Анотація. Успішне генетичне поліпшення сортів озимої пшениці можливе за використання нових джерел вихідного матеріалу. Постало питання ефективності застосування в селекційній практиці унікальних умов впливу техногенних мутагенних чинників навколишнього середовища. У роботі вивчено мутагенну активність хімічного забруднення ґрунту територій складування пестицидів і токсичних відходів та встановлено ефективність їх використання за створення селекційно-цінного матеріалу озимої пшениці. Концентрації сумарного вмісту токсичних речовин у ґрунті перевищували ГДК у 5–18350 разів. У поколіннях рослин M_2 – M_3 визначали частоту видимих мутацій та частку серед них селекційно-цінних. У кращих за господарськими характеристиками мутантів протягом трьох років вивчали врожайність. Встановлено, що забруднення ґрунту пестицидами і токсичними відходами чинить мутагенну дію, яка виявляється зростанням у 3,4–5,6 раза частоти видимих мутацій в озимій пшениці. Частка селекційно-цінних із них становить 24,5–60,0 %. Висока ймовірність успадкування господарсько-корисних ознак у комплексі з мутаціями, що знижують урожайність озимої пшениці, обмежує перспективність використання прямого добору продуктивних мутантних форм. Розширення генетичної різноманітності вихідного селекційного матеріалу за рахунок індукованого забруднення пестицидами і токсичними відходами мутагенезу створює перспективи для його використання з метою реалізації селекційно-генетичних програм поліпшення сортів пшениці.

Ключові слова: *Triticum aestivum* L., хімічні мутагени, видимі мутації, селекційно-цінні ознаки, продуктивні мутанти

Актуальність. Проблема підвищення врожайності та якості зерна озимої пшениці, її екологічної пластичності та стійкості до абіотичних і біотичних стресових чинників навколишнього середовища набуває неабиякої актуальності. Використання індукованого мутагенезу відкриває широкі можливості для прогресу селекції, кардинального генетичного поліпшення культурних рослин [3]. З огляду на це, виникла потреба у вивченні мутагенної активності хімічних чинників забруднення ґрунту територій сховищ пестицидів і токсичних відходів та встановленні

ефективності їх використання при створенні селекційно-цінного матеріалу озимої пшениці.

Аналіз останніх досліджень та публікацій. З метою збагачення геноплазми пшениці та створення сортів, які б об'єднували максимальну продуктивність зі здатністю протидії лімітуючим чинникам, необхідно постійно відшуковувати нові джерела мутагенного впливу на вихідний селекційний матеріал. Поруч із лазерними променями, опроміненням іонами азоту, вуглецю, використанням умов космічного простору постало питання ефективності застосування комплексу мутагенних чинників навколишнього середовища, що сформувалися на техногенно забруднених територіях. Зокрема, у результаті досліджень генетичних наслідків радіонуклідних забруднень у 30-кілометровій зоні відчуження Чорнобильської АЕС було одержано селекційно-цінні мутантні лінії озимої пшениці та створено на їх основі високопродуктивні, зимостійкі сорти сильних пшениць Царівна, Лісова пісня, Романтика, Відрада [1, 5].

Із хімічних чинників навколишнього середовища найвищою мутагенною активністю володіють пестициди і токсичні відходи. Ними забруднено площу на території України в кілька сотень тисяч гектарів [6]. За впливу отрутохімікатів підвищується рівень мутабільності рослин, тварин і людини, втрачається типовість сортів сільськогосподарських культур [4]. Однак, проблемі їх токсикологічної небезпеки на генетичному рівні та ефективності застосування в мутаційній селекції приділяється неналежна увага. Більшість досліджень зводяться в основному до моніторингу і визначення концентрації токсичних речовин у ґрунті, воді, продуктах харчування [7, 8]. Результати, одержані на різних об'єктах за вивчення наслідків мутагенного впливу низки засобів захисту рослин, показали, що багато з них індукують поліплоїдію та за своєю активністю не поступаються колхіцину [5], здатні змінювати імунологічний статус живих організмів, виявляти мутагенну й тератогенну дії [9].

Мета дослідження – вивчити мутагенну активність хімічних чинників забруднення ґрунту територій складування пестицидів і токсичних відходів та встановити ефективність їх використання за створення селекційно-цінного матеріалу озимої пшениці.

Матеріали і методи дослідження. Рослини озимої пшениці (*T. aestivum* L.) сортів Альбатрос одеський і Зимоярка вирощували протягом 2012–2013 рр. у таких місцях складування і зберігання заборонених чи непридатних до використання отрутохімікатів: с. Джурин Вінницької обл.; за 5 км від станції «Затишся» Одеської обл.; старий яблуневий сад Інституту зрошуваного садівництва ім. М.Ф. Сидоренка НААН України (м. Мелітополь); вапняковий кар'єр «Алестове» (с. Алестове Одеської обл.); полігон токсичних відходів ТОВ «Оріана Галев» м. Калуш. Концентрації сумарного вмісту токсичних речовин у ґрунті, залежно від досліджуваних об'єктів, перевищували ГДК у 5–18350 разів. За контроль взято територію дослідного господарства Інституту фізіології рослин і генетики НАН України (смт Глеваха, Київської обл.), де протягом багатьох років вивчається спонтанний рівень мутаційної мінливості озимої пшениці.

Рослини поколінь M_2 і M_3 вирощували чітко родинами, що давало можливість виявляти різні типи мутацій та здійснювати їх коректний облік.

Частоту і спектр мутантних форм визначали лише з покоління M_3 після перевірки успадкування змінених ознак за співвідношенням кількості родин із мутантними рослинами до вивчених родин покоління M_2 .

Кращі з точки зору господарського значення гомозиготні родини з M_2 та M_3 висівали в 2015 р. в розсаднику контрольного випробування на ділянках площею 10 м². Виділені мутантні форми з найбільш цінними господарськими характеристиками висівалися в триразовій повторності на ділянках розсадника попереднього випробування та вивчалися протягом 2016–2017 рр. У схемах посіву для порівняння продуктивності використовували стандарти – сорти озимої пшениці Ятрань 60 і Смуглянка.

Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали загальноприйнятими методами [2], достовірність різниці оцінювали за критерієм Ст'юдента.

Результати дослідження та їх обговорення. Залишкові кількості пестицидів у ґрунті сховища в межах с. Джурин спричиняли зростання частоти видимих мутацій порівняно з показниками контролю (0,99 %) у 5,4 раза (табл. 1). Свідченням проникнення отрутохімікатів за межі території сховищ є підвищений рівень мутаційної мінливості рослин сорту Зимоярка, вирощених у їх санітарній зоні. Частота видимих мутацій статистично достовірно перевищувала показники контролю (0,77 %) в 3,4–5 разів і становила відповідно 2,58 % і 3,83 % для санітарних зон сховищ у с. Джурин і біля станції «Затишшя».

1. Частота мутацій в озимій пшениці (M_2 – M_3), вирощеної в умовах забруднення ґрунту пестицидами й токсичними відходами

Місце відбору зразків	Кількість вивчених родин, шт.	Кількість мутантних родин, шт.	Частота мутантних родин, %	Частота селекційно-цінних мутацій, %	Частка селекційно-цінних мутацій, %
Альбатрос одеський					
сmt Глеваха (контроль)	506	5	0,99 ± 0,44	0,60 ± 0,34	37,50 ± 2,15
Сховище, с. Джурин	523	28	5,35 ± 0,98*	2,48 ± 0,68*	24,48 ± 1,88*
Полігон ТОВ «Оріана Галев» м. Калуш	490	27	5,51 ± 1,03*	3,88 ± 0,87*	38,04 ± 2,19
Рекультивована ділянка полігону ТОВ «Оріана Галев» м. Калуш	512	17	3,32 ± 0,79*	2,56 ± 0,70*	35,21 ± 2,11
сmt Глеваха (контроль)	494	4	0,81 ± 0,40	0,20 ± 0,20	19,80 ± 1,79
Яблуневий сад м. Мелітополь	259	8	3,09 ± 1,08*	1,95 ± 0,86*	26,50 ± 2,74*
Зимоярка					
сmt Глеваха (контроль)	522	4	0,77 ± 0,38	0,38 ± 0,27	40,00 ± 2,14

Яблуневий сад м. Мелітополь	400	12	3,00 ± 0,85*	2,50 ± 0,78*	40,00 ± 2,45
Вапняковий кар'єр «Алтестове»	503	16	3,18 ± 0,78*	2,79 ± 0,73*	43,80 ± 2,21
Санітарна зона сховища с. Джурин	194	5	2,58 ± 1,14	3,10 ± 1,24	59,96 ± 3,52*
Санітарна зона сховища біля ст. «Затишшя»	287	9	3,83 ± 1,13*	3,50 ± 1,09*	43,48 ± 5,32

Примітка: * – різниця відносно контролю статистично достовірна за $P < 0,05$

Рівень видимих мутацій у рослин M_2 – M_3 сортів Альбатрос одеський і Зимоярка, що зазнали в поколінні M_1 впливу забруднень пестицидами ґрунту яблунєвого саду (м. Мелітополь), перевищував контрольні показники (0,81% та 0,77 %) у 3,8 та 3,9 раза, становлячи відповідно 3,09 % і 3,00 %. Мутації виявлено і в рослин, вирощених на території кар'єру «Алтестове». Так, в озимій пшениці поколінь M_2 – M_3 сорту Зимоярка помічено істотне зростання частоти видимих мутацій, що перевищувала їх рівень у контролі у 4,1 раза та становила 3,18 %.

За вивчення мутагенної активності забруднень гексахлорбензолом ґрунту полігону токсичних відходів ТОВ «Оріана Галев» та його рекультивованої ділянки встановлено, що частота видимих мутацій у поколіннях M_2 – M_3 рослин озимій пшениці сорту Альбатрос одеський статистично достовірно перевищувала контрольний рівень. Так, за умов вирощування рослин на території зберігання токсичних відходів, частота мутацій становила 5,51 %, що в 5,6 раза перевищувало контрольні показники. Залишки гексахлорбензолу в ґрунті рекультивованої ділянки сховища продовжують зберігати мутагенні властивості, про що свідчить високий рівень (3,32 %) видимих мутацій, який перевищував контрольні показники у 3,4 раза. І хоча частота видимих мутацій, виявлених за умов впливу хімічного забруднення ґрунту рекультивованої ділянки, була меншою від індукованих впливом забруднень ґрунту території захоронення гексахлорбензолу, однак статистично достовірної різниці не відзначено.

З огляду на зростання частоти мутацій, індукованих забрудненням пестицидами і токсичними відходами, створюються передумови для результативного пошуку серед них селекційно-цінних, до яких можна віднести стійкість до несприятливих умов середовища, хвороб і шкідників, низькорослість, підвищені показники елементів продуктивності та врожайності, високі якості зерна і хліба, підвищену кількість білка і незамінних амінокислот, високі адаптивні властивості тощо. Загалом, рівень господарсько-корисних мутацій за умов впливу забруднень ґрунту хімічними мутагенними чинниками становив 1,95–3,88 % для сорту Альбатрос одеський та 2,50–3,50 % для сорту Зимоярка, що перевищує показники контролю відповідно у 4,1–9,8 та 6,6–9,2 раза (див. табл. 1). Серед них переважно зустрічались форми низькорослі, з інтенсивними темпами відростання, довгим та щільним колосом. Окремі типи мутацій – напівкарлики і карлики – з'являлись лише у рослин сорту Альбатрос одеський за умов впливу забруднень гексахлорбензолом та ДДТ ґрунту територій сховища ТОВ «Оріана Галев», його рекультивованої ділянки і

яблуневого саду м. Мелітополь. Мутація, що пришвидшувала строки дозрівання зерна пшениці, була викликана у рослин сорту Альбатрос одеський дією пестицидів ґрунту сховища с. Джурин і залишків гексахлорбензолу рекультивованої ділянки сховища ТОВ «Оріана Галев». Мутанти за ознакою ранньостиглості сорту Зимоярка індуковані внаслідок хронічного впливу забруднень ґрунту ДДТ території вапнякового кар'єру «Алтестове» та сумішшю пестицидів санітарної зони сховища біля станції «Затишшя». Мутація циліндричний колос за дії хімічних забруднень на усіх досліджуваних об'єктах виявилась типовою для рослин сорту Альбатрос одеський, однак її поява у рослин сорту Зимоярка була характерною лише за умов хронічної дії пестицидів на територіях яблуневого саду м. Мелітополь і санітарної зони сховища біля станції «Затишшя».

Зростання ж частки селекційно-цінних мутацій помічено за умов впливу забруднень пестицидами в межах санітарної зони сховища с. Джурин та яблуневого саду м. Мелітополь. Рівень таких мутацій становив для сорту Альбатрос одеський 26,50 % і для сорту Зимоярка 59,96 %, що відповідно в 1,3 та 1,5 раза перевищувало контрольні показники. Низка мутантів виявляли комплекс селекційно-цінних спадкових змін: низькоросла з циліндричним колосом, напівкарлик з щільним, циліндричним колосом, середньорання з циліндричним колосом сорту Альбатрос одеський та низькоросла з щільним колосом, форми з інтенсивним ростом і ранніми/середньоранніми строками дозрівання, середньорання з довгим колосом сорту Зимоярка. Проте в переважній більшості випадків мутантні форми поєднували господарсько-корисні ознаки з мутаціями, що не представляють селекційної цінності, чи навпаки, ускладнювали проведення з ними подальшої селекційної роботи. Зокрема, у рослин озимої пшениці мутацію інтенсивний темп відростання часто супроводжували ознаки високорослості та нещільний колос; мутації низькорослості і карликовості виявлялась сумісно з пізньостиглістю та скверхедним колосом; зразки з довгим колосом характеризувались одночасно нещільним розміщенням у ньому колосків чи скверхедною формою; комплекс мутацій ранньостиглості, щільний, циліндричний колос водночас супроводжувала така спадкова зміна, як високорослість.

Урожайність більшості відібраних мутантів, що вивчались за їх вирощування у розсадниках контрольного і попереднього випробувань, коливалась в межах показників вихідного сорту та стандарту. Середня врожайність мутантних зразків озимої пшениці сорту Альбатрос одеський за роки досліджень варіювала від 74,4 ц/га (№ 5565 – сховище с. Джурин) до 79,2 ц/га (№ 5567 – полігон ТОВ «Оріана Галев» м. Калуш) (табл. 2), що становить різницю у порівнянні з вихідною формою (78,4 ц/га) та стандартами (76,6 ц/га) відповідно $-4,0$ – $+0,8$ ц/га ($-5,1$ – $+1,0$ %) і $-2,2$ – $+2,6$ ц/га ($-2,9$ – $+3,4$ %). Врожайність продуктивних форм варіювала за роками та залежала від погодних умов. Серед вивчених продуктивних мутантів виділено зразки, врожайність яких зберігалася на рівні вихідного сорту або перевищувала його в окремі роки: № 5559 (яблуневий сад м. Мелітополь), № 5567, № 5568 (полігон токсичних відходів ТОВ «Оріана Галев» м. Калуш), № 5569 (рекультивована ділянка полігону ТОВ «Оріана Галев» м. Калуш), та водночас перевищувала врожайність стандарту на $0,9$ – $2,6$ ц/га ($1,2$ – $3,4$ %).

Середня врожайність виділених за господарсько-корисними характеристиками мутантів сорту Зимоярка становила 70,9–72,9 ц/га, що відрізняє її від врожайності вихідного сорту (71,7 ц/га) і стандарту (76,6 ц/га) відповідно на –0,8–+1,2 ц/га (–1,1–+1,7 %) та –5,7– –3,7 ц/га (–7,4–.–4,8 %). Високою середньою врожайністю (72,9 ц/га), що перевищувала на 1,2 ц/га (1,7 %) врожайність у вихідного сорту, характеризувався мутантний зразок № 5589 (санітарна зона сховища біля станції «Затишшя»), однак в окремі роки за продуктивністю він значно поступався стандарту.

2. Показники врожайності продуктивних мутантів М₄–М₆ озимої пшениці, індукованих техногенним забрудненням навколишнього середовища (контрольне і попереднє випробування)

Польовий номер 2017 р.	Місце відбору зразків	Врожайність, ц/га				Відмінність від вихідної форми, ц/га	Відмінність від стандарту, ц/г
		2015 р.	2016 р.	2017 р.	Середня за три роки		
1888/16	Ятрань 60 (стандарт)	92,3	64,3	–	76,6	–1,8	–
5596	Смуглянка (стандарт)	–	–	73,2*	76,6	–1,8	–
5556	Альбатрос одеський (вихідний сорт)	90,2	66,2	78,8	78,4	–	+1,8
5559	Яблуневий сад м. Мелітополь	88,0	66,6	78,0	77,5	–0,9	+0,9
5564	Сховище пестицидів с. Джурин	84,0*	64,3	75,5*	74,6	–3,8	–2,0
5565	Сховище пестицидів с. Джурин	86,0*	62,8*	74,4*	74,4	–4,0	–2,2
5566	Полігон ТОВ «Оріана Галев» м. Калуш	93,6*	60,0*	73,7*	75,8	–2,6	–0,8
5567	Полігон ТОВ «Оріана Галев» м. Калуш	95,8*	64,5	77,4	79,2	+0,8	+2,6
5568	Полігон ТОВ «Оріана Галев» м. Калуш	93,0	64,1	77,4	78,2	–0,2	+1,6
5569	Рекультивована ділянка полігону ТОВ «Оріана Галев» м. Калуш	95,0*	64,6	77,4	79,0	+0,6	+2,4
5570	Рекультивована ділянка полігону ТОВ «Оріана Галев» м. Калуш	85,0*	64,5	80,0	76,5	–1,9	–0,1
	m %	1,1	1,1	0,6	–	–	–
	HCP _{0,05}	3,0	2,2	1,5	–	–	–
1888/16	Ятрань 60 (стандарт)	92,3*	64,3	–	76,6	+4,9	–
5596	Смуглянка (стандарт)	–	–	73,2	76,6	+4,9	–
5574	Зимоярка	77,6	64,0	73,4	71,7	–	–4,9

	(вихідний сорт)						
5588	Вапняковий кар'єр «Алтестове»	77,0	65,1	70,5*	70,9	-0,8	-5,7
5589	Санітарна зона схо- вища ст. «Затишшя»	80,7	67,2	70,8*	72,9	+1,2	-3,7
m %		3,0	0,8	0,8	—	—	—
HCP _{0,05}		11,3	3,5	2,4	—	—	—

Примітка: * – різниця відносно вихідного сорту статистично достовірна за $P < 0,05$

Висновки і перспективи. Забруднення ґрунту пестицидами і токсичними відходами чинить мутагенну дію, яка виявляється зростанням у 3,4–5,6 раза частоти видимих мутацій в озимій пшениці. Спектр їх типів містить селекційно-цінні, частка яких становить 24,5–60,0 %. Висока ймовірність успадкування господарсько-корисних ознак у комплексі з мутаціями, що знижують врожайність озимій пшениці, обмежує перспективність використання прямого добору продуктивних мутантних форм виключно за виявленими господарсько-корисними ознаками. Розширення генетичної різноманітності вихідного селекційного матеріалу за рахунок індукованого забруднення пестицидами і токсичними відходами мутагенезу створює перспективи для його використання з метою реалізації селекційно-генетичних програм поліпшення сортів пшениці.

References

1. Burdeniuk-Tarasevych, L. A., Lozinskyi, M. V., Dubova, O. A. (2015). Osoblyvosti formuvannia dovzhyny stebila u selektsiinykh nomeriv pshenytsi ozymoi zalezno vid yikh henotypiv ta umov vyroshchuvannia [Features of the formation of stem length in selection numbers of winter wheat, depending on their genotypes and conditions of cultivation]. *Agrobiology*, 1, 11–15.
2. Dospheov, B. A. (1985). Metodika polevogo opyita (s osnovami statisticheskoy obrabotki rezultatov issledovaniya) [Methodology of field experience (with the basics of statistical processing of research results)]. Moscow: Kolos, 351.
3. Kenzhebaeva, S. S., Doktyrbay, G., Atabaeva, S. D., Alyibaeva, R. A., Dagarova Sh. S., Eltaeva, M. E., Hasen, G. N. (2014). Vysokomolekulyarnyye sub'edinityy glyuteninau M₄ liniy yarovoy pshenitsyi – donorov vyisokogo soderzhaniya belka v zerne i produktivnosti [High-molecular subunits of glutenin in M₄ lines of spring wheat - donors of high protein content in grain and productivity]. *Bulletin of the Kazakh National University. Biological series*, 60 (1–2), 247–250.
4. Morgun, V. V., Logvinenko, V. F. (1995). Mutatsionnaya selektsiya pshenitsyi [Mutational selection of wheat]. Kyiv: Naukova dumka, 624.
5. Morhun, V. V., Yakymchuk, R. A. (2010). Henetychni naslidky avarii na Chornobylskii AES [Genetic consequences of accident of the Chernobyl NPP]. Kyiv: Lohos, 400.
6. Patyka, V. P., Makarenko, N. A., Mokliachuk, L. I., Sereda, L. P., Shkatula, Yu. M., Hrynyk, I. V. (2005). Ahroekolohichna otsinka mineralnykh dobryv ta pestytsydiv [Agroecological assessment of mineral fertilizers and pesticides]. Kyiv: Osnova, 300.
7. Petruk, R. V., Petruk, V. H., Bereziuk, A. P. (2013). Ekolohichna bezpeka skladiv i skhovyshch otrutokhimikativ i vidnovlennia zemel navkolo nykh [Environmental safety of warehouses and repositories of pesticides and restoration of land around them]. *Bulletin of the Kremenchug National University named after Mikhail Ostrogradsky*, 3, 197–202.

8. Shvyd, S. F., Shvyd, L. M., Natalochka, V. O., Tkachenko, S. K. (2010). Dynamika zalyshkovykh kontsentratsii pestytsydiv u gruntakh Poltavskoi oblasti [Dynamics of litter concentrations of pesticides and soils of the Poltava region]. Bulletin of the Poltava State Agrarian Academy, 3, 26–31.

9. Nag, Sh., Jain, A. K., Dhanya, M. S. (2014). Mutagenic effect in vegetables by pesticides. Environmental Sustainability: Concepts, Principles, Evidences and Innovations. Published by Excellent Publishing House: New Delhi, 338–343.

СОЗДАНИЕ СЕЛЕКЦИОННО-ЦЕННОГО МАТЕРИАЛА ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ В УСЛОВИЯХ МУТАГЕННОГО ВЛИЯНИЯ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПОЧВЫ ПЕСТИЦИДАМИ И ТОКСИЧНЫМИ ОТХОДАМИ

Р. А. Якимчук

Аннотация. Успешное генетическое улучшение сортов озимой пшеницы возможно при использовании новых источников исходного материала. Возник вопрос эффективности применения в селекционной практике уникальных условий воздействия техногенных мутагенных факторов окружающей среды. В работе изучена мутагенная активность химического загрязнения почвы территорий складирования пестицидов и токсичных отходов и установлена эффективность их использования при создании селекционно-ценного материала озимой пшеницы. Концентрации суммарного содержания токсичных веществ в почве превышали ПДК в 5–18350 раз. В поколениях растений М₂–М₃ определяли частоту видимых мутаций и долю среди них селекционно-ценных. В мутантов с лучшими хозяйственными характеристиками в течение трех лет изучали урожайность. Установлено, что загрязнение почвы пестицидами и токсичными отходами оказывает мутагенное действие, которое проявляется возрастанием в 3,4–5,6 раза частоты видимых мутаций у озимой пшеницы. Доля селекционно-ценных из них составляет 24,5–60,0 %. Высокая вероятность наследования хозяйственно-полезных признаков в комплексе с мутациями, снижающими урожайность озимой пшеницы, ограничивает перспективность использования прямого отбора продуктивных мутантных форм. Расширение генетического разнообразия исходного селекционного материала за счет индуцированного загрязнением пестицидами и токсичными отходами мутагенеза создает перспективы для его использования с целью реализации селекционно-генетических программ улучшения сортов пшеницы.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., химические мутагены, видимые мутации, селекционно-ценные признаки, продуктивные мутанты

DEVELOPMENT OF BREEDING-VALUABLE MATERIAL OF WINTER WHEAT UNDER MUTAGENIC EFFECT OF SOIL CONTAMINATION WITH PESTICIDES AND TOXIC WASTES

R. A. Yakymchuk

Abstract. Successful genetic improvement of winter wheat cultivars is impossible when new sources of parent material are used. The issue of the efficiency in the use of unique conditions of the effect of the environmental techno-genic mutagenic factors in breeding practice becomes relevant. Mutagenic activity of soil chemical contamination in the territories of pesticide and toxic waste warehousing was studied in the work and the efficiency of their use while developing breeding-valuable material of winter wheat was established. The concentrations of total toxic substance content in the soil exceeded MPC by 5–18350 times. Frequency of visible mutations and the share of breeding-valuable ones were identified in plants of M2–M3 generations. Yield capacity of the best mutants, as to their economic features, has been studied for three years. It has been found out that soil contamination with pesticides and toxic waste produces mutagenic effect which results in the increase of visible mutation frequency of winter wheat by 3.4–5.6 times. The share of breeding-valuable mutations is 24.5–60.0 %. A high probability of inheriting economic-useful traits in combination with mutations, which reduce winter wheat yield capacity, limits a promising potential of the use of direct selection of productive mutant forms. The expansion of genetic diversity of parent breeding material due to mutagenesis, induced by the contamination with pesticides and toxic waste, creates favorable conditions for its use in hybridization aimed at the implementation of a breeding-genetic program of the improvement of winter wheat cultivars.

Keywords: *Triticum aestivum* L., chemical mutagens, visible mutations, breeding-valuable traits, productive mutants

МОДИФІКАЦІЯ ТРАНСДЮСЕРНОЇ ПОВЕРХНІ БІОСЕНСОРУ НА ОСНОВІ ППР ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ЛЕЙКОЗУ ВРХ

М. Ф. СТАРОДУБ, доктор біологічних наук, професор, завідувач кафедри молекулярної біології, мікробіології та біобезпеки

М. І. ФЕДЕЛЕШ-ГЛАДИНЕЦЬ, кандидат сільськогосподарських наук, доцент кафедри молекулярної біології, мікробіології та біобезпеки

М. В. САВЧУК, науковий співробітник

О. П. ТАРАН, кандидат біологічних наук, завідувач лабораторії біосенсорики кафедри молекулярної біології, мікробіології та біобезпеки

**Національний університет біоресурсів і природокористування
України**

E-mail: nfstarodub@gmail.com

Анотація. Лейкоз ВРХ – широко розповсюджена хронічна хвороба пухлинної природи, що протікає безсимптомно або характеризується лімфоцитозом і ростом лімфоїдних клітин в різних органах тварин. Така хвороба приносить величезні збитки в сільськогосподарських господарствах. Основним заходом для подолання цієї хвороби є вчасна діагностика і своєчасне вибраковування хворих тварин на основі даних діагностики. Загальноприйнятими методами діагностики лейкозу ВРХ є методи РІД та ІФА. Однак ці методи являються довготривалими та потребують досліджень в лабораторії, кваліфікованого персоналу. Тому на даний час актуальним є розробка нових приладів для експрес-діагностики стану тварин в польових умовах.

Метою роботи було відпрацювати основні підходи функціоналізації трансдюсерних поверхонь для підвищення сигналу біосенсору для діагностики лейкозу ВРХ. В роботі використовували імунологічні та статистичні методи досліджень. Порівнянням сигналів біосенсора на основі ППР після його функціоналізації рекомбінантними антигенами gr51 та p24 встановлено, що створення на поверхні трансдюсера проміжного шару взагалі, а особливо за використання для цього ПАА (порівняно з додекантіолом) дозволяє не лише збільшити відгук, а й досягти його необхідної відтворюваності впродовж принаймні 4-х місяців. Похідні декстрану також збільшують відгук біосенсора, але не забезпечують його стабільності при зберіганні функціоналізованої поверхні.

Ключові слова: біосенсор, лейкоз великої рогатої худоби, трансдюсер, антиген, додекантіол, декстран, поліаліламін

Актуальність. Лейкоз – це пухлинне захворювання гемолімфопоетичної системи, що характеризується злоякісним розростанням кровотворних тканин, порушенням процесу визрівання клітин з переважно інтенсивним утворенням молодих форм [1, с. 3-8]. На лейкоз хворіють усі види ссавців, птахи, риби. Особливо широко він розповсюджений серед великої рогатої худоби (ВРХ), що

zareєстровано в багатьох країнах на всіх континентах. Є відомості про те, що до лейкозу тварин чутливі і люди. Особливістю захворювання є довготривалий перебіг хвороби без помітних порушень у стані здоров'я тварин [2, с. 18-19].

Важливою світовою проблемою є експресний контроль розповсюдження ретровірусної інфекції серед людей та тварин. Як відомо, ретровіруси є збудниками набутого імунodefіциту у людей, що відомий як захворювання на СНІД; вони, зокрема, є також збудниками вірусного лейкозу великої рогатої худоби, вірусних хвороб риб, наприклад, карциноми у щуки тощо [3, с. 62]. Що стосується захворювань, обумовлених ретровірусною інфекцією то основним заходом для його подолання є постійна діагностика. У випадку з тваринами хворі особини виключаються з гурту та знищуються. Зважаючи на це, особлива увага приділяється засобам діагностики. Загальноприйнятим способом виявлення цього захворювання є використання традиційного імунферментного аналізу, відомого, як метод ELISA-метод [4, с. 88-92]. Для аналізу використовують, як правило, проби крові, що забирають з шийної вени. Але сам метод є довготривалим (час аналізу займає близько 6 годин), коштовним (вартість одного аналізу більше 5 доларів США), досить складним, вимагає високої професійної підготовки виконавців та спеціального високовартісного обладнання і реагентів (різних "кон'югатів", хімічних компонентів). В Україні застосовується більш дешевий, але менш чутливий і ще більш рутинний метод – реакція імунодифузії (РІД). Все це не дає змоги вести постійний моніторинг за станом тварин, а ефективне оздоровлення стада вимагає проводити обстеження принаймні через кожні 10 днів за виявлення в ньому хворих тварин. Існуючими методами це неможливо здійснити як через досить значну вартість аналізу, так і через складність такого частого взяття проб крові. Усі ці проблеми успішно вирішуються у разі застосування запропонованого для розробки імунного біосенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу (ППР). Такий імунний біосенсор може забезпечити: 1) прямий аналіз, без використання додаткових реагентів; 2) експресний аналіз протягом 3-5 хвилин; 3) аналіз без взяття крові, а використовуючи краплину молока; 4) дешевий аналіз, вартістю менше 1 долара США [5, с.144-149]. Імунні біосенсиори на основі ППР вже запропоновано для окремих клінічних досліджень, але ці варіанти, по-перше, не придатні для широкого застосування, зокрема для експрес-аналізів в польових умовах, коли потрібно проводити аналізи за короткий час і забезпечити їх невисоку вартість, а по-друге, вони не спрямовані на діагностику ретровірусного лейкозу тварин. На базі таких сенсорів можливо створити нові системи експрес-діагностики вірусних захворювань, які будуть конкурентоспроможні на світовому ринку [5, с. 144-149; 6, с.1-4; 7, 307-316].

Мета досліджень – відпрацювати основні підходи функціоналізації трансдюсерних поверхонь для підвищення сигналу біосенсору для діагностики лейкозу ВРХ.

Матеріали і методи досліджень. Рекомбінантні антигени (gp51 та р24) були отримано від фірми „Діапрофмед”. Виміри взаємодії антигена з антитілами в досліджуваних пробах здійснювали за допомогою приладу на основі ППР, що розроблено в Інституті кібернетики ім. В.М. Глушкова НАН України. Для модифікації поверхні трансдюсера використовували додекантіол та поліелектроліти. Хімічну сорбцію додекантіолу

($\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$) проводили зануренням щойно виготовленої пластинки з нанесеним шаром золота в 1 мМ розчин етанолу при кімнатній температурі на 15 годин, після чого промивали чистим етанолом і висушували в потоці повітря. Поліелектролітна нерозчинна плівка на золотій поверхні формувалась з використанням поліаліламіну гідрохлориду (ПАА). Поліелектроліт використовували в концентрації 1 мг/мл. Час експозиції розчину 30 хвилин при кімнатній температурі. Поверхню промивали дистильованою водою. У випадку використання декстрану сульфату (5 kDa) його розчин в 1 мМ трис HCl буфері, рН 4.0 при концентрації 2 мг/мл наносили на поверхню і витримували там 25 хвилин, а потім поверхню промивали буфером.

Результати досліджень. Важливою вимогою до роботи біосенсора є стабільність і відтворюваність результатів. Тому одним з основних завдань, які повинні бути вирішені на шляху впровадження в практику розробленого нами біосенсорного методу діагностики ретровірусного лейкозу великої рогатої худоби (ВРХ) є забезпечення ефективної стандартизованої іммобілізації біологічного матеріалу та оптимізація функціональних параметрів ППР біосенсору.

Показано, що при адсорбції обох рекомбінантних антигенів (gr51 та r24) на поверхні перетворювача, вкритій шаром додекантіолу або поліелектроліту поліаліламіну (ПАА), не руйнується за промивання вимірювальної комірки ЗФР. Зміна резонансного кута коливалась в межах 1200-1500 кутових секунд. Разом з тим, показано, що в разі використання ПАА кількість антигену r24, сорбованого на поверхні була дещо більшою порівняно з необробленою поверхнею. Привертає увагу те, що у випадку антигену gr51 різниця між цими поверхнями відсутня. Кількість цього антигену, сорбованого на поверхні, вкритої шаром додекантіолу, по відношенню до непокритої поверхні, значно зменшується. Аналогічна ситуація спостерігалась і для поверхонь, вкритих ПАА та додекантіолом, виявлено, що в останньому випадку іммобілізація антигену gr51 відбувається зі значно меншою інтенсивністю, ніж на ПАА (рис. 1).

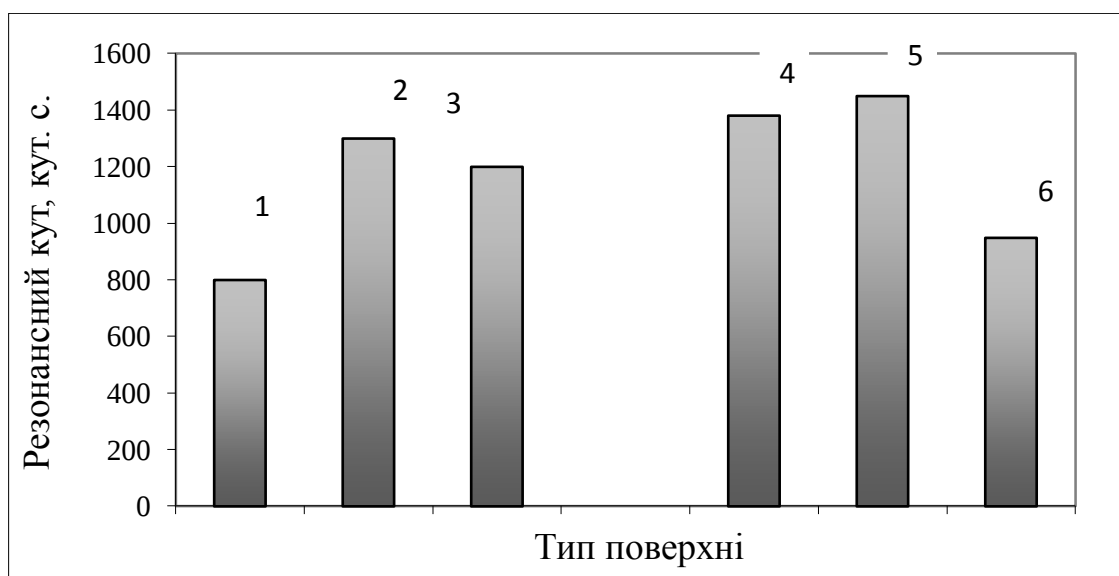


Рис. 1. Зміни резонансного кута при іммобілізації антигенів gr51 та r24 на різних типах поверхонь: 1,4 – необроблена поверхня; 2,

**5 – поверхня з шаром ПАА; 3, 6 – поверхня з шаром додекантіолу;
1-3 – антиген р24; 4-5 – антиген гр51**

Майже у відповідності з кількістю попередньо іммобілізованого антигену спостерігались зміни відгуку імунного біосенсора при взаємодії із сироватками хворих тварин, що попередньо були діагностуванні в реакції імунодифузії чи імуноферментного аналізу (рис. 2). Виходячи з отриманих результатів можна зробити висновок, що в разі використання антигену р24 попередня обробка поверхні ПАА, або ж додекантіолом є такою, що може бути використана при наступному безпосередньому проведенні аналізу. Що ж до антигену гр51 то тут підходящими є необроблена поверхня, а також та, яка має шар ПАА.

Обробка поверхні 1 % розчином БСА після сорбції антигену не вносить суттєвих змін у величину резонансного кута, що реєструється. Це, на нашу думку, означає, що на поверхні практично не залишались вільні місця зв'язування, а концентрація антигену була достатньою для створення максимально щільного шару.

Наступним етапом було абсорбція антигенів на поверхню, вкриту сульфатом декстрану. Така модифікація поверхні при використанні антигену р24 дозволяє підвищити як рівень резонансного кута, так і відповідно відгук імунного біосенсора майже в 2 рази порівняно з невідкритою поверхнею. В разі використання антигену гр51 ця різниця складає лише 20-30 %. Така ж різниця виявлена і по відношенню поверхонь, вкритих сульфатом декстрану та ПАА, коли використовували антиген р24 (рис. 3). Більша ефективність іммобілізації антигенів на поверхні, вкритій декстраном сульфату, в порівнянні з тим, коли на ній були присутні шари ПАА та додекантіолу, пов'язана з тим, що він формує розгалужений в просторовому відношенні шар, збільшуючи об'єм для сорбції антигену. Але використання декстрану сульфату, зважаючи на його кошовність та той незначний його внесок у відгук імунного біосенсора, на нашу думку не є перспективним і тому ми виключили в подальшому його з експериментальної роботи. Крім того, в наших експериментах поверхні, покриті декстраном сульфатом, не зберігали протягом довгого часу функціональної стабільності. На жаль, причина цього явища залишається невідомою і потребує подальших досліджень. Можливо, це пов'язано з якістю використовуваного нами препарату або ж з іншими причинами.

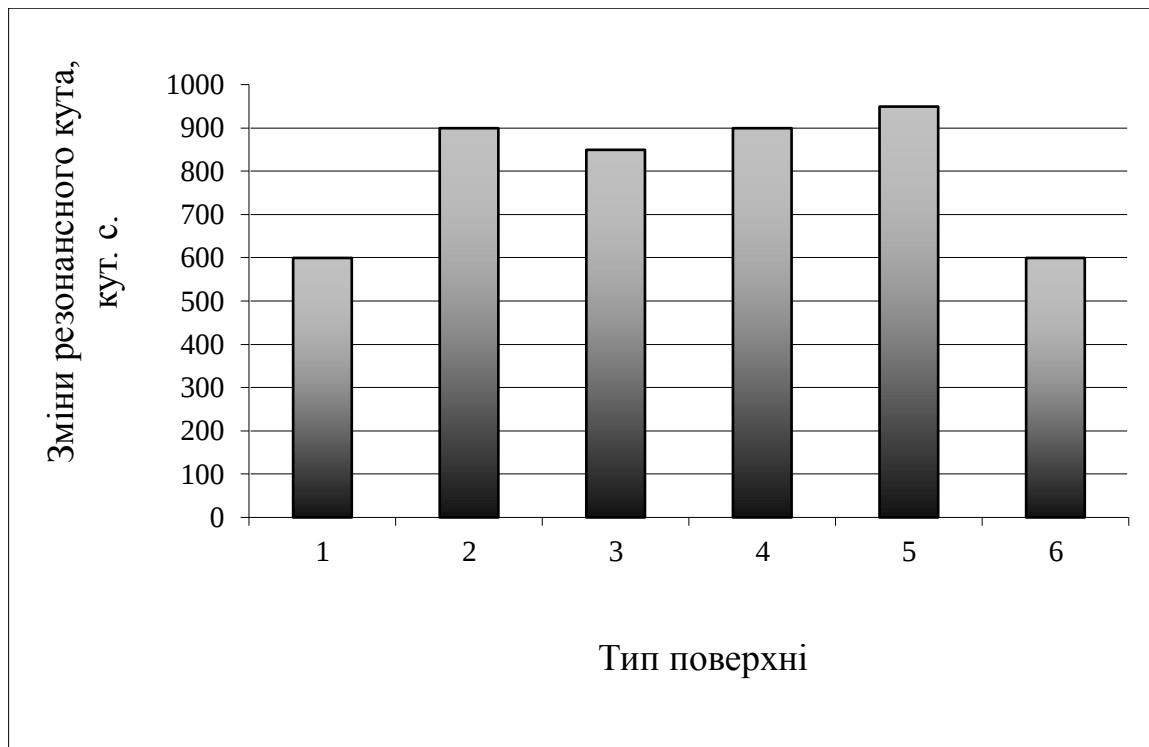


Рис. 2. Зміни резонансного кута при взаємодії імунного біосенсора з сироватками хворих тварин. 1, 4 – необроблена поверхня; 2, 5 – поверхня з шаром ПАА; 3, 6 – поверхня з шаром додекантиола; 1-3 – антиген р24; 4-6 – антиген gr51

Таким чином, було проаналізовано ефективність іммобілізації антигену вірусу лейкозу на поверхні перетворювача ППР, попередньо вкритій різними хімічними агентами (додекантиолом, поліелектролітами та похідними декстрану). Оскільки чутливість та специфічність ППР імунного біосенсора є достатньо високою для проведення експресного аналізу проб щодо виявлення тварин хворих на лейкоз, то нема необхідності в застосуванні високовартісних сполук та ускладненні алгоритму проведення аналізу. Використання поліелектроліту ПАА для модифікації поверхні перетворювача імунного біосенсора на основі ППР є найбільш доцільним, дешевим і простим для обох рекомбінантних антигенів. Таким чином, для антигену gr51 можна використовувати і необроблену поверхню, а для антигену р24 і поверхню, яка містить шар додекантиолу. Але ці висновки є справедливими лише в тому випадку, якщо поверхня трансдюсера буде використана безпосередньо після її підготовки.

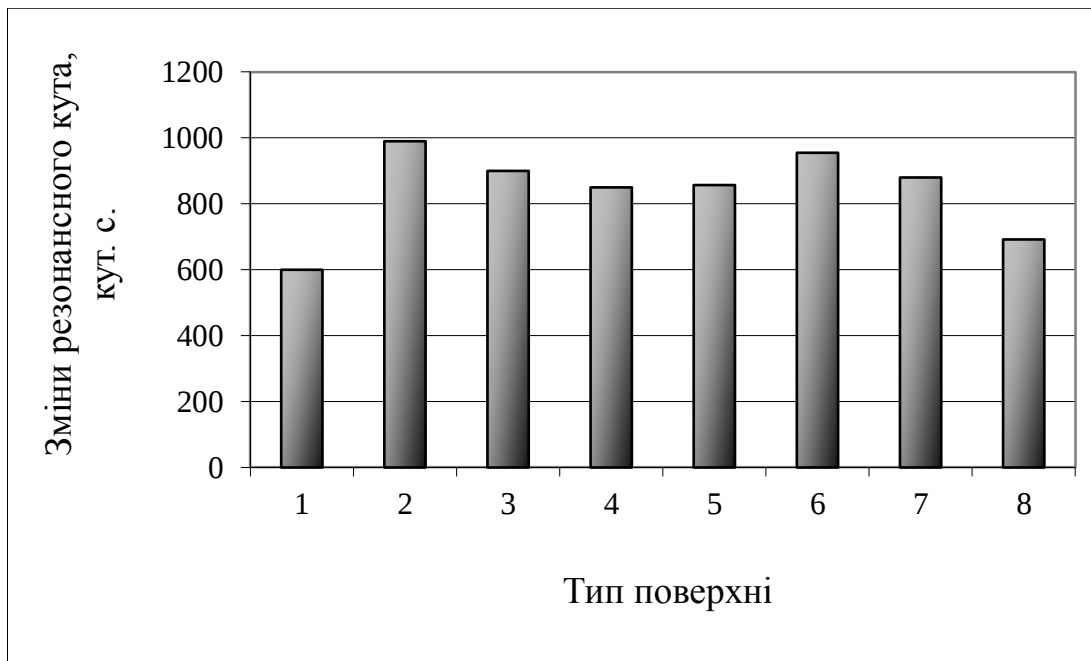


Рис. 3. Зміни резонансного кута при взаємодії імунного біосенсора з сироватками хворих тварин. 1, 5 – необроблена поверхня; 2, 6 – поверхня з шаром сульфату декстрану 3, 7 – поверхня з шаром ПАА; 4, 8 – поверхня з шаром додекантіола; 1-4 – антиген р24; 5-8 – антиген gr51

Висновки і перспективи. Порівнянням сигналів біосенсора на основі ППР після його функціоналізації рекомбінантними антигенами gr51 та р24 встановлено, що створення на поверхні трансдюсера проміжного шару взагалі, а особливо при використанні для цього ПАА (порівняно з додекантіолом) дозволяє не лише збільшити відгук, а й досягти його необхідної відтворюваності впродовж принаймні 4-х місяців. Похідні декстрану також збільшують відгук біосенсора, але не забезпечують його стабільності при зберіганні функціоналізованої поверхні.

References

1. Gulyukin, M. I., Zamaraeva, N. V., Abramov, V. N., Barabanov, N. I. (1999). Sostoyanie i perspektiva borbyi s leykozom krupnogo rogatogo skota [The state and prospects of combating leukemia of cattle]. Veterinariya, 12, 3-8.
2. Mandigra, M. (2000). Genetichni aspekti leykozu velikoyi rohatoyi hudobi [Genetic aspects of leukemia in cattle]. Vet. med. UkraYini, 18-19.
3. Yarchuk, B. M., Dombrovskiy, O. B., TirsIn, R. V., Kornienko, L. E., Dovgal, O. V. (2000). Leykoz velikoyi rohatoyi hudobi [Leukemia of cattle]. Kyiv: Biblioteka vet. med., 9-12, 62 s.
4. Pirogova, L. V., Starodub, M. F., Artyuh, V. P., Nagaeva, L. I., Dobrosol, G. I. (2002). Ekspresna diagnostika leykozu velikoyi rohatoyi hudobi za dopomogoyu imunnogo sensora na osnovi poverhneвого plazmonnogo rezonansu [Extreme diagnosis of leukemia in cattle using an immune sensor based on surface plasmon resonance]. Ukr. biohim. Zhurn, 74, 3, 88 – 92.
5. Starodub, N. F., Pirogova, L. V. (2003). Instrumentalnaya ekspres-diagnostics leykozov na osnove biosensornoy tehnologii [Instrumental express diagnostics of leukemia based on biosensor technology]. Sbornik: «Bioresursyi, biotehnologii, innovatsii yuga Rossii», Materialy Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii 21-24 oktyabrya 2003, Stavropol Pyatigorsk, 2, 144-149.

6. Starodub, M. F., Pirogova, L. V. (2007). Spisib neinvaziynoyi diagnostiki leykozu velikoyi rohatoyi hudobi shlyahom viznachennya antitil do virusu u molotsi koriv imunosensorom poverhnevogo plazmonnogo rezonansu [Method of non-invasive diagnosis of bovine leukemia by detection of antibodies to a virus in milk of cows with an immunosensor of surface plasmon resonance]. Patent Ukrayini na vinahid, №12689/3730, Byul. vld 23.11.2007.

7. Starodub, N. F., Starodub, V. N. (2003). Infektsionnyy leykoz krupnogo rohatogo skota i ego diagnostika [Infectious leukemia of cattle and its diagnosis]. Biopolimeryi i kletka, 19,4, s. 307-316.

МОДИФИКАЦИЯ ТРАНСДЮСЕРНОЙ ПОВЕРХНОСТИ БИОСЕНСОРОВ НА ОСНОВЕ ППР ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЛЕЙКОЗА КРС

М. Ф. Стародуб, М. И. Феделеш-Гладинец, М. В. Савчук

Аннотация. Лейкоз БРС – широко распространенная хроническая болезнь опухолевой природы, протекает бессимптомно или характеризуется лимфоцитозом и ростом лимфоидных клеток в различных органах животных. Такая болезнь приносит огромные убытки в сельскохозяйственных хозяйствах. Основным мероприятием для преодоления этой болезни является своевременная диагностика и лечение. Общепринятыми методами диагностики лейкоза есть методы РИД и ИФА. Однако эти методы являются долговременными и требуют исследований в лаборатории. Поэтому в настоящее время актуальным является разработка новых приборов для экспресс-диагностики состояния животных в полевых условиях. Целью работы было отработать основные подходы функционализации трансдюсерных поверхностей для повышения сигнала биосенсоров для диагностики лейкоза БРС. В работе использовали иммунологические и статистические методы исследований. Сравнением сигналов биосенсора на основе ППР после его функционализации рекомбинантными антигенами gr51 и p24 установлено, что создание на поверхности трансдюсера промежуточного слоя вообще, а особенно при использовании для этого ПАА (сравнительно с додекантиолом) позволяет не только увеличить отклик, но и достичь его необходимой воспроизводимости на протяжении по крайней мере 4-х месяцев. Производные декстрана также увеличивают отзыв биосенсора, но не обеспечивают его стабильности при хранении функционализированной поверхности.

Ключевые слова: биосенсор, лейкоз крупного рогатого скота, трансдюсер, антиген, додекантиолом, декстран, полиалиламин

MODIFICATION OF TRANSDUSER SURFACE OF BIOSENSORS ON THE BASIS OF PPR FOR DIAGNOSTICS OF LEUCOSE CATTLE

M. F. Starodub, M. I. Fedesh-Gladinets, M. V. Savchuk, O. P. Taran

Annotation. Leucosis of BLV is a widespread chronic disease of the tumor nature, occurs asymptotically or is characterized by lymphocytosis and growth of lymphoid cells in various organs of animals. Such a disease brings huge

losses in agricultural holdings. The main measure for overcoming this disease is timely diagnosis and treatment. Common methods of diagnosing leukemia are the methods of RID and ELISA. However, these methods are long-term and require research in the laboratory. Therefore, at present, it is urgent to develop new instruments for rapid diagnosis of the condition of animals in the field. The aim of the work was to work out the main approaches to the functionalization of transducer surfaces to increase the biosensor signal for the diagnosis leucosis of BLV . Immunological and statistical methods of research were used in the work. By comparing the signals of the biosensor based on PPR after its functionalization with recombinant antigens gp51 and p24, it was established that the creation of an intermediate layer on the surface of the transducer in general, and especially when using PAA (level with dodecanthiol) allows not only to increase the response, but also to achieve its necessary reproducibility on for at least 4 months. Derivatives of dextran also increase the recall of the biosensor, but do not ensure its stability during storage of the functionalized surface.

Keywords: *biosensor, leukosis of cattle, transducer, antigen, dodecanthiol, dextran, polyalilamine*

ОСОБЛИВОСТІ ІНДУКОВАНОГО МОРФОГЕНЕЗУ КАРТОПЛІ *SOLANUM TUBEROSUM L.*

О. Л. КЛЯЧЕНКО, доктор сільськогосподарських наук, професор кафедри екобіотехнології та біорізноманіття

Ю. О. ПРОДАЩУК, магістр*

О. О. ОЛІЙНИК, провідний фахівець

Національний університет біоресурсів та природокористування України

E-mail: prodaschuk266@ukr.net

Анотація. Сучасне картоплярство передбачає отримання вихідної насіннєвої картоплі на основі застосування біотехнологічних методів оздоровлення, мікроклонального розмноження і наступних методів прискореного розмноження оздоровлених рослин. Біотехнологічний метод дозволяє підвищити морфогенетичний потенціал рослинного організму в інтересах господарської діяльності людини, а також вирішити практичні проблеми, такі як отримання сортових ліній, одержання оздоровленого від вірусної інфекції посадкового матеріалу. У статті наведено результати досліджень з трьома сортами картоплі: ранньостиглим Коломбо та середньостиглим Реванш і Діва. Найбільшу інтенсивність росту пагонів спостерігали у ранньостиглого сорту Коломбо, менш інтенсивно росли пагони середньостиглого сорту Діва і Реванш. Встановлено, що найбільш ефективно вводити рослини картоплі в культуру *in vitro* насінням. Продуктивність бульб формується стало та істотно залежить від фону живлення. Досліджено способи отримання асептичного матеріалу насіння та проростків рослин картоплі та її мікроклональне розмноження. Виявлено, що активне пагоноутворення і ризогенез спостерігається при культивуванні рослин на середовищі Мурасіге-Скуга, доповненому кінетином у концентрації 0,5 мг/л. Виконано підбір оптимальних варіантів стерилізації рослинного матеріалу та модифікацій живильних середовищ для розмноження і отримання рослин-регенерантів.

Ключові слова: морфогенез, мікробульби, живильне середовище, *Solanum tuberosum L.*, генотип, *in vitro*.

Актуальність. Картопля (*Solanum tuberosum L.*) – цінна продовольча культура, незамінний продукт харчування людини. Генетичний потенціал продуктивності картоплі далеко не вичерпаний, його підвищення може бути досягнуте завдяки вивченню морфологічних і фізіологічних ознак, що зумовлюють підвищення врожайності [6]. Успішне вирощування рослин *in vitro* забезпечується, перш за все, правильним підбором живильного середовища, що відповідає фізіологічним особливостям культивованих рослин [4]. Біотехнологічний метод дозволяє підвищити морфогенетичний потенціал рослинного організму в інтересах господарської діяльності

* Науковий керівник - О. Л. Кляченко

людини, а також вирішити практичні проблеми, такі як отримання сортових ліній, одержання оздоровленого від вірусної інфекції посадкового матеріалу та інше.

Вплив різних факторів на морфогенез *in vitro* у багатьох сортів картоплі вивчено цілим рядом авторів [3, 6, 9]. Наукові роботи здебільшого присвячені вирішенню і вивченню окремих методичних питань. Однак, практично для кожного сорту необхідно підбирати індивідуальні умови для морфогенезу *in vitro*. Тому, вивчення і оптимізація умов індукції морфогенезу картоплі з культивованих клітин є актуальною і важливою складовою частиною роботи.

Метою дослідження є вивчення морфогенетичних процесів за культивуванні *in vitro* сорту *Solanum tuberosum* L., отримання оздоровленого матеріалу.

Матеріали і методика досліджень. Як об'єкт використовували насіння картоплі середньостиглого сорту Реванш і Діва вітчизняної селекції та проростки раннього сорту Коломбо – зарубіжної селекції. Для оптимізації умов одержання асептичної культури картоплі вивчали різні стерилізуючі речовини та тривалість експозиції.

Експлантати виокремлювали від проростків і культивували на модифікованому живильному середовищі Мурасіге-Скуга(МС) [8], доповненому кінетином (0,5мг/л). Культивували експлантати в культуральній кімнаті за температури 25-26°C і відносній вологості повітря 60-70 % [1]. Для отримання маточних рослин використовували проміжні живці пагонів пророщених бульб довжиною 1–2см з однією парою листків. Статистичну обробку даних проводили відповідно до загальноприйнятих методів із використанням Microsoft Office Excel.

Результати досліджень та їх обговорення. Для введення в культуру *in vitro* насіння картоплі сорту Діва та Реванш було підібрано схему стерилізації, яка полягала в послідовній обробці матеріалу 70 % C_2H_5OH (1 хв), з подальшим перенесенням у 0,1 % $HgCl_2$ (10 хв) та 3-разовим промиванням стерильною дистильованою H_2O (10 хв). При цьому ефективність стерилізації становила 100 %. Рослини мали мінімальний рівень контамінації мікроорганізмами. За введення в культуру *in vitro* проростків сорту Коломбо, їх відмивали у мильному розчині із додаванням 1-2 крапель Твін-20. Стерилізували за тією ж схемою, що й насіння. Ефективність стерилізації сягала 30 %. Причиною цього є недостатність проникнення стерилізуючої речовини у тканини і високий рівень контамінації мікроорганізмами. Проростки та насіння переносили на безгормональне живильне середовище (рис. 1).

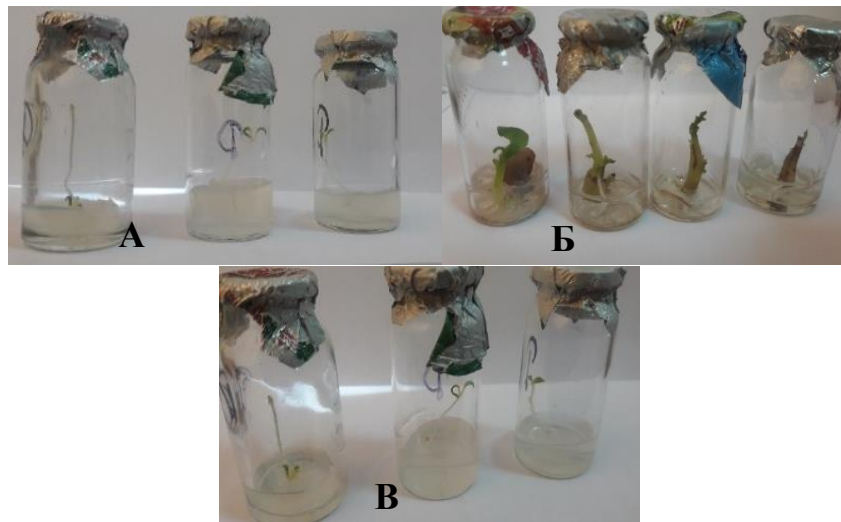


Рис. 1. Особливості введення *Solanum tuberosum* L. в культуру in vitro, формування вегетативних пагонів: а) сорт 'Діва'; б) сорт 'Коломбо'; в) сорт 'Реванш'

Експлантати субкультивували на модифікованому живильному середовищі МС, доповненому кінетином (0,5 мг/л) та аскорбіною кислотою (0,6 мг) (рис. 2).

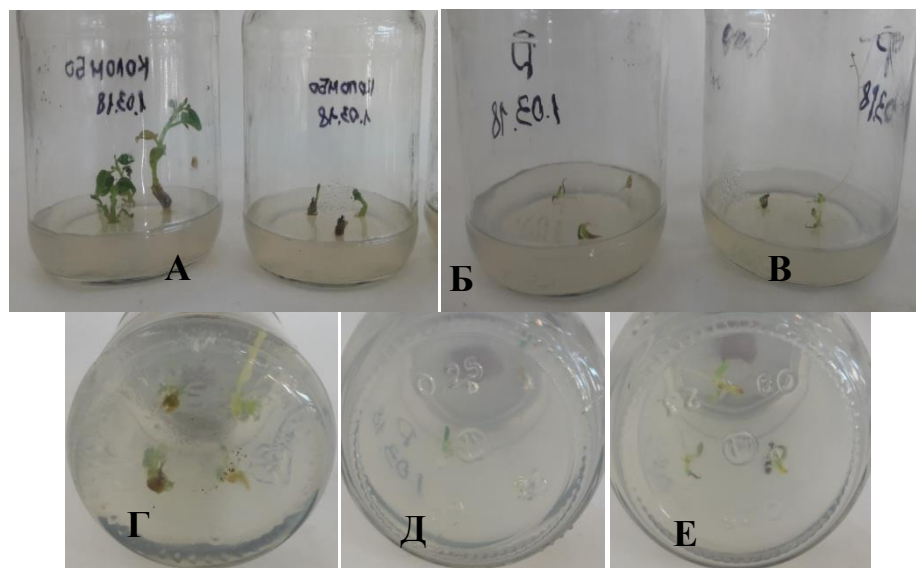


Рис. 2. Вивчення морфогенетичного потенціалу різних генотипів *Solanum tuberosum* L.: формування вегетативних пагонів: а) сорт Коломбо; б) сорт Діва; в) сорт Реванш; ризогенез пагонів: г) сорт Коломбо; д) сорт Діва; е) сорт Реванш

Вивчення морфогенетичного потенціалу різних генотипів картоплі показало, що на рослинах середньостиглих сортів Реванш та Діва спостерігалось слабе пагоноутворення, невелику довжину рослин (2-3см) і повільний ріст коренів. За деякими іншими характеристиками відрізняється середньостиглий сорт Коломбо. Спостерігали формування бокових пагонів та їх інтенсивний ріст, високий коефіцієнт розмноження, інтенсивний ріст пагонів (до 15 см у висоту) з рівномірно розміщеними листками, великою кількістю міжвузлів і добре розвиненою кореневою системою. Облистяність рослин

служить показником їх потенційної енергії зростання тому, що листя – місце детермінації фізіологічних процесів, що відбуваються в рослинах [7]. На рослинах було сформовано від 5 до 15 шт листових пластинок.

Основним процесом репродуктивного розвитку рослин картоплі є бульбоутворення (рис. 3).

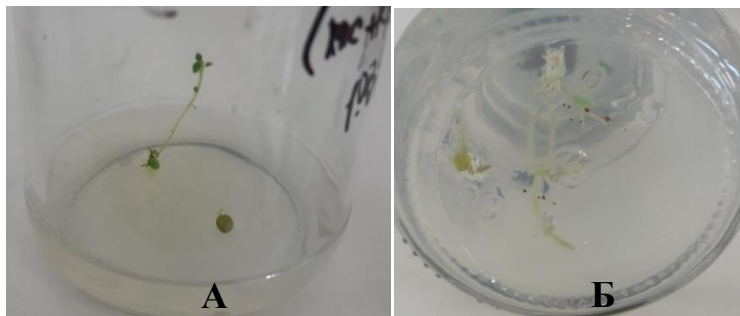


Рис. 3. Особливості процесів бульбоутворення *Solanum tuberosum* L. в культурі *in vitro* сорту Реванш: а) формування вегетативних пагонів; б) ризогенез пагонів

У процесі утворення мікробульб однією з основних умов є вуглеводневий і гормональний фактори, які впливають на фотоперіодичні реакції бульбоутворення і ростові реакції, а також на комплекс біохімічних процесів [2]. Мікробульби сорту Реванш висаджували на живильне середовище МС з кінетином (0,5 мг/л) та витримували в культуральній кімнаті 8-10 діб за температури 14-15 °С. У результаті досліджень було встановлено певну залежність між інтенсивністю росту пагонів і бульбоутворенням. Активне бульбоутворення починалося тоді, коли ріст пагонів сповільнювався або зовсім зупинявся.

Найбільш оптимальним для культивування виявилось живильне середовище МС з додаванням 0,5 мг/л – кінетину, 20 г – сахарози та 1мг – аскорбінової кислоти, що істотно стимулювало бульбоутворення. Мікробульби мали овальну або видовжену форму, темно-зелене забарвлення та розмір – 5мм.

Таким чином, в результаті проведених досліджень нами вивчено особливості морфогенезу рослин *in vitro*. Підбір оптимальних умов, розширення генетичного спектру вихідного матеріалу надають змогу для прискореного і якісного розмноження рослин.

Висновки і перспективи:

В результаті дослідження було оптимізовано умови отримання асептичного матеріалу насіння та проростків рослин картоплі, їх мікроклональне розмноження. Виявлено, що активне пагоноутворення і ризогенез спостерігається за культивування рослин на середовищі за прописом Мурасіге і Скуга, доповненому кінетином у концентрації 0,5 мг/л.

Найбільш доцільно рослини картоплі вводити в культуру *invitro* насінням. Високу інтенсивність росту пагонів спостерігали у ранньостиглого сорту Коломбо, менш інтенсивно росли пагони середньостиглого сорту Діва і Реванш. Сприятливий вплив на утворення мікробульб мало живильне середовище МС з додаванням кінетину – 0,5 мг/л, сахарози – 20 г, аскорбінової кислоти – 1 мг.

References

1. Borodai, V. V., Kliachenko O.L.(2014). Osoblyvosti indukovanoho morfohenezu ta reheneratsii henotypiv *Solanum tuberosum* L.ukrainskoi seleksii. Naukovi pratsi Instytutu bioenerhetychnykh kultur i tsukrovykh buriakiv. 21, 205-211.
2. Vlasenko M., Veliaminova- Zernova L. D., Matskevych V. V.(2006). Fiziolohiia roslyn z osnovamy biotekhnolohii. Bila Tserkva : Bilotserkiv. derzh. ahrar. un-t, 504.
3. Matskevych V.V., Liashchenko S.A. (2008). Osoblyvosti reheneratsii roslyn kartopli z zhyvtsiv zalezho vid osvittlenia ta substratu. Kartopliarstvo: mizhvidom. temat. nauk. zb.–K.:Ahrarna nauka. 37, 98-110.
4. Oliinyk T.M. Slobodian K.A., Shevchenko O.O. ta in(2012). Ozdorovlennia sortiv kartopli metodom kultury apikalnykh merystem: metodychni rekomendatsii. In-t kartopliarstva NAAN (Nemishaieva): TOV "KVITs",28 s.
5. Artyuhova S.I., Kirgizova I.V.(2014). Modifikatsii pitatelnoy sredy s ispolzovaniem biotekhnologicheskikh metodov mikroklonalnoho rozmnozheniya kartofelya dlya kultivirovaniya v Omskoy oblasti. Omskiy nauchnyy vestnik. №2, 187–191.
6. Konovalova G.I.(2006). Ispolzovanie biotekhnologicheskikh metodov i priemov v sovremennom semenovodstve kartofelya. Aktualnyie problemy nauki i tehniki: Voprosy kartofelevodstva: nauch. tr. 332-336.
7. Uskov A.I.(2009). Vosproizvodstvo ozdorovlennogo ishodnogo materiala dlya semenovodstva kartofelya: rozmnozhenie ishodnykh rasteniy. Dostizheniya nauki i tehniki APK. №12, 17–20.
8. Murashige, T. A., Skoog, F. K. (1962). Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol Plant.* 15, 473-497.
9. Sarkar D.(2008). The signal transduction pathways controlling in planta tuberization in potato: an emerging synthesis .*Plant Cell Reports.* №27, 1-8.

ОСОБЕННОСТИ ИНДУЦИРОВАННОГО МОРФОГЕНЕЗА КАРТОФЕЛЯ *SOLANUM TUBEROZUM* L.

О. Л. Кляченко, Ю. А. Продащук, О. А. Олейник

Аннотация. Современное картофелеводство предусматривает получение исходного семенного картофеля на основе применения биотехнологических методов оздоровления, микроклонального размножения и последующих методов ускоренного размножения оздоровленных растений. Биотехнологический метод позволяет резко повысить морфогенетический потенциал растительного организма в интересах хозяйственной деятельности человека, а также решить практические проблемы, такие как получение сортовых линий, оздоровленного от вирусной инфекции посадочного материала. В статье приведены результаты исследований с тремя сортами картофеля: раннеспелым Коломбо и среднеспелые Реваниш и Дева. Наибольшую интенсивность роста побегов наблюдали у раннеспелого сорта Коломбо, менее интенсивно росли побеги среднеспелого сорта Дева и

Реванш. Установлено, что наиболее эффективно вводить растения картофеля в культуру *in vitro* семенами. Производительность клубней формируется постоянно и существенно зависит от фона питания. Исследованы способы получения асептического материала семян и проростков растений картофеля и ее микроклональное размножения. Определено, что активное побегообразование и ризогенез наблюдается при культивировании растений на среде Мурасиге-Скуга, дополненной кинетином в концентрации 0,5 мг / л. Выполнен подбор оптимальных вариантов стерилизации растительного материала и модификаций питательных сред для размножения и получения растений-регенерантов.

Ключевые слова: морфогенез, микроклубни, питательная среда, *Solanum tuberosum* L., генотип, *in vitro*

THE FEATURES OF INDUCED MORPHOGENESIS OF POTATO *SOLANUM TUBEROZUM* L.

O. Klyachenko, Y. Prodashchuk, O. Oliinyk

Abstract. A sterilization scheme was selected for *in vitro* seeding of the 'Virgo' and 'Revenge' potatoes, which consisted of sequential processing of 70 % C₂H₅OH (1 min) material, followed by transfer in 0.1 % HgCl₂ (10 min) and 3 times washing sterile distilled H₂O (10 min). The efficiency of sterilization was 100%. Plants had a minimum level of contamination by microorganisms. When introduced into the culture of *in vitro* seedlings of the 'Colombo' variety, they were washed in a soap solution with the addition of 1-2 drops of Twin-20. Sterilized according to the same pattern as the seeds. The effectiveness of sterilization was 30%. The reason for this is the lack of penetrating sterilizing material in the tissue and the high level of contamination by microorganisms. Seeds and seeds were transferred to a non-hormonal nutrient medium. The implants were subcultured on a modified nutrient medium MS supplemented with kinetin (0.5 mg / l) and ascorbic acid (0.6 mg). The study of the morphogenetic potential of different genotypes of potatoes showed that plants of the middle-aged varieties 'Revench' and 'Virgo' showed weak sprout formation, a small length of plants (2-3 cm) and slow growth of roots. For somewhat different characteristics, the average varieties of Colombo are different. There was observed the formation of lateral shoots and their intense growth, high reproduction rate, intensive growth of shoots (up to 15 cm in height) with evenly spaced leaves, a large number of internodes and a well-developed root system. The thickness of plants is an indicator of their potential energy growth, because the leaves - the place of determination of physiological processes occurring in plants. On plants there were formed from 5 to 15 pieces of leaf blades. The main process of reproductive development of potato plants is bulbous formation. In the process of microbubbling, one of the main conditions is the hydrocarbon and hormonal factors that affect the photoperiodic reactions of bulb formation and growth reactions, as well as the complex of biochemical processes. Microbubbles of the 'Revenge' variety were planted on the MS medium with kinetine (0.5 mg / l) and cultured in a culture room for 8-10 days at a temperature of 14-15 ° C. As a result of the research, a certain correlation was established between the growth intensity of the shoots and bulbous formation. Active bulb formation began when growth of shoots slowed down or

stopped at all. The most beneficial for cultivation was the nutrient medium of the MS with the addition of 0.5 mg / l - kinetine, 20 g sucrose and 1 mg ascorbic acid, which significantly stimulated bullous formation. Microbubbles had an oval or elongated shape, a dark green color and a size of 5 mm.

Thus, as a result of the research was the study of the peculiarities of plant morphogenesis in vitro, which are important for the ontogenesis of plants, the selection of optimal conditions, the expansion of the genetic spectrum of the source material will enable for accelerated and qualitative reproduction.

Keywords: morphogenesis, microtubers, culture media, *Solanum tuberosum*L., genotype, in vitro

МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ *MELISSA OFFICINALIS* L.

О. Л. КЛЯЧЕНКО, доктор сільськогосподарських наук, професор кафедри
екобіотехнології та біорізноманіття

К. В. СОМ, магістр^{*}

О. О. ОЛІЙНИК, провідний фахівець

**Національний університет біоресурсів і природокористування
України**

E-mail: katya.som.95@ukr.net

Анотація. Меліса лікарська (*Melissa officinalis* L.) є перспективною ефіроолійною і лікарською рослиною. Проте вміст ефірної олії в рослинній сировині незначний. Тому нині головною метою селекціонерів є виведення високопродуктивних та високоолійних сортів *M. officinalis*. Визначено, що потреба в лікарській сировині меліси задовольняється дикоростучими рослинами. Це спричинює значне скорочення природних ресурсів. Тому доцільно вводити рослини меліси в культуру *in vitro*, ставлячи за мету розробку методів отримання лікарської сировини в керованих умовах. В багатьох наукових публікаціях, які стосуються біотехнології ефіроолійних культур, основна увага приділена розробці методів мікроклонального розмноження. В ході роботи встановлено особливості мікроклонального розмноження *Melissa officinalis* L. Досліджено способи отримання асептичної культури рослин меліси із зелених живців та насіння. Виявлено, що оптимальним для мікроклонального розмноження меліси є живильне середовище за прописом Мурасіге і Скуга, доповнене кінетином у концентрації 0,25 мг/л, за якого відбувається множинне пагоноутворення та ризогенез. В результаті удосконаленої методики мікроклонального розмноження, отримано генетично-стабільні, оздоровлені рослини-регенеранти меліси лікарської, придатні до адаптації *ex vitro*.

Ключові слова: меліса лікарська, *in vitro*, мікроклональне розмноження, *ex vitro*

Актуальність. Меліса лікарська (*Melissa officinalis* L.) – перспективна ефіроолійна і лікарська рослина, яка широко використовується в багатьох сферах промисловості [4]. Ефірна олія меліси входить до складу багатьох седативних препаратів, але вміст її в сировині дуже малий – приблизно 0,02 – 0,30% на суху масу. Тому в даний час головна мета селекціонерів – виведення високопродуктивних і високоолійних сортів *M. officinalis* [3, 4]. Збільшенню ефективності селекційних досліджень сприятиме використання біотехнологічних методів. На сьогодні потреба в лікарській сировині *M. officinalis* задовольняється більшою мірою дикоростучими рослинами, що призводить до значного скорочення природного фонду. Тому доцільно вводити рослини в культуру *in vitro*, ставлячи за мету розробку методів

^{*} Науковий керівник – О. Л. Кляченко

отримання лікарської сировини в контрольованих умовах [2, 4]. В більшості опублікованих наукових праць, які стосуються біотехнології ефіроолійних культур, основна увага приділена розробці методів мікроклонального розмноження [1, 2, 4, 5, 7, 8].

Мета роботи – вивчення особливостей мікроклонального розмноження рослин *M. officinalis* для одержання здорового посадкового матеріалу та подальшого їх пристосування до умов *ex vitro*.

Матеріали та методи досліджень. Матеріалом для досліджень слугували зелені живці з одним вузлом та насіння меліси лікарської (*M. officinalis* L.). Для оптимізації умов отримання асептичних рослин меліси використовували різні стерилізанти в певних концентраціях і тривалості експозиції [2]. Експлантати культивували на декількох модифікованих живильних середовищах Мурасіге і Скуга (МС) [6]: МС1 із додаванням індолілмасляної кислоти (ІМК) (0,1 мг/л), бензиламінопурина (БАП) (0,5 мг/л), гліцину (0,5 мг/л), аденіну (0,1 мг/л) та МС2 із додаванням кінетину (0,25 мг/л). Культивування здійснювали в культуральній кімнаті за температури 24-26°C і відносній вологості повітря 60-70%. Статистичну обробку даних проводили з використанням програми Excel.

Результати дослідження та їх обговорення. В залежності від виду експлантата підбирали відповідні умови стерилізації. На першому етапі роботи як експлантати використовували зелені живці (ділянки стебла з одним вузлом) меліси лікарської сорту Соборна, які виокремили від рослин *in situ*. Для отримання асептичних експлантатів меліси проводили стерилізацію за двома схемами з використанням комерційного препарату «Білизни» та 0,1 % розчину сулеми (HgCl₂). Серед них була обрана найкраща схема стерилізації експлантатів із використанням 70% етанолу (1хв), 0,1% сулеми (7хв) та 4-разового промивання у дистильованій воді по 10хв. За даною схемою рівень контамінації мікроорганізмами був найнижчим (5,5%).

Для введення в культуру *in vitro* насіння сорту Лимонний бальзам стерилізували протягом 1хв 70% етиловим спиртом, з подальшим перенесенням на 15хв у 0,1% розчин сулеми та тричі промивали дистильованою водою по 10хв. Дана схема забезпечувала ефективність стерилізації на рівні 100%, проте, кількість пророщеного насіння складала 70%. Це можна пояснити тим, що у разі збільшення тривалості стерилізації можна досягти абсолютної стерильності, але водночас кількість пророщених насінин може знизитись через некротизацію зародків [4]. Отримані нами асептичні живці та насіння переносили на безгормональне живильне середовище МС. Надалі в експлантатів, отриманих з рослин *in situ*, спостерігався сповільнений ріст. У разі перенесення частин стебел із однією сплячою брунькою на модифіковане живильне середовище МС1, доповнене ІМК (0,1 мг/л), БАП (0,5 мг/л), гліцином (0,5 мг/л) і аденіном (0,1 мг/л), відбувався запуск сплячих бруньок, але ріст пагонів при цьому сягав менше 1см.

Для удосконалення методики мікророзмноження рослин меліси лікарської, нами вивчено вплив середовища МС2, доповненого кінетином (0,25 мг/л) на розвиток експлантатів (рис.1). На 14 добу у рослин спостерігали

формування коренів на базальній частині пагона (2-3шт), висота пагона сягала не менше ніж 2см, додатково формувались 3-4 листки.

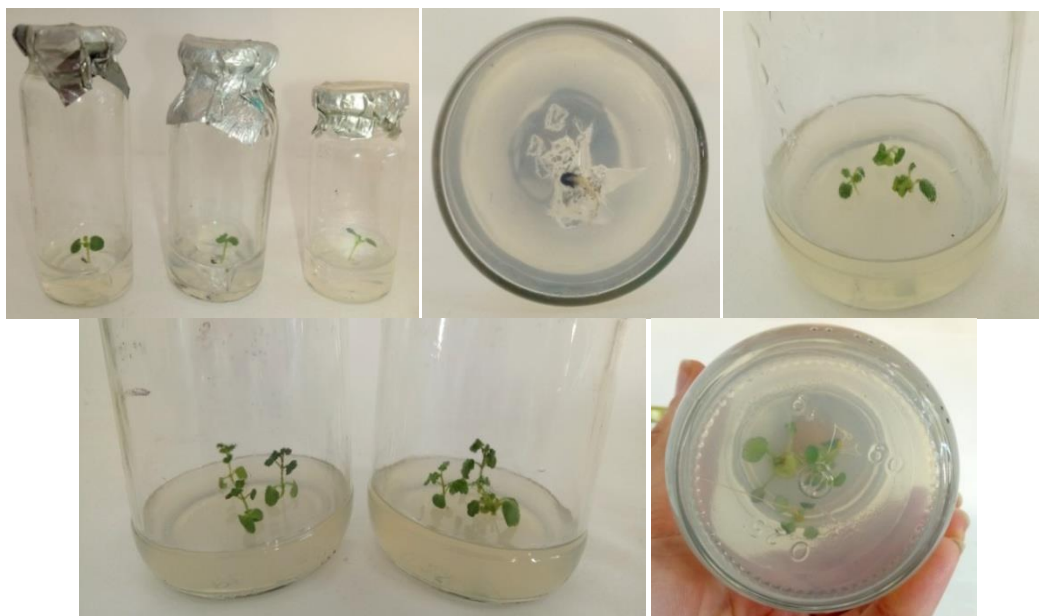


Рис. 1. Отримання стерильних проростків насіння меліси лікарської сорту Лимонний бальзам *in vitro*: 1 - проростки на безгормональному середовищі МС; 2 - перенесені проростки на середовище МС2, доповнене кінетином (0,25 мг/л); 3 - проростки на 14 добу субкультивування

В процесі розвитку рослини-регенеранти активно збільшували вегетативну масу, була добре розвинена коренева система, висота пагонів становила не менше 15см. Такі рослини є придатними для адаптації до умов *in vivo*.

Надалі для розмноження меліси отримували мікроживці з одним вузлом вже з добре сформованих рослин-регенерантів та переносили на свіже живильне середовище МС2 (рис.2). Нами було виявлено, що у всіх експлантатів через два тижні культивування починався ріст пагонів із пазушних бруньок та активно формувалися корені.



Рис. 2. Вплив живильного середовища МС2 з кінетином (0,25 мг/л) на розвиток мікроживців, виділених із насіння *in vitro*: 1 – мікроживці на середовищі МС2 (1-й день); 2 – мікроживці на 14-й день культивування; 3 – ризогенез у мікроживців (14-й день); 4 – рослини на 25-й день культивування; 5 – ризогенез у рослин (25-й день)

В результаті проведених досліджень встановлено, що середовище МС2, доповнене кінетином (0,25 мг/л), сприяло ефективному збільшенню вегетативної маси та формуванню кореневої системи, що дозволило в подальшому адаптувати отримані рослини-регенеранти до умов *in vivo*.

Висновки і перспективи. Показано, що найбільш оптимальним для мікроклонального розмноження меліси лікарської є живильне середовище МС2, доповнене кінетином у концентрації 0,25 мг/л, за якого відбувається множинне пагоноутворення та ризогенез.

В результаті удосконаленої методики мікроклонального розмноження меліси отримано генетично-стабільні, оздоровлені рослини-регенеранти, придатні до адаптації *in vivo*.

References

1. Bugara, I. A. (2013). Klonal'noe mikrorazmnozhenie i ozdorovlenie *Mentha piperita* L. in vitro [Clonal micropropagation and recovery of *Mentha piperita* L. in vitro]. Uchenye zapiski Tavricheskogo natsional'nogo universiteta im. V.I. Vernadskogo. Seriya "Biologiya, khimiya". [Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. Series: Biology, chemistry], 26(1), 10–15.
2. Moradhani Hodzhat Aliakbarovich. Optimizatsiya pitatel'noy sredy kallusnoy i kletочно-suspensioynoy kulturyi: melissa officinalis L.: avtoreferat dissertatsii na soiskanie uchenoy stepeni kandidata biologicheskikh nauk: spetsialnost 03.00.14 Biotehnologiya / Moradhani Hodzhat Aliakbarovich. – Erevan, 2014. – 25 s.
3. Nevkryitaya, N. V. (2008). Analiz vnutrividovogo raznoobraziya melissy lekarstvennoy s tselyu sozdaniya ishodnogo materiala dlya selektsii [Analysis of the instaspecific variety of lemon balm to create the source material for breeding]// Vinogradarstvo i vinodeli, 38, P. 65-68.
4. Yakimova, O. V., Egorova, N. A. (2014). Vvedenie v kulturu in vitro i mikrorazmnozhenie *Melissa officinalis* L. [Introduction to in vitro culture and micropropagation of *Melissa officinalis* L.]. Biotehnologicheskie priemy v sohraneni bioraznoobraziya i selektsii rasteniy: sbornik statey Mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii, Minsk, 18-20 avgusta 2014g. Natsionalnaya akademiya nauk Belarusi. Tsentralnyy botanicheskiy sad [Proceeding of the International Scientific Conference, Minsk, 18-20 August, 2014. Biotechnological methods in conservation of biodiversity and plant breeding. National Academy of Sciences of Belarus. The Central Botanical Gardens] (Minsk), 272-275.
5. Meftahizade, H., Moradkhani, H., Naseri, B. et al. (2010). Improved in vitro culture and micropropagation of different *Melissa officinalis* L. genotypes. J. of Medicinal Plants Research. 4 (3), 240-246.
6. Murashige, T. A., Skoog, F. K. (1962). Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol.Plant.* 15, 473-497.
7. Tavares, A.C., Pimenta, M.C., Gonsalves, M.T. (1996). Micropropagation of *Melissa officinalis* L. through proliferation of axillary shoots. *Plant Cell Repts.* 15 (6), 441–444.
8. Egorova, N. A. (2014). Nekotoryie aspekty biotehnologii efiromaslichnykh rasteniy: mikroklonalnoe razmnozhenie, sintez produktov vtorichnogo metabolizma in

vitro [Some aspects of essential oil plants biotechnology: microclonal propagation, synthesis of secondary metabolites in vitro]. Fiziologiya rasteniy i genetika. 46 (3), 187-201.

МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ *MELISSA OFFICINALIS* L.

О. Л. Кляченко, К. В. Сом, О. О. Олейник

Аннотация. Мелисса лекарственная (*Melissa officinalis* L.) является перспективным эфиромасличным и лекарственным растением. Однако содержание эфирного масла в растительном сырье незначительное. Поэтому сегодня главной целью селекционеров является выведение высокопродуктивных и высокомасличных сортов *M. officinalis*. Определено, что потребность в лекарственном сырье мелиссы удовлетворяется дикорастущими растениями. Это вызывает значительное сокращение природных ресурсов. Поэтому целесообразно вводить растения мелиссы в культуру *in vitro*, ставя целью разработку методов получения лекарственного сырья в управляемых условиях. Во многих научных публикациях, касающихся биотехнологии эфиромасличных культур, основное внимание уделено разработке методов микрклонального размножения. В ходе работы установлены особенности микрклонального размножения *Melissa officinalis* L. Исследованы способы получения асептической культуры растений мелиссы из зеленых черенков и семян. Выявлено, что оптимальной для микрклонального размножения мелиссы есть питательная среда по прописи Мурасиге и Скуга, дополненная кинетином в концентрации 0,25 мг/л, при которой происходит множественное побегообразование и ризогенез. В результате усовершенствованной методики микрклонального размножения, получены генетически стабильные, оздоровленные растения-регенеранты мелиссы лекарственной, пригодные к адаптации *ex vitro*.

Ключевые слова: мелисса лекарственная, *in vitro*, микрклональное размножение, *ex vitro*

MICROCLONAL PROPAGATION OF *MELISSA OFFICINALIS* L.

O. Klyachenko, K. Som, O. Oliinyk

Abstract. Depending on the type of explant, appropriate conditions for sterilization were selected. On the first stage of the work, as explants, green ticks (stems with a single node) of the medicinal varieties 'Soborna', which were isolated from plants *in situ*, were used as explants. To obtain aseptic melanoma explants, sterilization was performed in two regimens using the commercial preparation "Lysine" and 0.1% solution of $HgCl_2$. Among them, the best scheme of sterilization of explants using 70% ethanol (1min), 0.1% $HgCl_2$ (7min) and 4-time flushing in distilled water for 10min was chosen. Under this scheme, the level of contamination by microorganisms was the lowest (5.5%).

When introduced into an *in vitro* culture, seeds of the 'Lemon Balsam' strain were sterilized for 1min in 70% ethanol, followed by transferring to a 15min 0.1% HgCl₂ and washed 3 times with distilled water (10min). This scheme provided the effectiveness of sterilization at 100%, but the amount of germinated seeds was 70%. This can be explained by the fact that with increasing sterilization duration it is possible to achieve absolute sterility, but the amount of germinated seeds can decrease due to necrosis of the embryos. The obtained aseptic cuttings and seeds were transferred to the non-hormonal nutrient medium of MS. Subsequently, in the explants derived from plants *in situ*, slow growth was observed. When transferring parts of stems with one sleeping kidney to a modified nutrient medium MS1 supplemented with IMC (0.1 mg/l), BAP (0.5 mg/l), glycine (0.5 mg/l) and adenine (0.1 mg/l), there was the launch of sleeping kidneys, but the growth of shoots thus reached less than 1cm. To improve the method of micropropagation of melissa plants, we studied the influence of MS2 medium supplemented by KIN (0.25 mg/l) on the development of explants. At day 14, they observed the formation of roots on the basal part of the shoots (2-3pcs), the height of the shoots reached at least 2cm, further formed 3-4 leaves. During the development of the plant, regenerators actively recruited their vegetative mass, they had a well developed root system, the height of the shoots was not less than 15cm. Such plants are suitable for adaptation to *in vivo* conditions. Subsequently, for the propagation of mulch, micro-humans with one node were already obtained from well-formed regeneration plants and transferred to a fresh medium MS2. We have found that in all explants, after two weeks of cultivation, the growth of shoots from the axillary buds began and roots were actively formed.

As a result of the conducted research, it was found that the MS2 medium supplemented with KIN(0.25 mg/l) contributed to the effective collection of vegetative mass and the formation of the root system, which allowed further adaptation of the regenerated plants to *in vivo* conditions.

Key words: lemon balm, *in vitro*, microclonal propagation, *ex vitro*

КАЛУСОГЕНЕЗ ЕКСПЛАНТІВ СІМ'ЯДОЛЕЙ *CUCURBITA PEPO VAR. GIRAUMONTI* В КУЛЬТУРІ *INVITRO* ПІД ВПЛИВОМ N-ГЕКСАНОІЛ-L-ГОМОСЕРИНЛАКТОНУ

О. П. ТАРАН, кандидат біологічних наук, старший викладач кафедри молекулярної біології, мікробіології та біобезпеки
Національний університет біоресурсів і природокористування України

E-mail: oksana.taran258@gmail.com,

Л. М. БАБЕНКО, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник
Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України
E-mail: lilia.babenko@gmail.com,

О. В. МОШИНЕЦЬ, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України

С. П. РОГАЛЬСЬКИЙ, кандидат хімічних наук, старший науковий співробітник

Інститут біоорганічної хімії і нафтохімії НАН України

О. В. ЛОБОВА, кандидат біологічних наук, доцент кафедри молекулярної біології, мікробіології та біобезпеки

О. В. МАЦКЕВИЧ, студентка* факультету захисту рослин, біотехнологій та екології

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Анотація. Регенерація експлантів та стимуляція калусогенезу є актуальними задачами сучасної біотехнології рослин. В даній роботі досліджується фітостимулюючий ефект молекули класу ацилгомосеринлактонів (АГЛ), найпоширенішого класу бактеріальних сигнальних молекул, які задіяні у дистанційній трансдукції сигналів між бактеріями-колонізаторами фітосфери і безпосередньо між бактеріями і рослиною. Метою роботи було оцінити ефект обробки коротколанцюговим АГЛ – N-гексаноїл-L-гомосеринлактоном [ГГЛ] експлантів сім'ядоль кабачка *Cucurbita pepo var. giraumonti* на калусогенез в умовах *invitro*. Обробку розчином ГГЛ та ДМСО (розчинник) проводили в асептичних умовах, занурюючи експланти в розчини речовин на 30 хв. Експланти сім'ядоль рослин, які культивувалися *invitro*, висаджували на агаризоване живильне середовище для калусогенезу і культивували за відсутності світла при температурі 25 °C. У експерименті всі експланти формували пухкий калус кремового кольору. У експлантів, оброблених ГГЛ, встановлено значне збільшення сирової та сухої маси калусів. Проліферація калуса у варіанті із застосуванням ГГЛ починалася на кілька днів раніше, ніж в контрольному варіанті. Враховуючи позитивний ефект застосування ГГЛ на проліферацію і ріст калусної культури на першому

* Науковий керівник – кандидат біологічних наук, старший викладач О.П.Таран
© О. П. ТАРАН, Л. М. БАБЕНКО, О. В. МОШИНЕЦЬ, С. П. РОГАЛЬСЬКИЙ,
О. В. ЛОБОВА, О. В. МАЦКЕВИЧ, 2018

етапі калусогенезу у експлантів кабачка, перспективними є подальші дослідження стимулюючих ефектів АГЛ, зокрема, для оптимізації протоколів культури *in vitro* та створення ефективних систем регенерації.

Ключові слова: *Cucurbita pepo* var. *giraumonti*, калусогенез, N-гексаноїл-L-гомосеринлактон, фітостимулятори, калус, культура рослин *in vitro*

Актуальність. Культивування рослин *in vitro* є однією зі стадій технології селекції рослин, що застосовуються для покращення харчової цінності та підвищення урожайності рослин [30], створення надпродуцентів фармацевтично цінних біологічно-активних речовин [9], для одержання рослин із ефективною здатністю протистояти біотичним або абіотичним стресорам [36, 17, 30; 29]. Останні розробки в галузі біотехнології відкрили кілька способів селекції рослин за допомогою трансформації, за якої гетерологічні гени можуть бути введені в існуючі сорти [4, 19]. Однак у багатьох випадках відсутність ефективної системи регенерації обумовлює обмеження використання технологій переносу генів для культурних рослин. Отже, методи регенерації рослин мають важливе значення для трансформації та одержання, а також для розмноження *in vitro* шляхом вибору соматоклональної варіації та соматичної гібридизації [20]. Тому для застосування різноманітних технологій культивування рослин *in vitro* важливим є розробка надійних систем регенерації експлантів.

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Калусогенез, як правило, є першим етапом введення рослинних клітин в культуру *in vitro*. Цей процес є результатом дедиференціації та активного росту клітин і в природних умовах виникає у рослин при різноманітних пошкодженнях. Відповідно, окрема клітина, введена в умови культивування *in vitro*, зберігає свою основну генетичну інформацію про цілий організм і при наявності відповідних умов може реалізувати її. Численні роботи з культивування *in vitro* свідчать, що до калусоутворення здатні будь-які клітини рослини [13], однак успіх калусогенезу залежить від значної кількості чинників, серед яких вплив складу живильного середовища, вміст у ньому стимуляторів росту, стан експланта, умови культивування. Разом з тим, виявлений такий феномен, як втрата здатності до проліферації калусу диференційованих тканин органів рослини із віком [6-8].

Система регенерації рослин з окремих експлантів має важливе значення для генної інженерії [31]. Для рослин родини Гарбузових (*Cucurbitaceae*) генетична трансформація застосовувалась з різноманітними цілями, наприклад, для одержання покращених форм видів, що використовуються як підвої кавуна і огірка [21, 14], для підвищення стійкості рослин огірка до вірусів, які передаються через ґрунт [16], а також для створення стійких форм до вірусної інфекції [28]. Регенераційна здатність рослин значною мірою детермінована генотипом, тому необхідно розробляти відповідні протоколи регенерації *in vitro* для кожного сорту. Основна технологія регенерації все ще потребує розробок для підвищення регенераційної здатності і калусогенезу експлантів рослин родини Гарбузових [18, 22].

Прояв калусоутворюючої здатності *in vitro* залежить не тільки від генотипу рослини і наявності певних генів, але і від їх стану. Тобто, в аналогічних умовах експланти від рослин одного й того самого виду залежно від віку, фізіологічного стану, умов вирощування рослин, тканинної приналежності експланта і стадії його онтогенезу відрізнятимуться інтенсивністю калусоутворення [6].

Ацилгомосеринлактони [АГЛ] – найпоширеніший клас сигнальних молекул бактеріального походження [1, 32]. Саме ці речовини є комунікативними медіаторам, що регулюють своєрідну сенсорну міжклітинну взаємодію у бактеріальній популяції, що дістала назву «почуття кворуму» (ПК), або quorum sensing [1, 12, 25]. На сьогодні ПК-регуляцію виявлено більш як у 500 видів бактерій [5], а також з'ясовано, що системи ПК відіграють ключову роль в регуляції більшості метаболічних та фізіологічних процесів у бактеріальній клітині та з його участю відбувається взаємодія між бактеріями і рослинами [1, 9, 15]. Наразі дані щодо впливу АГЛ на різні рослини є досить обмеженими. Так, показано, що екзогенна обробка АГЛ змінювала співвідношення між вільними ауксинами та цитокінінами в тканинах коренів і пагонів, що супроводжувалась посиленням росту. У модельному досліді молекула системи ПК L-оксодеканоїл-N-гомосеринлактону посилювала базіпетальний транспорт ауксину, результатом якого було накопичення H_2O_2 і NO, а також стимуляція зростання додаткових коренів [11]. У роботах інших авторів повідомлялося про зміни профілю експресії генів у рослин після обробки розчинами АГЛ [24,27,34,35]. Так, N-бутаноїл-L-гомосеринлактон і N-гексаноїл-L-гомосеринлактон [ГГЛ] посилювали ріст коренів у арабідопсиса [35]. N-деканоїл-L-гомосеринлактон індукував формування кореневих волосків у арабідопсиса, впливав на архітектуру коренів подібно ауксину, однак за ауксине незалежним шляхом [27]. Виявлено імуномодулююча активність високомолекулярних АГЛ, яка приводила до значного зростання резистентності до бактеріальних і грибних патогенів у рослин [32, 33].

Отже, молекули класу АГЛ здатні безпосередньо впливати на рослини та мають фітостимулюючу та імуномодулюючу активність. Тому, АГЛ можуть бути задіяні у вирішенні біотехнологічних задач, зокрема, регенерації експлантів та стимуляції калусогенезу *in vitro*.

Мета нашого дослідження – з'ясування впливу обробки ГГЛ на калусогенез експлантів сім'ядолей *Cucurbita pepo var. giraumonti* сорту Білий та обґрунтування можливості застосування його в культурі рослин *in vitro*.

Матеріали і методи дослідження. ГГЛ було отримано шляхом хімічного синтезу, як це було зроблено раніше [2]. Стоковий розчин ГГЛ у ДМСО (SigmaAldrich) містив 2,5 мг / мл. Робочий розчин ГГЛ готували шляхом розведення стокового розчину дистильованою водою у 100 разів, концентрація робочого розчину становила 25 мкг / мл. Для обробки експлантів робочий розчин стерилізували, пропускаючи через шприцевий фільтр з нітроцелюлозною мембраною, вільною від поверхнево-активних речовин, з розміром пор 0,2 мкм Minisart® NML (Sartorius, ФРН). Середовище для культивування експлантів готували за прописом Мурашиге і Скуга [26] з додаванням 0,0005 г / л 2,4-Д (SigmaAldrich), 0,002 г / л IOK (SigmaAldrich), 0,002 г / л кінетину (Sigma Aldrich) і 20 г / л сахарози (Sigma Aldrich).

Середовище містило 8 г/л агар-агару (DIFCO), pH 5,8. Стерилізацію середовища проводили автоклавуванням протягом 25 хв за температури 121 °С, тиск становив 1,2 атм.

Експланти отримували з насіння *C. peregrina* var. *giraumontii* сорту Білий, яке пророщували в асептичних умовах. Сім'ядолі відділяли від стебла і розділяли на експланти, середня вага експланта становила $0,01 \pm 0,005$ г. Експланти занурювали у розчин ГГЛ на 30 хв, у контролі експонування проводили у дистильованій воді і розчині ДМСО (1 %). Всі процедури проводили за асептичних умов в ламінарному боксі. В подальшому експланти культивували за температури 25 °С в темноті. Оцінку калусогенезу проводили на 3, 5, 8 і 12 добу культивування за приростом маси. Кожна дослідна група мала по 10 повторів. Після припинення експерименту, всі експланти було висушено та зважено суху масу.

Статистичну обробку проводили за допомогою *t*-тесту з пакету аналізу програми Excel 2016.

Результати дослідження та їх обговорення. Бактеріальні сигнальні системи з певними припущеннями можна вважати найдревнішим прототипом складних регуляторних систем вищих організмів (гормональної та імунної), що використовують медіатори для координації функцій різноманітних типів клітин із метою досягнення адекватної адаптаційної реакції на рівні тканин, органів та організму в цілому. У наших попередніх роботах [2] показано позитивний ефект праймування корткостероїдом АГЛ – ГГЛ насіння пшениці *Triticum aestivum*, а саме зафіксовано збільшення продуктивного кущіння, кількості і маси зерен в одному колосі, загальної біомаси рослин, надземної вегетативної маси і маси зерна, а також маси 1000 зерен. В роботах інших дослідників показано, що обробка АГЛ змінювала співвідношення ауксинів і цитокінінів в коренях і пагонах *Vigna radiata*, що супроводжувалось посиленням ростових процесів [11]. Після праймування сумішшю АГЛ, що продукуються симбіотичною азотфіксуючою бактерією *Sinorhizobium meliloti*, в рослинах люцерни були ідентифіковані білки, що задіяні в метаболізмі ауксина, а також білки, які беруть участь у формуванні захисних реакцій, енергетичних і метаболічних процесах [24]. Таким чином, ГГЛ зокрема, та деяким іншим АГЛ властива здатність до посилення росту/фітостимуляції.

Калусогенез є феноменом, що безпосередньо зв'язаний із здатністю рослинних клітин до розмноження та росту. Зазвичай у калусогенезі визначають три етапи формування, на першому з яких спостерігається розростання клітин експланта і збільшення їх кількості. В подальшому маніпуляції з одержаною масою клітин направлені на органогенез стебла і коренів. Задача нашого дослідження полягала у дослідженні впливу екзогенної обробки експлантів розчином ГГЛ на перший етап калусогенезу.

Початок видимих змін у калусогенезі експлантів *C. peregrina* var. *giraumontii* сорту Білий за умов екзогенної обробки ГГЛ спостерігали на 3 добу культивування, у контрольному варіанті – через 5 діб, як і у варіанті з ДМСО. Приріст сирової маси калусу у варіанті із застосуванням ГГЛ перевищував контроль на 3 добу культивування у 2,4 раза, на 8 добу – 7,4 раза, і на 12-ту добу – 8,5 раза (рис. 1).

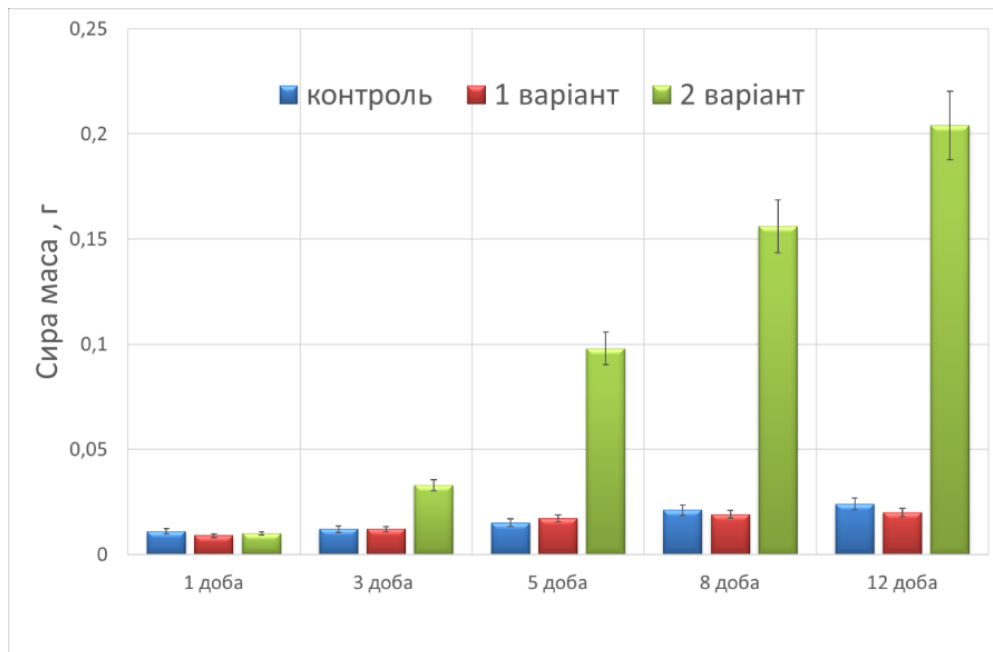


Рис. 1. Динаміка накопичення сирої маси калусу, що утворився з експлантів сім'ядолей *Cucurbita pepo* var. *giraumonti*, сорту Білий. Статистична достовірність у порівнянні із обробкою водою та 1 % ДМСО, * $p < 0.001$**

Різниці між контрольним варіантом і варіантом з розчином ДМСО не виявлено. Вміст сухої речовини в калусах на 12 добу експерименту становив для контролю – $0,0017 \pm 0,0001$ г / калус, для варіанту із ДМСО – $0,0016 \pm 0,0002$ г / калус, для варіанту з - ГГЛ – $0,021 \pm 0,004$ г / калус. Таким чином, обробка експлантів ГГЛ сприяла підвищенню сухої ваги калусів майже у 100 разів.

Відомо, що морфологічна та структурна різноякісність калусів зумовлена присутністю в них різних типів тканин, а також відзначають зв'язок морфології калусів з їх здатністю до регенерації рослин [3]. У досліді експланти формували пухкий калус кремового кольору як у варіантах із обробкою ГГЛ, так і у контролі (рис. 2).

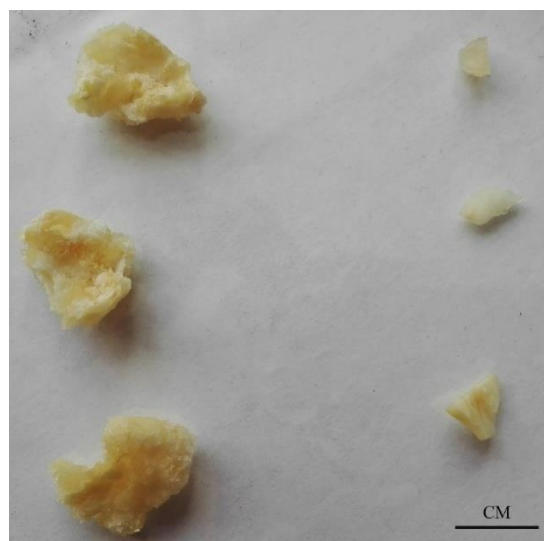


Рис. 2. Калусогенез експлантів кабачка *Cucurbita pepo* var. *giraumonti*, сорту Білий: порівняння розмірів калусу на 12 добу культивування (ліворуч – обробка ГГЛ, праворуч – контроль)

Висновки і перспективи. Таким чином, виявлено, що обробка розчином бактеріальної сигнальної медіатору ГГЛ сприяла активному росту калусу експлантів кабачка *Cucurbita pepo* var. *giraumonti*, сорту Білий на першому етапі культивування *in vitro*. Враховуючи позитивний ефект застосування ГГЛ на проліферацію і ріст калусної культури на першому етапі калуогенезу у експлантів кабачка, перспективними є подальші дослідження із застосування речовин такого класу з метою з'ясування механізму їх впливу для оптимізації культури рослин *in vitro*.

Робота підтримана грантом Національної академії наук України в рамках цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень «Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медицини, промисловості і сільського господарства».

References

1. Babenko, L. M., Shherbatyuk, M. M., Moshynecz, O. V., Kosakivska, I. V. (2016). Acylgomoserynlaktomy bakterialnogo poxodzhennya u biotexnologiyi prajmuвання рослин: dosyagnennya i perspektyvy vykorystannya v agrarnomu vyrobnyctvi [Acylgomoserlinactones of bacterial origin in biotechnology of plant priming: achievements and perspectives of use in agrarian production]. Plant Physiology and Genetics. 48 (6), 463–474. Available at: http://nbuv.gov.ua/UJRN/FBKR_2016_48_6_3
2. Babenko, L. M., Moshynecz, E. V., Rogalskyj, S. P., Shherbatyuk, N. N., Suslova, O. S., Kosakovskaya, Y. V. (2017). Vlyanye predposevnogo prajmyrovanyya N-geksanoyl-L-gomoserynlaktonom na formyrovanye ryzosfernoj mykroflori y strukturu urozhajnosti Triticum aestivum L. [Influence of presowing priming with N-hexanoyl-L-homoserine lactone on the formation of rhizosphere microflora and yield structure of Triticum aestivum L]. The Bulletin of Kharkiv National Agrarian University. Series Biology, 1, 106-118.
3. Zhuravlev, Yu. N., Omel'ko, A. M. (2008). Morfogenz rastenyj in vitro [Plant morphogenesis in vitro]. Plant Physiology, 55(5), 643-664.
4. Ignatova, S. A. (2011). Kletochnyye tekhnologi v rasteniyevodstve. genetike i selektsii vzdelyvayemykh rasteniy: zadachi. vozmozhnosti. razrabotki sistem in vitro [Cell technologies in crop production, genetics and selection of cultivated plants: tasks, opportunities, development of systems in vitro]. Odesa: Astroprint, 224.
5. Kreteczka, S. L., Nesterenko, A. M. (2007). Autoindukciya ta sygnalna transdukciya: komunikatorni systemy v mikrobnix populyaciyax [Autoinduction and signal transduction: communicative systems in microbial populations]. Annals Mechnicov Inst, 1, 4-9.
6. Kunax, V. A. (2005). Biotexnologiya likarskyx roslyn. Genetychni ta fiziologo-bioximichni osnovy [Biotechnology of medicinal plants. Genetic and physiological and biochemical bases]. K: Logos, 730.
7. Kunax, V. A. (1997). Genomnaya yzmenchivost somaticheskix kletok rastenyj. 3. Kallusoobrazovanye in vitro [Genomic variability of plant somatic cells. 3. Callus formation in vitro]. Biopolymers and cell, 13(5), 362-371.
8. Kushnir, G. P., Sarnaczka, V. V. (2005). Mikroklonal'ne rozmnozheniya roslyn [Microclonal propagation of plants.]. K: Naukova dumka, 271.
9. Luchakivskaya, Yu. S., Olevinskaya, Z. M., Kischenko, E. M., Spivak, N. Ya., Kuchuk, N. V. (2012). Poluchenie kulturyi «borodatyyh» korney, kallusnyih i suspenzionnyih kletochnyih kultur morkovi [Daucus carota L.], sposobnyih ekspressirovat chelovecheskiy interferon alfa-2b [Obtaining a culture of "bearded" roots,

callus and suspension cell carrot cultures [*Daucus carota* L.] capable of expressing human interferon alpha-2b]. Cytology and genetics, 46(1), 18-26.

10. Moshy`necz`, O. V., Kosakivs`ka, I. V. (2010). Ekologiya fitosfery`: rosly`nno-mikrobni vzayemovidnosy`ny`. 2. Fitosfera yak ekologichna nisha rosly`nno-mikrobny`x vzayemovidnosy`n. funkcional`na akty`vnist` mikroorganizmiv ta yixnij vplyv na rosly`ny` [Ecology of the phytosphere: vegetative-microbial interrelations. 2. Phytosphere as an ecological niche of plant-microbial interrelations. functional activity of microorganisms and their influence on plants]. The Bulletin of Kharkiv National Agrarian University. Series Biology, 21(3), 6-22.

11. Bai, X., Todd, C. D., Desikan, R., Yang, Y. (2012). N-3-oxo-decanoyl-L-homoserinelactone activates auxin-induced adventitious root formation via hydrogen peroxide- and nitric oxide-dependent cyclic GMP signaling in mung bean. Plant Physiol, 158, 725–736.

12. Bassler, B. (2002) Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria. Cell, 109, 421–424.

13. Benderradji, L., Brini, F., Kellou, K., Ykhelf, N., Djekoun, A., Masmoudi K., Bouzerour H. (2012). Callus induction, proliferation, and plantlets regeneration of two bread wheat [*Triticum aestivum* L.] genotypes under saline and heat stress conditions. ISRN Agronomy, article ID 367851. doi:10.5402/2012/367851

14. Compton, M. E., Gray, D. J., Gaba, V. P. (2004). Use of tissue culture and biotechnology for the genetic improvement of watermelon. Plant, Cell, Tissue and Organ Culture, 77, 231–243.

15. Copley, J. (2000). Ecology goes underground. Nature, 406, 452–454.

16. Gal-On, A., Wolf, D., Yehezkel, A., Patlis, L., Ryu, K. H., Min, B. E., Pearlsman, M., Lachman, O., Gaba, V., Wang, Y., Shibolet, Y. M., Yang, J., Zelcer, A. (2005). Transgenic cucumbers harboring the 54-kDa putative gene of Cucumber fruit mottle mosaic tobamovirus are highly resistant to viral infection and protect non-transgenic scions from soil infection. Transgenic Research, 14, 81–93.

17. Ganesan, M., Jayabalan, N. (2006) Isolation of disease-tolerant cotton [*Gossypium hirsutum* L. cv. SVPR 2] plants by screening somatic embryos with fungal culture filtrate. Plant Cell Tissue Organ Cult, 87, 273–284.

18. Gisbert, C., Picy, B., Nuez, F. (2010-2011) Regeneration in selected Cucurbita spp. germplasm. Cucurbit Genetics Cooperative Report, 33/34, 53–54.

19. Bajaj, Y. P. S. and ed. (2013). High-Tech and Micropropagation V [Biotechnology in Agriculture and Forestry]. Springer Science & Business Media, 396.

20. Kaepler, S. M., Kaepler, H. F., Rhee, Y. (2000). Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. Plant Molecular Biology, 43, 179–188.

21. Kim, K.-M., Kim, Ch., K., Han, J.-S. (2010). In vitro regeneration from cotyledon explants in figleaf gourd [*Cucurbita ficifolia* Boucher], a rootstock for Cucurbitaceae. Plant Biotechnol Rep, 4, 101–107.

22. Krug, M., G., Z., Stipp, L. C. L., Rodriguez, A. P. M., Mendes, B. M. J. (2005). In vitro organogenesis in watermelon cotyledons. Pesq. agropec. Bras, 40/9, 861–865.

23. Kyung-Min, K., K. Chang, Kil, Jeung-Sul, H. (2010). In vitro regeneration from cotyledon explants in figleaf gourd [*Cucurbita ficifolia* Bouche'], a rootstock for Cucurbitaceae. Plant Biotechnology Reports, 4, 101–107.

24. Mathesius, U., Mulders, S., Gao, M., Teplitski, M., Caetano-Anolles, G., Rolfe, B. G., Bauer, W. D. (2003). Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum sensing signals. Proc Natl Acad Sci USA, 100, 1444–1449.

25. Miller, M. B., Bassler, B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. Annu. Rev. Microbiol, 55, 165–99.

26. Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15, 473–497.

27. Ortiz-Castro, R., Martinez-Trujillo, M., Lopez-Bucio, J. (2008). N-acyl-L-homoserine lactones: a class of bacterial quorum-sensing signals alter post-embryonic root development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ*, 31, 1497–1509.
28. Park, S. M., Lee, J. S., Jegal, S., Jeon, B. Y., Jung, M., Park, Y. S., Han, S. L., Shin, Y. S., Her, N. H., Lee, J. H., Lee, M. Y., Ryu, K. H., Yang, S. G., Harn, Ch. H. (2005). Transgenic watermelon rootstock resistant to CGMMV [Cucumber green mottle mosaic virus] infection. *Plant Cell Rep*, 24, 350–356.
29. Pérez-Clemente, R., Gómez-Cadenas, A. (2012). *In vitro* tissue culture, a tool for the study and breeding of plants subjected to abiotic stress conditions. *Recent Advances in Plant in vitro Culture*, 34, 92-104.
30. Rai, M., Kalia, R., Rohtas Singha, R., Gangola, M., Dhawana, A. (2011). Developing stress tolerant plants through in vitro selection [An overview of the recent progress]. *Environmental and Experimental Botany*, 71, 89–98.
31. Sakhanokho, H. F., Kelley, R. Y. (2009). Influence of salicylic acid on in vitro propagation and salt tolerance in *Hibiscus acetosella* and *Hibiscus moscheutos* [cv 'Luna Red']. *Afr. J. Biotechnol*, 21, 1474–148.
32. Schenk, S., Schikora, A. (2015). AHL-priming function via oxylipin and salicylic acid. *Front. Plant Sci*, 5, 784–794.
33. Schenk, S. T., Stein, E., Kogel, K.-H., Schikora, A. (2012). *Arabidopsis* growth and defense are modulated by bacterial quorum sensing molecules. *Plant Signaling & Behavior*, 7/2, 178–181.
34. Schuhegger, R., Ihring, A., Gantner, S. (2006). Induction of systemic resistance in tomato by N-acyl-L-homoserine lactone-producing rhizosphere bacteria. *Plant Cell Environ*, 29, 909 – 918.
35. Von Rad, U., Klein, I., Dobrev, P. I., Kottova, J., Zazimalova, E., Fekete, A., Hartmann, A., Schmitt-Kopplin, Ph., Durner, J. (2008). Response of *Arabidopsis thaliana* to N-hexanoyl-DL-homoserinelactone, a bacterial quorum sensing molecule produced in the rhizosphere. *Planta*, 229, 73–85.
36. Wang, W., Vinocur, B., Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218, 1–14.

КАЛЛУСОГЕНЕЗ ЭКСПЛАНТОВ СЕМЯДОЛЕЙ *CUCURBITA PEPO* VAR. *GIRAUMONTI* В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* ПОД ВЛИЯНИЕМ N-ГЕКСАНОИЛ-L-ГОМОСЕРИНЛАКТОНА

**О. П. Таран, Л. М. Бабенко, О. В. Мошинец, С. П. Рогальський,
О. В. Лобова, О. В. Мацкевич**

Аннотация. Регенерация эксплантов и стимуляция каллусогенеза являются актуальными задачами современной биотехнологии растений. В данной работе исследуется фитостимулирующий эффект молекулы класса ацилгомосеринлактонов (АГЛ), распространенного класса бактериальных сигнальных молекул, которые задействованы в дистанционной трансдукции сигналов между бактериями-колонизаторами фитосферы и непосредственно между бактериями и растением. Целью работы было оценить эффект обработки короткоцепочечным АГЛ – N-гексаноил-L-гомосеринлактоном [ГГЛ] эксплантов семядолей кабачка *Cucurbita pepo* var. *giraumonti* на калусогенез в условиях *in vitro*. Обработку раствором ГГЛ и ДМСО (растворитель) проводили в асептических условиях, погружая экспланты

в растворы веществ на 30 мин. Экспланты семядолей растений, которые культивировались *in vitro*, высаживали на агаризованную питательную среду для калусогенеза и культивировали при отсутствии света при температуре 25 °C. В эксперименте все экспланты формировали рыхлый каллус кремового цвета. У эксплантов, обработанных ГГЛ, установлено значительное увеличение сырой и сухой массы каллуса. Пролиферация каллуса в варианте с применением ГГЛ начиналась на несколько дней раньше, чем в контрольном варианте. Учитывая положительный эффект применения ГГЛ на пролиферацию и рост каллусной культуры на первом этапе калусогенеза уэксплантов кабачка, перспективными являются дальнейшие исследования стимулирующих эффектов ГГЛ, в частности, для оптимизации протоколов культуры растений *in vitro* и создание эффективных систем регенерации.

Ключевые слова: *Cucurbita pepo var. giraumonti*, каллусогенез, N-гексаноил-L-гомосеринлактон, АГЛ, фитостимуляторы, каллус, культура растений *in vitro*

CALLUSOGENESIS OF THE EXPLANTS *CUCURBITA PEPO* VAR. *GIRAUMONTI* IN CULTURE *IN VITRO* UNDER THE INFLUENCE OF N-HEXANOYL-L-GOMOSERINLAKTON

O. P. Taran, L. M. Babenko, O. V. Moshynets, S. P. Rogalsky,
O. V. Lobova, O. V. Matskevich

Abstract. Regeneration of the explants and stimulation of calusogenesis are topical tasks of modern biotechnology of plants. In this paper, the phyto-stimulating effect of the molecule of the class of acylgomoserinlactones (AGL), a common class of bacterial signaling molecules, which is involved in the remote transduction of signals between phytosphere bacterial colonizers and directly between bacteria and plant, is investigated. The aim of the work was to evaluate the effect of treatment of short-chain AGL – N-hexanoyl-L-homoserinlactone (HGL) the explants of the cotyledons of squash *Cucurbita pepo var. giraumonti* on callusogenesis *in vitro*. Treatment with the solution of HGL and DMSO (solvent) was carried out under aseptic conditions, immersing explants in solutions of substances for 30 minutes. Indeterminate cotyledonous plants that were cultivated *in vitro*, were planted for medium with aga-agar for callusogenesis and cultured without the light at 25 °C. In the experiment, all explants formed a loose callus of cream color. In explants, treated with HGL, a significant increase in the raw and dry weight of callus was established. The callus proliferation in the variant with AGL was started several days earlier than in the control variant. Taking into account the positive effect of the use of HGL on proliferation and the growth of callus culture in the first stage of callusogenesis of the explants squash, further research on the stimulating effects of HGL is promising, in particular, to optimize plant growth protocols *in vitro* and to create effective regeneration systems.

Keywords: *Cucurbita pepo var. giraumonti*, callusogenesis, N-hexanoyl-L-homoserinlactone, AGL, phytostimulants, callus, plant culture

in vitro

АДСОРБЦІЙНІ ВЛАСТИВОСТІ ФАРМАЦЕВТИЧНИХ ПРЕПАРАТІВ: АКТИВОВАНОГО ВУГІЛЛЯ І БІЛОГО ВУГІЛЛЯ

Л. А. ХРОКАЛО, кандидат біологічних наук, доцент кафедри фізичної хімії

Т. М. ПИЛИПЕНКО, кандидат технічних наук, доцент кафедри фізичної хімії

**Національний технічний університет України «Київський
політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»**

К. Ю. ВЕРВЕС, учень*

Мала академія наук України

E-mail: lkhrokalo@gmail.com

Анотація. Представлений огляд сучасних фармацевтичних препаратів, які використовують в якості ентеросорбентів. Для двох популярних адсорбентів – активованого вугілля та діоксиду кремнію на мікрокристалічній целюлозі (білого вугілля) – проведене експериментальне дослідження граничної адсорбції, питомої площі поверхні адсорбента і ефективності адсорбції. Встановлено, що за 35 хвилин контакту розчину оцтової кислоти з поверхнею препаратів ефективність адсорбції перевищувала 90 % в обох випадках. Порівняння показників граничної адсорбції показало, що адсорбційна ємність активованого вугілля на 27,5 % вища, ніж у білого вугілля.

Ключові слова: адсорбція, ентеросорбент, активоване вугілля, діоксид кремнію, питома площа поверхні

Актуальність. Сорбенти застосовують, в першу чергу, у разі виникнення шлунково-кишкових проблем. Травний тракт людини має загальну площу поверхні – декілька квадратних кілометрів. Ця поверхня контактує з потужною групою хімічних речовин та мікроорганізмів, які потрапляють під час вживання їжі та напоїв. Неприятливі фактори навколишнього середовища, неякісне і нераціональне харчування, шкідливі звички, зловживання ліками лише підсилюють агресивність таких впливів. Приблизно 25 % дорослого населення планети і 40 % дитячого населення страждають від алергічних захворювань, що також є маркерами екологічних негараздів. Ентеросорбенти здатні поглинати та виводити з організму ендо- та екзотоксини, фіксувати на своїй поверхні збудників бактеріальної і вірусної природи з подальшим очищенням організму. За інфекційних хвороб сорбенти вживають як засіб етіотропної терапії. Ентеросорбенти, які можна вільно придбати в аптеках України, представлені лікарськими препаратами і дієтичними добавками, які різняться за формою прийому (гранули, порошки, капсули), хімічною структурою, походженням (натуральні, синтетичні) і механізмами дії. Очевидно, що у споживачів часто виникає питання, який сорбент є більш ефективним і доцільним до застосування в конкретному випадку.

* Науковий керівник – Пилипенко Т. М.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Поняття «ентеросорбція» введено 1983 року вченими Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології НАН України як визначення сорбційної терапії за рахунок перорального прийому високоактивного вугілля сферичної грануляції [1]. З того часу фармацевтичний ринок суттєво збільшив свій асортимент і у сучасній медичній практиці використовують різноманітні сорбуючі речовини [1, 2]:

- 1) сорбенти для зовнішнього застосування у вигляді пудри-присипки або тканинних різновидів (наприклад, сорбент тканинний карбонвмісний);
- 2) сорбенти для плазмо- та гемосорбції (внутрішньосудинні сорбенти);
- 3) пероральні сорбенти чи ентеросорбенти, які ковтають, запиваючи великою кількістю води.

Загалом, ентеросорбенти повинні відповідати наступним вимогам [3]:

мати високу сорбційну ємність для забезпечення клінічного ефекту у разі прийому терапевтичних доз;

мати достатню ефективність, особливо щодо речовин з великою молекулярною масою (бактерії та їх токсини);

не викликати подразнення слизової оболонки шлунка та кишечника;

не містити токсичних домішок;

не всмоктуватись у шлунково-кишковому тракті;

діяти в широкому інтервалі рН;

не мати негативних органолептичних властивостей (смак, запах).

Перелік основних ентеросорбентів, рекомендованих фахівцями з лікувальною та профілактичною метою [2, 3, 4], наведено в таблиці 1.

Метою дослідження було визначення і порівняння параметрів адсорбційного процесу за використання активованого вугілля і діоксиду кремнію на мікрокристалічній целюлозі (білого вугілля) в якості адсорбентів. Завданнями було експериментальне встановлення граничної адсорбції, питомої площі поверхні адсорбенту і ефективності адсорбції.

Матеріали і методи дослідження. Для дослідження обрано препарати:

1. Таблетований фармацевтичний препарат “Вугілля активоване” виробництва ТОВ “Астрафарм”, м. Вишеневе, Київська обл. Блістери по 10 таблеток. Маса таблетки – 0,28 г

2. Таблетований фармацевтичний препарат “Біле вугілля” виробництва ТОВ “Омніфарма Київ”. Блістери по 12 таблеток. Одна таблетка містить 0,21 г кремнію діоксиду колоїдного безводного.

Дослід було проведено за методикою, розробленою співробітниками кафедри фізичної хімії КПІ ім. Ігоря Сікорського [5]. В якості адсорбату в експерименті використана оцтова кислота. На початку встановили концентрацію вихідного розчину оцтової кислоти за допомогою титрування 0,1 М розчином КОН. Потім приготували п'ять розчинів оцтової кислоти різних концентрацій, кожен об'ємом по 60 см³. Підготували адсорбент в кількості близько 1 г для кожної з колб. Процес адсорбції тривав 35 хвилин до встановлення адсорбційної рівноваги. Розчини відфільтрували і провели титрування фільтратів 0,1 М розчином КОН і визначили рівноважні

концентрації кислоти в кожній з колб після адсорбції. Значення адсорбції розраховували за формулою 1 для кожної з колб:

$$a = \frac{(c_0 - c)V}{m} \quad (1)$$

де c_0 – початкова концентрація кислоти, кмоль / м³;

c – рівноважна концентрація кислоти після адсорбції, кмоль / м³;

V – об'єм розчину, м³;

m – маса адсорбенту, кг.

1. Загальновживані ентеросорбенти та їх основні ознаки

Діюча речовина	Торгова назва	Форма випуска	Протипоказання
Активоване вугілля	Вугілля активоване, Сорбекс, Екстрасорб, Карбосорб, Сорбі-норм	Пігулки, капсули, порошок	Виразкові ураження ШКТ в стадії загострення, атонія кишечника
Кремнію діоксид колоїдний	Полісорб, біле вугілля, атоксил	Порошок для приготування суспензії, пігулки	
Лігнін гідролізований	Поліфан, Поліфепан	Пігулки, порошок	Виразкові ураження ШКТ в стадії загострення, атонія кишечника, шлункові кровотечі ерозійний гастрит Гострий нефрит
Повідон (Полі -1-етеніл-2-пірролідінон)	Повідон, Ентеродез	Порошок для приготування розчину для прийму перорально	
Поліметил-силоксана полігідрат	Ентеросгель	Паста для прийму перорально	Атонія кишечника.
Смектит диоктаедричний	Діосмектит, Неосмектин, Смекта, Ендосорб	Порошок для приготування суспензії	Непрохідність кишечника

За допомогою програми Microsoft Excel провели розрахунки для побудови прямої на основі лінійного рівняння Легнмюра 2:

$$\frac{c}{a} = \frac{1}{a_{\infty}} c + \frac{1}{Ka_{\infty}} \quad (2)$$

Для кожного з досліджених адсорбентів розрахувати значення граничної адсорбції (a_{∞}) як обернене значення до тангенсу кута нахилу прямої. Питому площу поверхні адсорбента визначили за формулою 3:

$$S_{num} = a_{\infty} N_A S_0 \quad , \quad (3)$$

де a_{∞} – величина граничної адсорбції, кмоль / кг;

N_A – число Авогадро ($6,023 \cdot 10^{26}$), кмоль⁻¹;

S_0 – площа, яку займає молекула адсорбату на поверхні адсорбенту.

У випадку адсорбції молекул оцтової кислоти показник визначається розміром карбоксильної групи і складає $22 \cdot 10^{-20}$ м². Ефективність адсорбції (χ , %) розраховували за формулою 4:

$$\chi = \frac{a_{max}}{a_{\infty}} \cdot 100\% \quad , \quad (4)$$

де a_{max} – максимальне експериментальне значення адсорбції, кмоль / кг.

Результати та їх обговорення. Результати, отримані на основі проведення експерименту і відповідних розрахунків занесли до таблиці 2.

2. Зведені дані експерименту для побудови графіків лінійної форми рівняння Ленгмюра

Но- мер кол- би	C_0 , кмоль /м ³	Активоване вугілля			Біле вугілля		
		C , кмоль/м ³	$a_{експ}$, кмоль/кг	$\frac{C}{a}$	C , кмоль/м ³	$a_{експ}$, кмоль/кг	$\frac{C}{a}$
1	0,368	0,326	0,00229	142,3	0,341	0,00164	208,4
2	0,257	0,221	0,001964	112,5	0,235	0,00133	176,3
3	0,147	0,117	0,001637	71,5	0,1245	0,00136	91,3
4	0,074	0,0475	0,001445	32,9	0,0593	0,00089	66,3
5	0,044	0,0237	0,001107	21,4	0,031	0,00079	39,3

На основі табличних даних побудували графіки у вигляді, що відповідає лінійному рівнянню Ленгмюра (рис. 1, рис 2.)

В результаті проведених обчислень для процесу адсорбції на активованому вугіллі були одержані наступні результати:

$$a_{\infty} = 0,00247 \text{ кмоль/кг}; \quad S_{num} = 327290 \text{ м}^2 / \text{кг}; \quad \chi = 92,7\% .$$

Адсорбція на білому вугіллі мала показники:

$$a_{\infty} = 0,00179 \text{ кмоль/кг}; \quad S_{num} = 237185 \text{ м}^2 / \text{кг}; \quad \chi = 91,6\% .$$

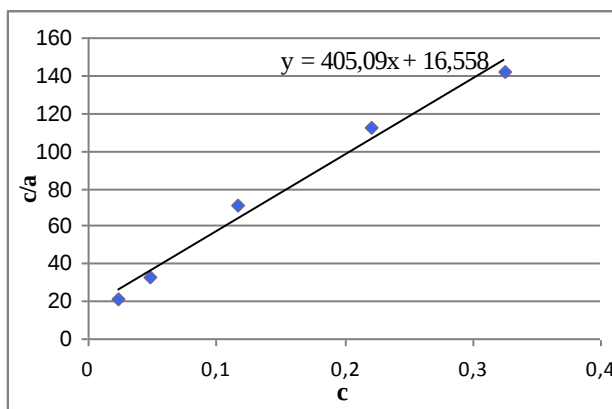


Рис. 1. Графік для визначення граничної адсорбції на активованому вугіллі

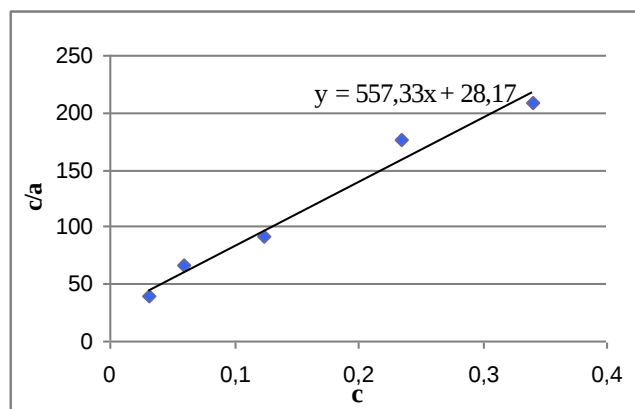


Рис. 2. Графік для визначення граничної адсорбції на білому вугіллі

Висновки і перспективи. Одержані значення показали, що обидва препарати мають задовільні адсорбційні властивості, оскільки за 35 хвилин контакту розчину оцтової кислоти з їх поверхнею ефективність адсорбції перевищувала 90 %. Порівняння показників граничної адсорбції показало, що адсорбційна ємність активованого вугілля на 27,5 % вища, ніж у білого вугілля. Таким чином, можна стверджувати, що в якості неселективного адсорбенту доцільніше використовувати активоване вугілля. Однак, слід врахувати, що організм людини є складною біохімічною системою, тому для формулювання остаточних порівняльних характеристик препаратів слід обов'язково врахувати дані клінічних досліджень та медичного досвіду вживання препаратів.

References

1. Belik, G. V. et al. (2015). Lekarstvennaia toxikologia [Official toxicology]. Kharkiv, 592.
2. Bobrova, I. A. (2015). Enterosorbenty vchora i siogodni: aspekty zastosuvannian [Enterosorbents today and yesterday. Points of application]. News of medicine and pharmacy, 3 (532), 8-11. Available at: <http://www.mifua.com/archive/article/40294>
3. Andreychyn, M. A. Et al. (1992). Vykorystannia enterosorbentiv u kompleksnomu likuvanni khvorykh na gostri kyshkov iinfektsii: Metodychni rekomendatsii. [Application of enterosorbents in complex therapy of patients with acute intestinal infections]. Ternopil, 18.
4. Yamamoto, K., Onishi, H., Ito, A. (2007). In vitro and in vivo evaluation of medical carbon granules and tablet on the adsorption of acetaminophen. Intern. J. Pharmaceuticus, 328, 105-111.
5. Rensky, I. O., Ponomarev, M. Ye., Berezhnyska, O. C., Rudnyska, G. A. (2012). Poverkhnevi iavyscha ta dyspersni systemy: metodychni vkasivky do vykonannia laboratornykh robot dlia studentiv napriamu pidgotovky "Khimichna technologia"[Surface phenomena and disperse systems: laboratorial works manual for the students of "Chemical technology" specialty]. Kyiv: NTUU "KPI", 84.

АДСОРБЦИОННЫЕ СВОЙСТВА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ:

АКТИВИРОВАННОГО УГЛЯ И БЕЛОГО УГЛЯ

Л. А. Хрокало, Т. Н. Пилипенко, К. Ю. Вервес

Аннотация. Представлен обзор современных фармацевтических препаратов, используемых в качестве энтеросорбентов. Для двух популярных адсорбентов – активированного угля и диоксида кремния на микрокристаллической целлюлозе (белого угля) – проведено экспериментальное исследование предельной адсорбции, удельной площади поверхности адсорбента и эффективности адсорбции. Установлено, что за 35 минут контакта раствора уксусной кислоты с поверхностью препаратов эффективность адсорбции превышала 90 % в обоих случаях. Сравнение показателей предельной адсорбции показало, что адсорбционная емкость активированного угля на 27,5 % выше, чем у белого угля.

Ключевые слова: адсорбция, энтеросорбент, активированный уголь, диоксид кремния, удельная площадь поверхности

ADDITIONAL PROPERTIES OF PHARMACEUTICAL PREPARATIONS: ACTIVE COAL AND WHITE COAL

L. A. Khrokalo, T. M. Pylypenko, K. Yu Verves

Abstract. An overview of recent pharmaceutical products used as enterosorbents is presented. For two popular adsorbents, such as activated carbon and silicon dioxide on microcrystalline cellulose (named white coal), an experimental study of limiting adsorption, adsorbent specific surface area and adsorption efficiency have been carried out. It was established the adsorption efficiency exceeded 90 % in both cases in 35 minutes contact of acetic acid solution with drugs surfaces. Comparison of the adsorption limit showed that the adsorption capacity of activated carbon is 27.5 % higher than that of white coal.

Keywords: adsorption, enterosorbent, activated carbon, silicon dioxide, specific surface area

ОСОБЛИВОСТІ ПРИГОТУВАННЯ ПРОБ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ РЕТРОВІРУСНОГО ЛЕЙКОЗУ ЗА ДОПОМОГОЮ ІМУННОГО БІОСЕНСОРУ

М. Ф. СТАРОДУБ, доктор біологічних наук, професор кафедри
молекулярної біології, мікробіології та біобезпеки

М. В. САВЧУК, кандидат сільськогосподарських наук, науковий співробітник

М. І. ФЕДЕЛЕШ-ГЛАДИНЕЦЬ, кандидат сільськогосподарських наук, доцент

О. П. ТАРАН, кандидат біологічних наук, старший викладач

**Національний університет біоресурсів і природокористування
України**

E-mail: taranmaruna@gmail.com

Анотація. В статті розглянуто оптимальні варіанти підготовки зразків крові та молока з метою біосенсорної діагностики ретровірусного лейкозу ВРХ та оцінки походження молочної продукції від хворих чи здорових тварин. Було проаналізовано ефективність використання проб в нативному стані та після їх обробки з видаленням з них еритроцитів, їх мембран, жирового компоненту та казеїну. Встановлено, що за виконання скринінгового аналізу він може бути здійснений з використанням зразків цільної крові та молока. Особливо це можливо в разі діагностики хвороби на етапі її прогресивного розвитку. Використання таких проб значно скорочує час виконання аналізу та забезпечує його простоту. Але в разі необхідності здійснення верифікації даних і виявлення вірусу ретровірусного лейкозу ВРХ уже в ранні періоди, то відповідно до отриманих нами результатів слід використовувати проби, підготовлені у вигляді сироватки крові чи сироватки молока. Останні слід використовувати також з метою прецизійної оцінки походження молока, особливо коли виникає необхідність контролю його якості у разі збирання від декількох тварин, серед яких могли бути хворі особини, а також на ранніх стадіях розвитку патологічного процесу.

Ключові слова: ретровірусний лейкоз, імунобіосенсорний аналіз, підготовка проб крові та молока

Актуальність. Експрес-визначення ретровірусних інфекцій серед людей та тварин є важливою глобальною проблемою. Відомо, що деякі ретровіруси викликають злоякісні пухлини та синдром набутого імунodefіциту (СНІД) у людей, лейкоз та інші захворювання. Вірус лейкозу великої рогатої худоби (ВРХ) індукує одне з декількох відомих ретровірусних інфекцій, яке впливає на велику рогату худобу в усьому світі та ендемічний у багатьох молочних стадах [1]. Велика рогата худоба будь-якого віку може бути інфікована вірусом лейкозу, але більшість з них може бути інфікована незабаром після народження через надходження молока від інфікованої корови. Тому основним способом запобігання поширенню захворювань, викликаних ретровірусною інфекцією, є своєчасна діагностика [2]. Традиційні методи виявлення вірусу лейкозу ВРХ є довготривалими і трудомісткими, тому вони не відповідають

вимогам для експресної діагностики. Для поліпшення діагнозу було розроблено ряд різних методів виявлення інфекції лейкозу ВРХ, включаючи полімеразну ланцюгову реакцію [3] та різні типи імунологічних методів, таких як ферментний імуносорбентний аналіз, імунодифузія в агаровому гелі, радіоімунний аналіз, імуноблот [4, 5] та ін. Традиційні імунологічні методи мають високу специфічність та чутливість, але більшість з них потребують багато часу та додаткових дорогих матеріалів, таких як мічені антитіла [6].

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Оскільки вірус лейкозу ВРХ є одним з найпоширеніших інфекційних агентів великої рогатої худоби та ендемічним у багатьох молочних стадах, програми контролю та ліквідації на основі швидкого, простого і чутливого способу його виявлення є необхідними. Ці вимоги можуть бути успішно вирішені за допомогою імуносенсорів [7-12]. Розроблено декілька сенсорів для виявлення цього вірусу на основі поверхневого плазмонного резонансу (SPR) [7], оптичної еліпсометрії [8], акустичної люмінесценції [9] та фотолюмінесценції [13]. Для успішного здійснення експресного біохімічного аналізу з метою діагностики ретровірусного лейкозу великої рогатої худоби за допомогою імунобіосенсорної технології особливе значення набуває відпрацювання основного алгоритму стандартизованої підготовки проб крові. В цьому відношенні слід вирішити завдання, а саме у якому вигляді необхідно використовувати зразок: цільної крові, її гемолізату або сироватки. Окрім того, інколи важливо отримати інформацію щодо походження молочної продукції, а саме встановити чи отримана вона від здорових, чи від хворих тварин. В такому випадку виникає необхідність визначити, чи наявні специфічні антитіла в молоці, що буде свідчити про стан тварин, від яких воно отримане.

Метою нашого дослідження було проведення порівняння ефективності біосенсорного виявлення вірусу лейкозу ВРХ у зразках залежно від їх препаративної підготовки. Для отримання відповідей на поставлені питання були проведені відповідні експериментальні дослідження, результати яких детально обговорюються в даній статті.

Матеріали і методи дослідження. Всі використані реагенти були отримані від фірми Millipore–Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, США). Сироватка зразків молока від здорових і хворих тварин на ретровірусний лейкоз надані були фірмою "Лейконад", Полтава. Для експериментів готували наступні варіанти проб крові: 1) цільна та нативна; 2) цільна з додаванням гепарину; 3) гемолізована, шляхом розбавлення вихідного зразка в 2 рази дистильованою водою; 4) плазма крові, отримана внаслідок видалення еритроцитів при центрифугуванні крові за 5000 об / хв.; 5) сироватка крові, що приготована в процесі згортання крові шляхом витримки її за 37 °С протягом години (для утворення згустку), а потім механічним його відокремленням від стінок пробірки і витримки проби деякий час (близько 1 години) в холодильнику.

За дослідження проб молока готували такі зразки: 1) цільне молоко; 2) молоко після видалення жирового компоненту шляхом його центрифугування за 10000 об / хв протягом 10 хвилин за допомогою приладу, 3) сироватка після видалення жирового компоненту та дії 5,0 % оцтової кислоти у співвідношенні 5:1 для отримання осаду казеїну.

Виявлення антитіл, специфічних до лейкозного ретровірусу, в зразках, що були представлені для аналізу, здійснювали за допомогою імунного біосенсора на основі повехневого плазмонного резонансу (ППР), виготовленого в Інституті кібернетики ім. В. М. Глушкова НАН України. Тотальний антиген ретровірусу лейкозу (ВРХ) був наданий фірмою "Лейконад", Полтава. Його підготовку для аналізу проводили за схемою, що була описана раніше [14-16].

Результати дослідження та їх обговорення. Загальний відгук імунного біосенсорана на основі ППР в процесі формування біочутливих шарів та за тестування сироваток крові від хворих тварин з різним рівнем розведення представлено на рис. 1.

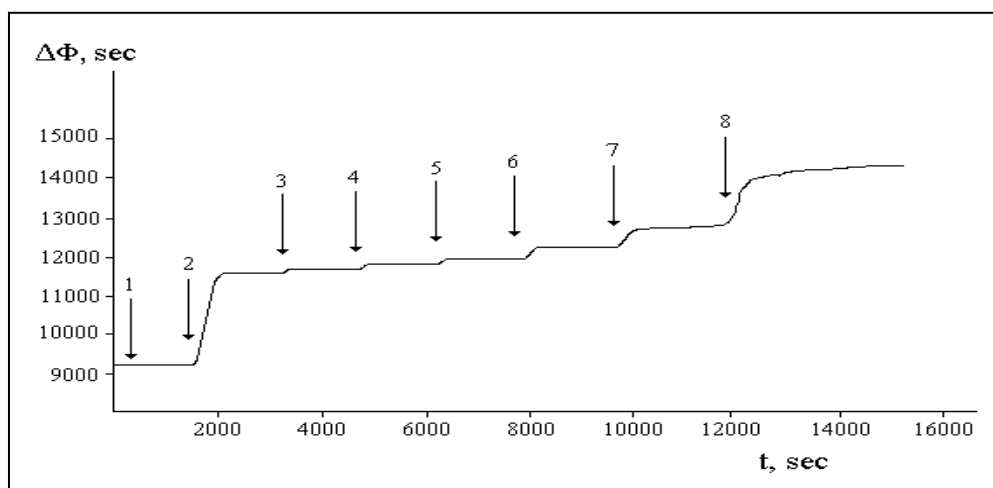


Рис. 1. Відгук імунного сенсора на внесення біологічних компонентів у комірку: 1 - ФСБ, 2 – антиген вірусу лейкозу (1 мг/мл), 3 - 1% розчин БСА, 4, 5, 6, 7, 8 - антисироватки в розведеннях: 1: 20000, 1:10000, 1:5000, 1:2500, 1: 1000 відповідно

Слід зазначити, що після промивки трансдюсера ППР трис-НСІ буфером рН 7,3 на його поверхню іммобілізували тотальний антиген вірусу лейкозу (20 мкг / мл). Після цього вільні місця, що залишились на поверхні, блокували розчином бичачого сироваткового альбуміну (БСА) за концентрації 20 мкг / мл в трис-НСІ буфері рН 7,3. Нашими попередніми дослідженнями показано, що ППР імунобіосенсор дозволяє виявляти специфічні антитіла в сироватках крові та зразках молока хворих корів при їх 10000 та 100 разовому розведенні відповідно. Разом з тим, за нанесення на раніше підготовлену трнсдюсерну поверхню вище зазначених досліджуваних зразків від здорових тварин навіть в нерозведеному стані відхилення резонансного кута ППР, якщо і спостерігається, то в межах 5 %, що не є достовірним. Таке відхилення, на нашу думку, може бути зумовленим рядом факторів, про що мова йде нижче, а саме: еритроцитами, їх мембранами, жировим компонентом та іншими, які зумовлюють неспецифічну відповідь.

Проведеними дослідженнями було встановлено, що як нативна цільна кров, так і кров із додаванням гепарину не дозволяє отримати стабільні результати (табл. 1). Це, очевидно, пов'язано з тим, що у плазмі крові можуть неконтрольовано з'являтися гемолізовані еритроцити, з одного боку,

а з іншого – гепарин, як відомо, може впливати на інтенсивність утворення комплексу антиген-антитіло, тому у цьому випадку важко стандартизувати його кількість.

Те ж саме стосувалось і зразків крові, попередньо гемолізованих розбавленням їх в дистильованій воді. Результати аналізу змінювались з часом його проведення та варіювали від одного аналізу до іншого. Очевидно, це пов'язано з досить значним вмістом мембран еритроцитів та гемоглобіну, які налипають на поверхню перетворювача. Для попередження цього слід використовувати високі концентрації твін-20 (понад 1 %), а видалення останнього з поверхні є завданням, що значно ускладнює процедуру проведення аналізу.

Виявилось, що оптимальним способом підготовки проб для аналізу є отримання з них сироватки. Цього можна досягти за допомогою досить простої процедури, а саме внаслідок підготовки зразка крові, як вказано вище в розділі "Методи". Приготований таким способом зразок сироватки крові забезпечує отримання повторюваних результатів, у яких стандартне відхилення значень коливається в межах 5 %.

1. Коливання відгуку імунного біосенсору за аналізу проб крові хворих тварин, підготовлених різними способами

№ п/п	Зразки для аналізу	Величина відгуку кута їх відхилення
1.	Цільна кров	1800,0 ± 600,0
2.	Цільна кров з додаванням гепарину	1790 ± 610,0
3.	Гемолізована кров	1700,0 ± 570,0
4.	Плазма крові	1400,0 ± 430,0
5.	Сироватка крові	1250,0 ± 72,0

В разі використання молока для аналізу, як і в попередньому випадку, нас, перш за все, цікавило, чи можна використовувати безпосередньо пробу без попередньої її підготовки, чи необхідно готувати з неї сироватку. Також необхідно було встановити умови такої пробопідготовки.

Виявилось, що зразки цільного молока, так само, як і крові, не придатні для отримання стабільних результатів аналізу. Дані експерименту коливались в межах 30-50 % стандартного відхилення, а то й більше. Ми вважаємо, що це обумовлено наявністю жирового компоненту в молоці, а також високим вмістом білкових компонентів, які здатні до неспецифічної іммобілізації на твердих поверхнях. Тому були запропоновані процедури попередньої підготовки зразків молока, які включали видалення жирового компоненту та осаду казеїну.

Слід зазначити, що для практичного використання та для конкретного набору реактивів в серії експериментів необхідно контролювати рН розчину, що утворюється після застосування оцтової кислоти. Його значення повинно бути в межах 5,0. Таким чином, підготовлені проби давали стабільні результати. За аналізу однієї і тієї ж проби, відхилення не перевищувало 10 % (табл. 2).

2. Коливання відгуку імунного біосенсору за аналізу проб молока хворих тварин, приготованих різними способами

№ п/п	Зразки для аналізу	Величини відгуку та їх відхилення
1.	Цільне молоко	800,0 ± 300,0
2.	Сиворотка після видалення жирового компоненту	750 ± 240,0
3.	Сироватка молока	880,0 ± 78,0

Висновки і перспективи. Базуючись на отриманих результатах, можна зробити наступні висновки, що стосуються двох принципових аспектів щодо особливостей підготовки проб крові та молока в разі діагностики ретровірусного лейкозу ВРХ, з одного боку, а з іншого – в разі оцінки походження молочних продуктів від здорових чи хворих тварин.

В цьому відношенні слід виділяти два принципово різних підходи за вимогами до результатів аналізу, а саме: на скринінговому та верифікаційному рівні. За виконання першого типу аналізу він може бути здійснений з використанням зразків крові та молока без попередньої підготовки. Особливо це доцільно в разі діагностики хвороби на етапі її прогресивного розвитку. Використання таких проб значно скорочує час виконання аналізу та забезпечує його простоту. Але в разі необхідності здійснити верифікацію отриманих результатів або для виявлення патогена в ранні періоди розвитку ретровірусного лейкозу ВРХ, то відповідно до наших експериментальних даних, слід використовувати проби, підготовлені в якості сироваток крові чи молока. Останні слід використовувати також з метою прецизійної оцінки походження партій молока, особливо коли виникає необхідність контролю якості молока, зібраного від декількох тварин, серед яких могли бути присутні хворі особини і, крім того, на ранніх стадіях розвитку патологічного процесу.

References

1. Kurtinaitiene, B. Ambrozaite, D. Laurinavicius, V. Ramanaviciene, A. Ramanavicius, A. (2008). Amperometric immunosensor for diagnosis of BLV infection, Biosens. Bioelectron. 23, 1547–1554.
2. Kirkland, P. D. (2005). Enzootic bovine leukosis, Aust. New Zeal. Stand. Diagnostic Proced. 1–14.
3. Hassanpour, M., Nadalian, M., Safi, S. Madani, R., Bokaie, S. (2014). Epidemiological survey of Bovine Leukemia Virus (BLV) infection and its effective factors emphasis ELISA and nested PCR in dairy herds around Babol city (North of Iran) as a Caspian climate. Eur. J. Zool. Res. 3, 166–171.
4. Balić, D., I., Lojkić, M. Periškić, T. Bedeković, A. Jungić, N. Lemo, B. Roić, Ž. Čač, L. Barbić, J. (2012). Madić, Identification of a new genotype of bovine leukemia virus, Arch. Virol, 157, P. 1281–1290.
5. Choudhury, B., Finnegan, C., Frossard, J. P., Venables, C., Steinbach, F. (2013). Colostrum replacer and bovine leukemia virus seropositivity in calves, Emerg. Infect. Dis, 19, 1027–1028.
6. Schwartz, I., Levy, D. (1994). Pathobiology of bovine leukemia virus, Vet Res. 25, 521–536.
7. Ramanaviciene, A., German, N., Kausaite-Minkstiniene, A., Voronovic, J., Kirlyte, J., Ramanavicius, A. (2012). Comparative study of surface plasmon resonance, electrochemical and electroassisted chemiluminescence methods based immunosensor

for the determination of antibodies against human growth hormone, Biosens. Bioelectron, 36, 48–55.

8. Baniukevic, J., Kirlyte, J., Ramanavicius, A., Ramanaviciene, A. (2013). Application of oriented and random antibody immobilization methods in immunosensor design, Sensors Actuators, B Chem, 189, 217–223.

9. Balevicius, Z., Ramanaviciene, A., Baleviciute, I., Makaraviciute, A., Mikoliunaite, L., Ramanavicius, A. (2011). Evaluation of intact- and fragmented-antibody based immunosensors by total internal reflection ellipsometry, Sensors Actuators, B Chem, 160, 555–562.

10. Makaraviciute, A., Ruzgas, T., Ramanavicius, A., Ramanaviciene, A. (2014). Antibody fragment immobilization on planar gold and gold nanoparticle modified quartz crystal microbalance with dissipation sensor surfaces for immunosensor applications, Anal. Methods, 6, 2134–2140.

11. Ramanavicius, A., Finkelsteinas, A., Cesiulis, H., Ramanaviciene, A. (2010). Electrochemical impedance spectroscopy of polypyrrole based electrochemical immunosensor, Bioelectrochemistry, 7, 11–16.

12. Ramanavicius, A., Oztekin, Y., Ramanaviciene, A. (2014). Electrochemical formation of polypyrrole-based layer for immunosensor design, Sensors Actuators, B Chem, 197, 237–243.

13. Viter, R., Starodub, N., Smyntyna, V., Tereschenko, A., Kusevitch, Sitnik, J., Buk, J., Macak, J. (2011). Immune biosensor based on silica nanotube hydrogels for rapid biochemical diagnostics of bovine retroviral Leukemia, Procedia Eng, 25, 948–951.

14. Pyrohova, L. V., Starodub, M. F. (2008). Immobilizatsiia antyheny retrovirusu immobilizatsiia antyheny retrovirusu leikozu velykoi rohatoi khudoby leikozu velykoi rohatoi khudoby na poverkhni imunnoho biosensora na poverkhni imunnoho biosensora. Biotekhnolohiia, 1(2), 1-75.

15. Pyrohova, L. V., Starodub, M. F. (2002). Immobilizatsiia imunoglobuliniv za dopomohoiu lektyniv pry stvorenni imunnykh sensoriv na osnovi poverkh nevoho plazmonnoho rezonansu. Ukr. biokhim. Zhurn, 74 (2), 45–50.

16. Starodub, M. F., Starodub, V. M. (2002). Biosensory: vytoky, dosiahnennia i perspektyvy. Ukr. biokhim. Zhurn, 74(4–5), 147–163.

ОСОБЕННОСТИ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПРОБ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ РЕТРОВИРУСНОГО ЛЕЙКОЗА С ПОМОЩЬЮ ИММУННОГО БИОСЕНСОРА

М. Ф. Стародуб, М. В.Савчук, М. И.Феделеш-Гладионец, О. П.Таран

Аннотация. В статье рассмотрены оптимальные варианты подготовки образцов крови и молока с целью диагностики ретровирусного лейкоза КРС и оценки происхождения молочной продукции от больных или здоровых животных. Были проанализированы эффективность использования проб в нативном состоянии и после их обработки с удалением из них эритроцитов, их мембран, жирового компонента и казеина. Установлено, что при выполнении скринингового анализа он может быть осуществлен с использованием образцов цельной крови и молока. Особенно это возможно в случае диагностики болезни на этапе ее прогрессивного развития.

Использование таких проб значительно сокращает время выполнения анализа и обеспечивает его простоту. Но в случае необходимости осуществления верификации данных и выявления вируса ретровирусного лейкоза КРС уже в ранние периоды в соответствии с

полученными нами результатами следует использовать пробы, подготовленные в виде сыворотки крови или сыворотки молока. Последние следует использовать также с целью прецизионной оценки происхождения молока, особенно когда возникает необходимость контроля его качества при сборе от нескольких животных, среди которых могут быть больные особи, а также на ранних стадиях развития патологического процесса.

Ключевые слова: ретровирусный лейкоз, имунобиосенсорный анализ, подготовка проб крови и молока

FEATURES OF PREPARATION OF SAMPLES FOR DIAGNOSTICS OF BOVINE LEUKOSIS USING THE IMMUNE BIOSENSOR

M. F. Starodub, M. V. Savchuk, M. I. Fedelesh-Gladinets, O. P. Taran

Annotation. The article discusses the best options for the preparation of blood and milk samples for the purpose of diagnosing retroviral enzootic bovine leukosis in cattle and assessing the origin of dairy products from sick or healthy animals. The effectiveness of using samples in the native state and after their processing with the removal of red blood cells, their membranes, the fat component and casein were analyzed. It has been established that when performing screening analysis it can be carried out using whole blood and milk samples. This is especially possible in the case of diagnosis of the disease at the stage of its progressive development. The use of such samples significantly reduces analysis time and makes it simpler. But if it is necessary to carry out data verification and detection of cattle retroviral leukemia virus already in the early periods, then, in accordance with the results obtained by us, samples prepared in the form of blood serum or milk serum should be used. The latter should also be used to accurately assess the origin of milk, especially when it is necessary to control its quality when collecting from several animals, among which may be sick individuals, as well as in the early stages of the development of the pathological process.

Keywords: bovine leukosis, immunobiosensor analysis, preparation of blood and milk samples

**ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ВЕРМИКУЛЬТИВУВАННЯ НА МІКРОФЛОРУ
ТВЕРДОЇ ОРГАНІЧНОЇ БІОМАСИ БІОГАЗОВОГО КОМПЛЕКСУ ПРАТ
«ОРІЛЬ-ЛІДЕР»**

О. І. СІДАШЕНКО, кандидат біологічних наук, доцент кафедри біотехнології

В. В. НІКОЛАЄВА, магістр кафедри біотехнології*

К. І. ТИМЧИЙ, науковий співробітник кафедри біотехнології

Державний вищий навчальний заклад «Український державний хіміко-технологічний університет», м. Дніпро

О. В. МИХАЙЛОВСЬКА, начальник відділу охорони навколишнього середовища ПрАТ «Оріль-Лідер»

Р. Д. ВОЛКОВ, директор ПрАТ «Оріль-Лідер»

ПрАТ «Оріль-Лідер» с. Єлизаветівка, Дніпропетровська область

О. В. УТЕШЕВ, директор птахокомплексу філії ТОВ «Вінницька птахофабрика»

Птахокомплекс філія ТОВ «Вінницька птахофабрика», м. Ладижин, Вінницька область

E-mail: microb.sidashenko@gmail.com

Анотація. Проведено вермикультивування твердої органічної біомаси, отриманої після роботи біогазового комплексу ПрАТ «Оріль Лідер» протягом 50 діб. Процес біотрансформації забезпечувала популяція черв'яків роду *Eisenia*, спеціалізована на переробку жорстких субстратів. Порівняно кількісний та якісний склад різних еколого-трофічних груп мікроорганізмів у отриманому біогумусі та контролі – органічній біомасі, яку не піддавали вермикультивуванню.

Встановлено, що на 20 добу експерименту вміст мікроміцетів у біогумусі збільшився у 7,0 разів, на 30 добу – у 19 разів, на 50 – у 15 разів порівняно з контролем. Кількість актиноміцетів на 20 добу вермикультивування збільшилась у 1,4 рази, на 30 добу – 2,2 на 50 добу – у 3 рази, а кількість амоніфікаторів на 20 добу підвищилася у 1,2 разів, на 30 добу – у 1,7 разів, на 50 добу біотрансформації – у 2,0 разів порівняно з контролем.

Ключові слова: мікрофлора, еколого-трофічні групи мікроорганізмів, вермикультивування, біогумус, тверда органічна біомаса

Актуальність. Сьогодні є надзвичайно актуальним дослідження біологічної різноманітності ґрунтової екосистеми. У агроєкосистемах мікробіота виступає одним із факторів ґрунтоутворюючого процесу, живлення рослин і фітосанітарного стану ґрунту. Відомо, що родючість ґрунтів тісно пов'язана з діяльністю ґрунтових мікроорганізмів. Мікробіота активно функціонує та формує верхній ґрунтовий горизонт, таким чином беручи участь в утворенні гумусового шару, в якому зосереджений найбільший запас органічних форм поживних елементів [9, 3]. Крім того, за

* Науковий керівник – Сідашенко О.І.

О. І. СІДАШЕНКО, В. В. НІКОЛАЄВА, К. І. ТИМЧИЙ, О. В. МИХАЙЛОВСЬКА, Р. Д. ВОЛКОВ, О. В. УТЕШЕВ, 2018

сучасними уявленнями [7, 8], вважається, що мікроорганізми є індикаторами екологічного стану та родючості ґрунтів.

Окрім відновлення та збереження родючості ґрунтів, сьогодні важливим питанням є утилізація різноманітних органічних відходів та залишків, які у перспективі можуть використовуватися як екологічно безпечні добрива.

Останнім часом виробниками аграрного сектору перевага надається екологічно безпечним стимуляторам росту, які не накопичуються у ґрунті, водоймах та продуктах харчування. Досвід багатьох країн світу свідчить про перспективність та актуальність використання біологічної біотрансформації органічних відходів шляхом вермикультивування. Тобто використання дощових черв'яків роду *Eisenia*. Оскільки виготовлені таким чином препарати здатні підвищити адаптивні властивості рослин, виконуючи роль антидепресанту, та збільшити врожаї. Продуктом вермикультивування є біогумус [10].

Біогумус – високомолекулярна органічна сполука, отримана в результаті переробки черв'яками органічних речовин і виділення у навколишнє середовище копролітів з їх кишково-шлункового тракту.

Вважають, що біогумус має позитивний вплив на підвищення агрохімічних, фізико-хімічних та біологічних показників ґрунту. У біогумусі акумульовано велику кількість макро- та мікроелементів, що безпосередньо засвоюються рослинами, він містить вітаміни, амінокислоти, антибіотики та ряд біологічно активних речовин. А також, біогумус збагачений значною кількістю корисної для ґрунту мікрофлори.

Внаслідок метанового бродіння на біогазовому комплексі ПрАТ «Оріль-Лідер» після стадії сепарації отримується тверда та рідка органічна біомаси. Основною сировиною для виробництва біогазу є органічні відходи тваринного походження – курячий послід з підстилкою, силос Сорго та стічні води цеху забою та переробки курчат-бройлерів.

Тверда органічна біомаса є цікавим та перспективним об'єктом для біотрансформації шляхом вермикультивування з метою підвищення її біологічної цінності, як біодобрива.

Мета дослідження – порівняння кількісного та якісного складу еколого-трофічних груп мікроорганізмів, виділених з твердої органічної біомаси та біогумусу, отриманого шляхом вермикультивування.

Матеріали і методи дослідження. Для переробки твердої органічної біомаси після метанового бродіння, використовували технологію вермикультивування. Процес біотрансформації забезпечувала популяція дощових черв'яків роду *Eisenia*, яка спеціалізована на переробку жорстких субстратів. Дану популяцію було сформовано на кафедрі біотехнології ДВНЗ УДХТУ. Процес біотрансформації тривав протягом 50 діб.

Для дослідження кількісного складу різних еколого-трофічних груп мікроорганізмів біогумусу та органічної біомаси використовували різні поживні середовища: МПА, Сабуро, крохмально-аміачний агар, Чапека-Докса [2, 6].

МПА (м'ясо-пептонний агар) використовували для культивування та визначення числа амоніфікаторів (*Clostridium*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Bacillus*), а також вивчення культуральних властивостей різних мікроорганізмів.

На середовищі Сабуро визначали вміст дріжджових грибів, крохмально-аміачний агар використовували для виділення актиноміцетів, що знаходяться в ґрунті, середовище Чапека-Докса – для виділення цвілевих грибів.

Морфологічні ознаки (форма, розмір) вивчали за допомогою фарбування мазків за Грамом. Ідентифікацію проводили за допомогою визначника бактерій Берджі [11].

Результати та їх обговорення. Оскільки тверда органічна біомаса після роботи біогазового комплексу – це не традиційний субстрат для проведення процесу вермикультивування, потрібно було встановити його вплив на приріст біомаси черв'яків роду *Eisenia*.

Під час процесу біотрансформації встановлювали зміну маси черв'яків роду *Eisenia* на початку, у середині – на 30 добу та в кінці експерименту – на 50 добу.

З рис. 1 видно, що на середину терміну біотрансформації субстрату маса черв'яків р. *Eisenia* збільшилася у 2,2 рази, а на кінець процесу вермикультивування – у 2,5 разів порівняно з початком експерименту. Тому можемо сказати, що дана органічна біомаса – це жорсткий субстрат, який піддається вермикультивуванню спеціалізованою популяцією черв'яків роду *Eisenia* та позитивно впливає на збільшення їх біомаси.

Досліджували кількісні та якісні показники мікрофлори біотрансформованої органічної біомаси, тобто біогумусу та у контролі. У якості контролю виступала органічна біомаса, що не піддавалася біотрансформації.

Функціонування ґрунтової мікрофлори є одним з важливих факторів, що сприяють ґрунтоутворенню, до цієї мікрофлори належать мікроміцети, актиноміцети, амоніфікатори, стрептоміцети, фосфатмобілізуючі та спороутворювальні бактерії [4].

З'ясовано кількісний та якісний склад мікробіоти біотрансформованої органічної біомаси на 20 добу експерименту.

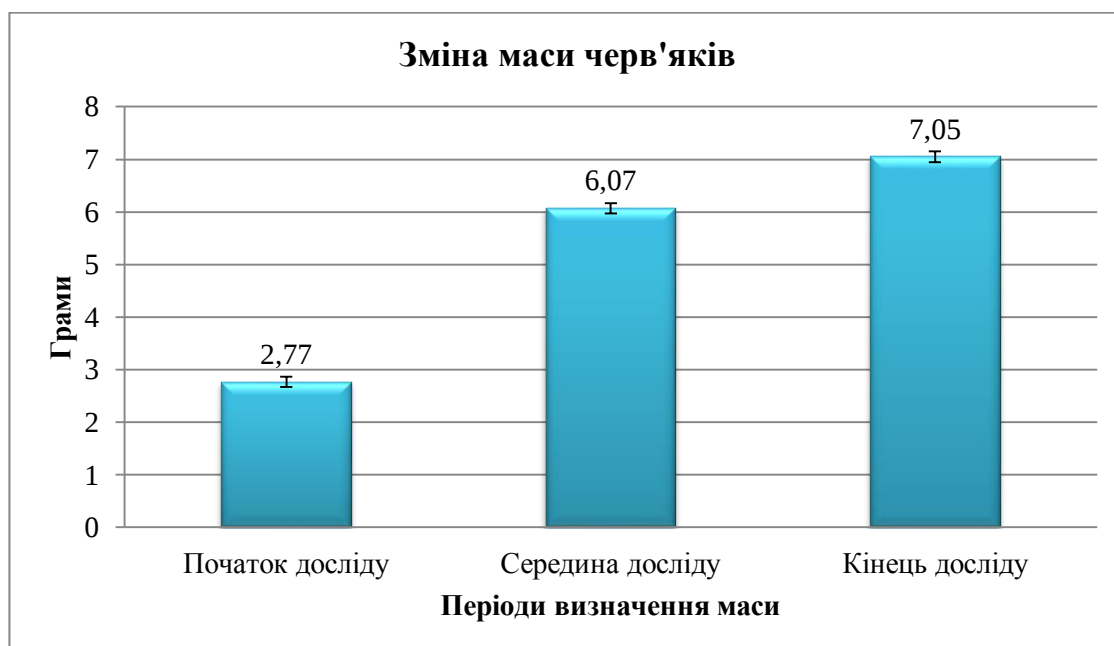


Рис. 1. Зміна біомаси черв'яків роду *Eisenia*

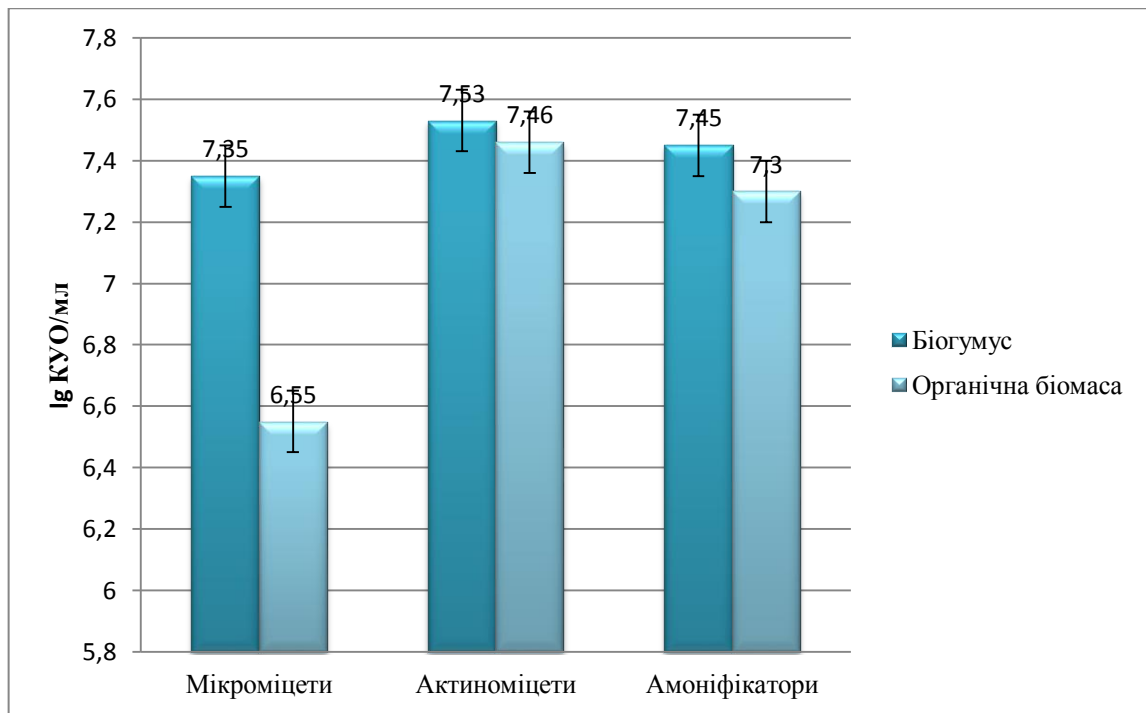


Рис. 2. Чисельність різних еколого-трофічних груп мікроорганізмів у біогумусі порівняно з контролем на 20 добу досліджень

Як видно з рисунку 2, у біогумусі вміст мікроміцетів вища у 7,0 разів, кількість амоніфікаторів – у 1,2 раза та актиноміцетів – у 1,4 раза порівняно з контролем.

Встановлено, що вміст мікроміцетів біогумусу на 30 добу експерименту у 19 разів вище порівняно з контролем, кількість актиноміцетів збільшилась у 2,2 рази, тоді як амоніфікаторів – у 1,7 раза.

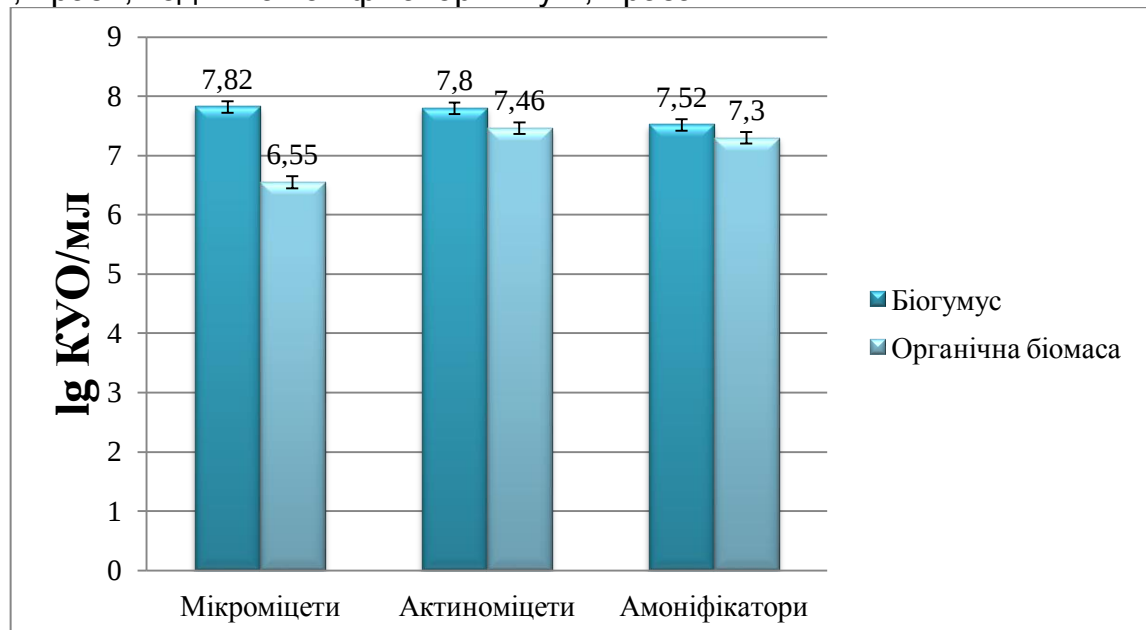


Рис. 3. Чисельність різних еколого-трофічних груп мікроорганізмів у біогумусі порівняно з контролем на 30 добу досліджень

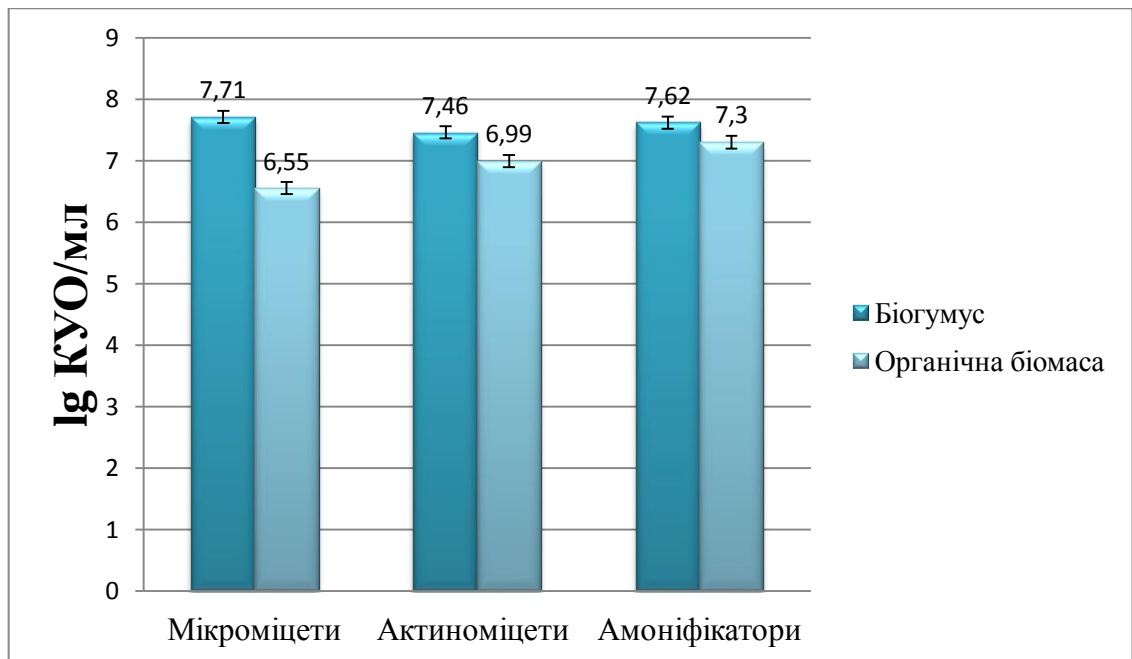


Рис. 4. Чисельність різних еколого-трофічних груп мікроорганізмів у біогумусі порівняно з контролем на 50 добу досліджень

Як видно з рисунку 4, кількість мікроміцетів у 15 разів вище, актиноміцетів – у 3 рази, а вміст амоніфікуючих мікроорганізмів – б 2,0 рази порівняно з контролем. Таким чином, чисельність різних еколого-трофічних груп мікроорганізмів на 50 добу експерименту у 1,8 разів вище, ніж у контролі.

Відомо, що актиноміцети беруть участь у мінералізації органічних речовин, які недоступні для інших мікроорганізмів та постачають рослинам елементи живлення [1], наприклад, *Streptomycesgardneri*, *Actinoplanes*. Аналогічну роль виконують амоніфікатори, які також позитивно впливають на трансформацію органічних решток у ґрунті – *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. mycoides*.

Потрібно зазначити, що мікроміцети безпосередньо впливають на родючість ґрунту, вони є консортами, що беруть участь у процесах перетворення органічної речовини, в тому числі і важкогідролізованої [5].

Висновки і перспективи. З огляду на отримані дані, можемо сказати, що найбільший вміст мікроорганізмів різних еколого-трофічних груп спостерігався на 30 добу досліджень у біогумусі порівняно з небіотрансформованою органічною біомасою. Оскільки, вміст мікроміцетів у 19 разів, кількість амоніфікаторів – у 1,7 раза, актиноміцетів – у 2,2 раза вище порівняно з контролем. Це говорить про те, що у процесі переробки популяцією черв'яків *p. Eisenia* відбувається збагачення органічної біомаси значною кількістю корисних для ґрунту мікроорганізмів.

Тверда органічна біомаса, отримана після роботи біогазового комплексу, яка є нетрадиційним субстратом для вермикультивування, показала високий приріст біомаси популяції черв'яків *p. Eisenia* та виявилась гарною основою для їх культивування, внаслідок чого збагатилася основними групами ґрунтових мікроорганізмів та може використовуватися для відновлення ґрунтового екобіоценозу. У зв'язку з цим внесення такого біодобрива сприятиме ґрунтоутворюючим процесам та покращуватиме загалом стан та родючість ґрунтів.

Останнім часом велику увагу приділяють підвищенню родючості ґрунтів, яка пов'язана з діяльністю ґрунтової мікрофлори. І одним із можливих шляхів покращення стану ґрунтової екосистеми є використання біодобрих, ефективність яких залежить від ряду факторів, які не завжди можуть задовольнятися. Альтернативою звичайним біодобривам є біогумус, який отримують шляхом вермикультивування. Тому дослідження та встановлення кількісного та якісного складу різних еколого-трофічних груп мікроорганізмів, отриманого на нетрадиційних субстратах біогумусу є надзвичайно актуальним та перспективним напрямом у вирішенні питання покращення стану та родючості ґрунтів.

References

1. Bobrik N. YU. Mikrobotsenoz gruntu luchnoi ekosistemi v umovakh vplivu zaliznichnogo transportu / N. YU. Bobrik, M.V. Krivtsova, V.I. Nikolaychuk // Visnik Dnipropetrovs'kogo universitetu. Biologiy.Yekologiya. – 2012. – T. 2 (20). – S. 3–9. (in Ukrain).
2. Zvyagintsev D.G. Metody pochvennoy mikrobiologii i biokhimii / D.G. Zvyagintsev, I. V. Aseyeva. – Moskva: Moskva, 1980. –223 s. (in Russia).
3. Zenova G. M. Praktikum po biologii pochv / G. M. Zenova, A.L. Stepanov, A.A. Likhacheva. – Moskva: Izdatel'stvo, 2002. – 120 s. (in Russia).
4. Iutinska G.O. Gruntova mikrobiologiya: Navch. posib. / G.O. Iutins'ka. – Kiiv: Aristey, 2006. – 284 s. (inUkraine).
5. Mishustin Ye. N. Pochvennye mikroorganizmy kak component biogeotsinoza / Ye. N.Mishustin. – Moskva: Nauka, 1984. – 224 s.(inRussia).
6. Patika V.P. Mikrobniy biom riznikh gruntiv gruntovo-klimatichnikh zon Poltav'skoi oblasti / V.P. Patika, S. V. Taranenko, A. O. Taranenko // Mikrobiologichniy zhurnal – 2014. –T. 76 (5). – S. 20 – 25. (in Ukraine).
7. Patika V.P. Agroyekologichniy monitoring ta pasportizatsiya silskogospodars'kikh zemel / V.P. Patika, O.G. Tarariko. – Kiiv: Fitosotsiotsentr, 2002. – 168 s. (in Ukraine).
8. Patika N.V. Suchasni problemi bioriznomanittya / N.V. Patika, V.P. Patika // Kormi i kormovirobnitstvo. – 2013. – T. 76. –S. 10 – 109. (in Ukraine).
9. Pokhvan M. F. Vermikultura: proizvodstvo i ispolzovani / M. F. Pokhvan, I.A. Melnik, V.A. Andriyenko. – Kiyev: UkrINTEI, 1994. – 128 s. (inUkraine).
10. Chandran V. Vermifiltration of Fruit Juice Processing Waste water from in Brisbane. 40 CP Vermiculture Project, School of Engineering Environment / V. Chandran. – Australia: Griffith University, 2010. – 17-20 p. (in Australia).
11. Bergey's manual of systematic bacteriology / Ed. by P. De Vos, G.M. Garrity, D. Jones et. al. – Second., Vol.3. The Firmicutes – Dordrecht, Heidelberg, London, NewYork: Springer, 2009. –1450 p. (inUSA).

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ВЕРМИКУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА МИКРОФЛОРУ ТВЕРДОЙ ОРГАНИЧЕСКОЙ БИОМАССЫ БИОГАЗОВОГО КОМПЛЕКСА ЧАО «ОРЕЛЬ-ЛИДЕР»

О. И. Сидашенко, В. В. Николаева, Е. И. Тимчий, О. В. Михайловская, Р. Д. Волков, А. В. Утешев

Анотация. В течение 50 суток проведено вермикультивирование твердой органической биомассы, полученной после работы биогазового

комплекса ЧАО «Орель-Лидер». Процесс биотрансформации обеспечивала популяция червей р. *Eisenia*, специализированная на переработке жестких субстратов. Исследовали количественный и качественный состав различных эколого-трофических групп микроорганизмов в полученном биогумусе и контроле – органической биомассе, которую не подвергали вермикультивированию.

Установлено, что на 20 сутки эксперимента количество микромицетов в биогумусе увеличилось в 7,0 раз, на 30 сутки – в 19 раз, на 50 сутки – в 15 раз по сравнению с контролем.

Количество актиномицетов на 20 сутки вермикультивирования увеличилась в – 1,4 раза, на 30 сутки – 2,2 раза, на 50 сутки – в 3 раза, а количество аммонификаторов на 20 сутки повысилось в 1,2 раза, на 30 сутки – в 1,7 раза, на 50 сутки биотрансформации– в 2,0 раза по сравнению с контролем.

Ключевые слова: микрофлора, эколого-трофические группы микроорганизмов, вермикультивирование, биогумус, твердая органическая биомасса

INVESTIGATION OF EFFECT OF VERMICULTIVATION ON THE MICROFLOOR OF THE SOLID ORGANIC BIOMASS OF THE BIOGAS COMPLEX

O.I. Sidashenko, V.V. Nikolaeva, K. I. Timchyi, O.V. Mykhaylovskaya,
R.D. Volkov, O.V. Uteshev

Abstract. In agroecosystems, the microbiota acts as one of the factors of soil-forming processes, plant nutrition and the phytosanitary state of the soil. It is known that the fertility of soils is closely related to the activity of soil microorganisms.

Functioning of the soil microflora is one of the important factors contributing to soil formation. This microflora includes micromycetes, actinomycetes, ammonifiers, streptomycetes, phosphatimobilizing and spore-forming bacteria.

Recently, producers of the agrarian sector have a preference for environmentally friendly fertilizers that do not accumulate in soil, water bodies and foodstuffs. The experience of many countries of the world testifies to the promising and relevant use of biological biotransformation of organic waste by vermiculturing. That is, the use of earthworms of the genus *Eisenia*. The product of vermicultivation is a biohumus. The biohumus contains amino acids, macro- and trace elements, vitamins, antibiotics and enriched with a useful microflora.

As a result of methane fermentation in the biogas complex after the separation stage, solid organic biomass remains. This organic fraction is an interesting and promising object for biotransformation by means of vermiculturing in order to increase its biological value, as biofertilizers.

Therefore, the purpose of the study was to compare the quantitative and qualitative composition of ecological trophic groups of microorganisms isolated from solid organic biomass and biohumus, obtained by vermicultivation.

For the processing of solid organic biomass after methane fermentation, the technology of vermicultivation was used. The process of biotransformation

was provided by a population of earthworms of the genus *Eisenia*, which specializes in the processing of rigid substrates. The process of vermicultivation lasted 50 days.

Various nutrient media were used to study the quantitative composition of various ecological-trophic groups of microorganisms of biohumus and organic biomass: MPA, Saburo, starch-ammonia agar, Chapek-Doksa, nutrient medium of Menkina.

Morphological signs (shape, size) were studied by staining smears on Gram. Identification was carried out using the Bergi determiner.

Quantitative and qualitative composition of ecological trophic groups of microorganisms of the obtained biohumus was investigated in comparison with control. Organic biomass no-biotransformation acted as control.

It was established that for 20 days of the experiment, the number of micro-micrets in the biohumus increased 7,0 times, for 30 days – 19 times, for 50 days – 15 times compared with the control.

The number of actinomycetes per 20 days of vermicultivation increased by – 1,4 times, for 30 days – by 2,2 per 50 days – by 3 times, and the amount of ammonifiers for 20 days increased by 1,2 times, for 30 days – by 1,7 times, for 50 days biotransformation – in 2,0 times in comparison with the control.

Thus, the highest content of microorganisms of various ecological trophic groups was observed for 30 days of studies in biohumus, which was obtained by vermicultivation in comparison with control. This suggests that in the process of processing a population of worms of the genus *Eisenia*, the organic biomass enriches with a large amount of soil-friendly microorganisms.

Keywords: *microflora, ecological-trophic groups of microorganisms, vermicultivation, biohumus, solid organic biomass*

ВИКОРИСТАННЯ ISSR-АНАЛІЗУ ДЛЯ ВИВЧЕННЯ ВНУТРІШНЬО-ГЕНЕТИЧНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ РІЗНИХ ГРУП КУЛЬТУРНОЇ ПОПУЛЯЦІЇ ЧЕРВ'ЯКІВ РОДУ *EISENIA*

К. І. ТИМЧИЙ, науковий співробітник кафедри біотехнології
Український державний хіміко-технологічний університет,
м. Дніпро

О. І. МЕТЛИЦЬКА, доктор сільськогосподарських наук, професор
С. М. КОРИННИЙ, кандидат сільськогосподарських наук
Інститут свинарства і агропромислового виробництва НААН,
м. Полтава

В. Т. СМЕТАНІН, доктор сільськогосподарських наук, професор
Український державний хіміко-технологічний університет,
м. Дніпро

E-mail: holoddnepr@i.ua

Анотація. Відомо, що молекулярно-генетичні методи здатні забезпечити дослідників новими та більш точними засобами для розмежування видів дощових черв'яків та встановлення філогенетичних відстаней між ними.

Тому досліджували застосовуючи нейтральні молекулярні маркери, ISSR (Inter-SimpleSequenceRepeat) внутрішньо-генетичний поліморфізм дощових черв'яків роду *Eisenia* з масиву вермікультури кафедри біотехнології, які були опромінені лазером типу ЛГН-208Б за різними експозиціями у часі та культивувались на різних органічних субстратах.

Застосування методу ISSR-ПЛР полягає у використанні мікросателітних локусів як ділянок випалу праймерів, комплементарних мікросателітним повторам. Такі праймери дають можливість ампліфікації фрагментів ДНК, які розташовані між мікросателітними послідовностями. Отримані паттерни є видоспецифічними.

Дослідження показали, що лінія тварин має досить високий рівень гетерогенності, не зважаючи на те, що походить з шести особин одного масиву, саме дія лазерного опромінення і жорсткий субстрат вирощування (донні поклади) виявилися потужними факторами селективного тиску.

Ключові слова: генетична мінливість, молекулярні маркери, мікросателітні локуси

Актуальність. Генетична різноманітність популяції визначає її здатність адаптуватися до безпосереднього оточення в процесі природного відбору. За низьких показників внутрішньо-популяційного поліморфізму знижується кількість можливих комбінацій генів, які сприяють адаптації до навколишнього середовища, та зменшують ймовірність того, що в цій популяції виникнуть нові пристосовані генотипи. Таким чином, популяція в природних умовах потребує відповідного рівня генетичного різноманіття для виживання під тиском постійно мінливих біотичних і абіотичних компонентів

екосистеми. В процесі штучного відбору сільськогосподарських тварин спостерігаються закономірності, аналогічні тим, які відбуваються в природних популяціях. Серед генетично-поліморфних зразків селекційних популяцій виділяються індивідуальні генотипи, що володіють ознаками, які дозволяють даній сільськогосподарській культурі виживати в умовах запрограмованих навколишнім середовищем або успішно протистояти стрес-факторам. Тому за розробки ефективних селекційних програм необхідні джерела генетичної різноманітності [13].

Рівень генетичного поліморфізму як природних популяцій, так і культурних найбільш ефективно визначається за допомогою ДНК-маркерів. Крім оцінки біорізноманіття, молекулярні маркери застосовуються для дослідження походження, доместикації видів і їх подальшої міграції, отримання інформації щодо філогенетичних взаємин між видами, а також для географічної локалізації популяцій, що мають різне генетичне походження [11].

Застосування нейтральних молекулярних маркерів, таких як ISSR (Inter-SimpleSequenceRepeat), порівняно рівномірно розподілених за геномом безхребетних, дозволяє одночасно визначити мінливість за групою не пов'язаних між собою локусів, що особливо цінно для збереження і використання генетичних ресурсів. Така інформація дає можливість оцінити генетичний дрейф, що відбувається в екосистемах, а також ефективно проводити моніторинг культурних популяцій і ліній сільськогосподарських тварин [1].

Для створення ISSR-маркерів використовують праймери, комплементарні мікросателітним повторам (4-12 одиниць повтору) і несуть на одному з кінців послідовність з двох-чотирьох довільних нуклеотидів (так званий "якір"). Такі праймери дозволяють ампліфікувати фрагменти унікальної ДНК, які знаходяться між двома досить близько розташованими мікросателітними послідовностями. В результаті ампліфікують велике число фрагментів, представлених на електрофореграмі дискретними смугами (ISSR-фінгерпрінтинг). Отримані ПЛП-продукти відносяться до маркерів домінантного типу успадкування, поліморфізм яких тестується за наявності / відсутності смуги. Для створення ISSR-маркерів не потрібно попереднього знання нуклеотидної послідовності досліджуваної ДНК. Метод має гарну відтворюваність і може бути з успіхом використаний для виявлення міжвидової і внутрішньо-видової генетичної мінливості, ідентифікації біооб'єктів різного таксономічного рангу, а в ряді випадків і для індивідуально гогенотипування [7, 8].

У зв'язку з тим, що існує багато суперечливих даних видової приналежності в систематиці сімейства Lumbricidae метою даного дослідження є аналіз інформативності ISSR-маркерів за дослідження всередині-генетичного поліморфізму культурної популяції ліній дощового черв'яка роду *Eisenia*, які культивуються на жорстких субстратах різної органічної природи [14].

Мета дослідження – дослідити генетичний поліморфізм популяції черв'яків роду *Eisenia*, яка сформована із шести тварин початкового масиву методом розведення „в собі.”

Матеріали та методи дослідження. Біологічний матеріал для досліджень сформовано наступним шляхом. Спочатку було 6 статевозрілих особин невизначеного виду роду *Eisenia* і шляхом культивування масив тварин розмножили до 300 особин. Потім з масиву відібрали 120 не статевозрілих тварин, яких розділили за групам 20 особин у групі. На кожен з груп подіяли лазером ЛГН-208Б з довжиною хвилі 0,63 мкм та потужністю випромінювання 1 мВт., за експозиціями: 5; 10; 15; 20; 25; 30 хвилин опромінення. Черв'яків цих груп увесь час культивували на двох різних субстратах: звичайний ґрунт + органічні відходи та донні поклади водоймища + органічні відходи. Наступне покоління F1 від кожної батьківської групи відібрали і також культивували на аналогічних субстратах.

Для досліджень за ISSR праймерами були використані такі зразки:

1-група експерименту: тварини утримувались на субстраті ґрунт і не були опромінені;

2-група: тварини були опромінені лазером 15 хвилин і утримувались на субстраті ґрунт;

3-група: F1 (перше покоління, батьки опромінені лазером протягом 15 хвилин) утримувались на субстраті «ґрунт»;

4- група: тварини утримувались на субстраті «донні поклади» і не підлягали лазерному опроміненню;

5-група: тварини були опромінені 15 хвилин і утримувались на субстраті «донні поклади»

6-а група: F1 (перше покоління, батьки опромінені 15 хвилин) утримувались на субстраті «донні поклади»

7-група: технологічний вид, що штучно культивується на одній із промислових верміферм.

Виділення ДНК. Виділення ДНК із біологічного матеріалу (особини не визначеного виду роду *Eisenia*) проводили з використанням стандартного комерційного набору “ДНК-сорб В”, (“Амплісенс”, НДІ Епідеміології, Москва, Росія) наступним чином.

Кожен зразок ДНК отримували із однієї особини. Матеріалом для роботи слугували всі тканини черв'яків, які зберігалися в етанолі за температури мінус 18-20°C. Перед процедурою екстракції ДНК, біологічні проби ретельно розтирали у скляному гомогенізаторі.

Методика ISSR-аналізу. Ампліфікацію ДНК проводили шляхом ISSR-ПЛР у 25 мкл реакційної суміші. Склад реакційної суміші для проведення ISSR-ПЛР (з використанням комерційного набору «TermoFisherScientific» (Fermentas) (Масачусетс, США): реакційний буфер Phusion (2 од/мкл) із 7,55 мМ MgCl₂ – 2,5 мкл. Суміш dNTP – 3,0 мкл; 100 пМ праймера – (0,5-1,0) мкл; від 2 до 4 одиниць активності Таг-полімерази – (2,0-4,0) мкл; (0,1-0,2 нг) ДНК-зразка – (1-3) мкл; вода деіонізована (в необхідній кількості до досягнення загального об'єму суміші 25 мкл). Структура праймерів, що були використані для генетичного аналізу особин різних груп роду *Eisenia* та їх кодові позначення, наведені в табл.1.

1. Структура і температурний режим випалювання ISSR праймерів, використаних в роботі

Назва праймерів	Структура праймерів	%GC	Температура випалювання
S1	3'-AGCAGCAGCAGCAGCAGCC-5'	68,42	57
S2	3'-AGCAGCAGCAGCAGCAGCG-5'	68,42	57
S3	3'-ACC ACC ACCACCACCACC G-5'	68,42	60
S5	3'-ATGATG ATGATGATGATG C-5'	36,84	57
UBC873	3'- GAC AGA CAG ACA GAC A-5'	50,00	60

Програма ампліфікації була наступна: за праймерами S3, UBC 873: 1 цикл: 94 °C - 4хв; 2 - 31 цикл: 60°C- 2хв; 72°C – 4хв; 94°C – 1хв; 32 цикл : 60°C - 3хв; 72°C - 7хв.

Програма ампліфікації за праймерами S1, S2, S5: 1 цикл: 94°C - 4хв; 2 - 31 цикл: 57°C - 2хв; 72°C – 4хв; 94°C – 1хв; 32 цикл: 57°C - 3хв; 72°C - 7 хв.

Електрофоретичне розділення ампліфікованих ділянок ДНК в технології ISSR проводили у 2 %-вому агарозному гелі у тріс-боратному електрофорезному буфері (TBE: 0.0879 М Тріс, 0.089 М борна кислота, 0.002 М ЕДТА рН 8.0) [5, 6].

Статистичний аналіз даних. ISSR-профілі відображали на папері з нанесеною міліметровою сіткою у масштабі 1:2, згідно відстані в мм між смугами маркера молекулярної маси. Для визначення алельних частот і проведення генетико-популяційного аналізу на основі опрацьованих ISSR-профілів окремих особин кожної групи дослідів створювали матрицю вихідних даних для їх розрахунку за присутності (1) або відсутності (0) смуги в певному положенні профілю. Матрицю вихідних даних вносили у відповідний файл стандартної комп'ютерної програми GELSTAT призначеної для обробки даних полілокусного типування [15].

Результати дослідження та їх обговорення. Оцінка інформативності а отже придатності кожного ISSR праймера для проведення подальшого міжмікросателітного аналізу з визначення рівня генетичного поліморфізму кожної групи дослідів особин роду *Eisenia* виконувалася шляхом використання техніки приготування ДНК-сумішей, яку було описано вище. Найбільш придатними для ідентифікації генетичної різниці між дослідними групами, залежно від використаних факторів зовнішнього тиску на обрані мікропопуляції, виявилися праймери, що складаються із фрагментів мікросателітних локусів (AGC) 6 С і (GACA) 4, тобто S1 та UBC873. Відмітимо, що за допомогою праймера S1 нами було ідентифіковано сумарно лише 9 продуктів ампліфікації, проте, лише один з виявлених локусів був мономорфним, а загальна частка поліморфних локусів була максимальною серед виявлених іншими застосованими ПЛР-праймерами і склала 88,9 % (табл. 2).

2. Інформативність ISSR- праймерів, що застосовані у досліді

Структура праймерів	Загальна кількість паттернів	Кількість мономорфних локусів	Кількість поліморфних локусів	Частка поліморфних локусів
---------------------	------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	----------------------------

S1:(AGC) ₆ C	9	1	8	88,9
S2:(AGC) ₆ G	16	4	12	75,0
S3: (ACC) ₆ G	12	3	9	75,0
S5: (ATG) ₆ C	20	5	15	75,0
UBC873: (GACA) ₄	13	3	10	76,9

Високим рівнем інформативності виявився також і тетрануклеотидний безякірний праймер (GACA)₄, що дозволив отримати ДНК-паттерни із загальною кількістю 13 ампліконів, водночас частка виявлених поліморфних локусів сягала 76,9 %.

Внутрішньовидова неоднорідність серед аналізованих груп дощового черв'яка роду *Eisenia*, що виявлена за допомогою ISSR-маркерів, відображена в таблиці 3, у якій представлені середні генетичні дистанції між генотипами всередині досліджуваного виду, та генетичні дистанції між проаналізованими групами.

За зіставлення характеру розподілу розрахованих частот алелей (ампліконів) у представників різних груп дослідження особливу увагу привертає порівняльна характеристика представників суміжних генерацій: 2 і 3 групи експерименту – особини, що підлягали дії лазерного опромінення протягом 15 хвилин та їх потомки, 5 і 6 групи – особини, що вирощувалися на донних покладах і підлягали дії лазерного опромінення та їх потомки, відповідно.

У особин третьої групи були виявлені амплікони розміром 1120 п. н., що зустрічалися із частотою 0,4 у даній виборці, проте, були відсутні у їх батьків взагалі. Водночас виявлена різниця не була статистично вірогідною (за критерієм Фішера). У представників 5 і 6 груп спостерігалася аналогічна тенденція за цим генетичним локусом: частота амплікону 1120 п. н. дорівнювала 0,2 у батьківських форм, що підлягали дії лазерного опромінення і вирощувалися на збідненому субстраті у вигляді донних покладів, проте у їх потомків першого покоління частота цього алеля сягала 0,6 (різниця порівняно із 2 групою вірогідна, $p < 0,05$).

3. Порівняння частоти та розмірів ДНК-фрагментів технології ISSR з праймерами S1, S2, S3, S5, UBC 873 особин роду *Eisenia*.

№ ДНК-фрагменту	Розмір ДНК-фрагменту	Групи тварин						
		1	2	3	4	5	6	7
1	3000	0,000	0,000	0,000	0,200	0,000	0,000	0,000
2	2700	0,000	0,000	0,000	0,000	0,200	0,200	0,200
3	2300	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200
4	1550	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200
5	1425	0,400	0,400	0,400	0,400	0,400	0,200	0,600
6	1310	0,200	0,000	0,000	0,000	0,000 ^a	0,400*	0,200
7	1200	0,600	0,600	0,600	0,600	0,800	0,600	0,600
8	1120	0,200	0,000^a	0,400*	0,200	0,200	0,600*	0,400
9	1080	0,400	0,200	0,600	0,400	0,200	0,400	0,400
10	1040	0,200	0,000	0,000	0,000	0,000	0,200	0,200
11	1000	0,200	0,400	0,400	0,200	0,000^a	0,600*	0,400
12	975	0,400	0,400	0,400	0,200	0,200	0,000	0,200

13	950	0.200	<u>0.400</u>	<u>0.000</u>	0.400	0.200	0.600	0.400
14	925	0.200	0.200	0.000	0.000	<u>0.400</u>	0.000	0.000
15	900	0.400	0.400	0.600	0.400	0.200	0.400	0.400
16	875	<u>0.000</u>	0.200	<u>0.000</u>	0.200	0.200	0.200	0.200
17	840	0.400	0.200	0.400	<u>0.600*</u>	0.200	0.200	0.200 ^a
18	800	0.400	0.400	0.400	0.400	0.400	0.600	0.400
19	770	0.200	0.200	0.400	0.200	0.400	0.400	0.400
20	655	0.400	0.200	0.200	0.200	0.200	0.400	0.200
21	635	0.000	0.000	0.200	0.200	0.000	0.200	0.000
22	600	0.200	0.200	0.200	0.200	0.000	0.200	0.200
23	595	0.000	0.000	0.000	<u>0.200</u>	0.000	0.000	0.000
24	575	0.200	0.200	<u>0.000</u>	0.200	0.200	0.200	0.200
25	565	0.200	0.200	0.200	<u>0.000</u>	0.200	0.000	0.200
26	540	<u>0.000</u>	0.400	0.400	0.400	0.400	0.200	0.200
27	525	0.000	0.200	0.200	0.200	0.000	0.000	0.200
28	520	0.400	0.200	0.000	0.200	0.200	0.200	0.000
29	500	<u>0.200</u>	0.400	0.400	0.400	0.400	0.400	<u>0.600*</u>
30	440	0.200	0.400	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200
31	410	0.200	0.000	0.000	0.000	0.000	0.200	0.000
32	370	0.000	0.000	0.200	0.200	0.200	0.000	0.000
33	360	0.200	0.200	0.200	0.000	0.000	0.200	0.200
34	325	0.000	0.000	0.200	0.200	0.200	0.200	0.000
35	300	0.200	0.000	0.000	0.000	0.000	0.200	0.200
36	250	0.000	0.000	<u>0.2000</u>	0.000	0.000	0.000	0.000

Примітка: $P < 0,5$, критерій Фішера

Суттєва, але невірогідна різниця була зафіксована нами за частотою розподілу алелі розміром 1310 п. н. у особин суміжних генерацій (групи 5 і 6): у батьківських особин ця алель була відсутня, проте, у потомків першого покоління її частота уже складає 0,4. Аналогічні закономірності спостерігалися за частотами розподілу алелей у 5 і 6 груп досліджу: частоти ампліконів розміром 1080 і 1040 п.н. збільшилися вдвічі проти цих показників у батьківських форм за статистично невірогідної різниці.

За частотою розподілу алелі розміром 1000 п. н. зафіксовано статистично вірогідну різницю: у батьківських форм (група досліджу 5) ця алель була відсутня, а у потомків першого покоління (група 6) її частота сягала 0,6 ($p < 0,5$). Алель розміром 925 п.н., що зустрічалася у особин 5 групи з частотою 0,4 була елімінована повністю у їх потомків. Відмітимо, що аналогічні тенденції нами спостерігалися для 2 і 3 груп досліджу – алель розміром 925 п. н. зустрічалася у 20 % батьківських форм 2 групи досліджу, проте у їх потомків вона не виявлена взагалі.

Унікальні алелі розміром 3000 п. н. та 595 п. н. були виявлені із частотою 0,2 лише у представників 4 групи, що вирощувалися на збіднених субстратах (донні поклади). Також виявилася унікальною алель розміром 250 п. н., яка нами ідентифікована у 20 % особин 3 групи.

Отже, виходячи із проведеного порівняльного аналізу частотного розподілу алелей слід зауважити, що дія лазерного опромінення і збіднений субстрат вирощування (донні поклади) виявилися потужними факторами селективного тиску, які призвели до втрати/появи нових алелей та суттєвим

змінам їх частот за окремими генетичними локусами у потомків першого покоління.

Надзвичайно цікавим виявився результат аналізу показників генетичної схожості між різними групами особин роду *Eisenia* табл. 4.

4. Рівні генетичної схожості за результатами ISSR типування особин різних груп досліджу роду *Eisenia*

Рівні схожості	1	2	3	4	5	6	7
1	0,000	0.262	0.261	0.247	0.245	0.268	<u>0.253</u>
2		0,000	0.278	0.277	0.275	0.263	0.273
3			0,000	0.289	0.282	0.291	0.301
4				0,000	0.265	0.265	0.270
5					0,000	0.256	0.277
6						0,000	0.314
7							0,000

Найнижчий рівень генетичної схожості був визначений між представниками контрольної батьківської групи та особинами четвертої і п'ятої груп (наступне покоління, вирощені в стандартних умовах, які надалі підлягали впливу різних факторів добору): 0,247 та 0,245, відповідно. Не виключно, що це є свідченням існування природних механізмів підтримки генетичної мінливості в популяціях особин роду *Eisenia*. Найбільш генетично подібними виявилися особини 7 групи (черви, що вирощувалися в стандартних умовах технічної верміферми) та представники вибірки 6 групи (потомки батьківських форм 5 групи, що вирощувалися на донних покладах і підлягали дії лазерного опромінення). Фактор збільшення генетичної подібності може бути пояснений неможливістю уникнення інбридингу і переходу алелей більшості локусів у гомозиготний стан при тучному вирощуванні черв'яків на верміфермах, особливо за використання незбалансованих, органічно збіднених субстратах.

Висновки і перспективи. Використання нейтральних молекулярних маркерів, таких як ISSR, порівняно рівномірно розподілених за геномом дощового черв'яка роду *Eisenia*, дозволяє одночасно визначити генетичну мінливість серед груп тварин, яка, в свою чергу, є підтвердженням, що дія лазерного опромінення і жорсткий субстрат вирощування (донні поклади) виявилися потужними факторами селективного тиску, та призвели до втрати/появи нових алелей і суттєвих змін їх частот за окремими генетичними локусами. Теоретична концепція результату представлених досліджень може бути використана як фактор відбору для отримання генетичної мінливості серед закритих популяцій дощових черв'яків, які культивуються у вермігосподарствах.

References

1. Altukhov YU. P. Polimorfizm DNK v populyatsionnoy genetike / YU. P. Altukhov, Ye.A. Salmenkova // Genetika. – 2002. – Т. 38. – С. 1173–1195.
2. Bannikova A.A. Molekulyarnyye markery i sovremennaya filogenetika mlekopitayushchikh / A.A. Bannikova // Zhurn. Obshchey biologii. – 2004. – Т. 65. – С. 278–305.

3. Maniatis T. Molekulyarnoye klonirovaniye / T.Maniatis., E.Frich., D.Sembruk - Moskva: Mir, 1984. – 479 s.
4. Matveyeva T.V., Molekulyarnyye markery dlya vidoidentifikatsii i filogenetiki rasteniy / T.V. Matveyeva, O.A. Pavlova, D.I. Bogomaz // Ekol. genetika. - 2011. – T. 9. – S. 32–43.
5. Karpishchenko A.I. Meditsinskiye laboratornyye tekhnologii. Spravochnik / A.I.Karpishchenko. - Sankt-Peterburg: Intermedika – 2002. – T. 2. – 600 s.
6. Metlits'ka O.Í. Metodichní í prikladní osoblivostí vikoristannya ISSR-PCR markuvann vnutrishn'o- i mizhporodnoí mínlivostí sviney / O.Í. Metlits'ka // Mízhvídomchiy tematicniy naukov. zbírník «Rozvedennya í genetika tvarin». – 2008.- T. 42. – S. 187-197.
7. Serebrovskiy A.S. Geneticheskiy analiz / A.S. Serebrovskiy. – M: Nauka, 1970. – 342 c.
8. Smaragdov M.G. Total'naya genomnaya selektsiya s pomoshch'yu SNP kak vozmozhnyy uskoritel' traditsionnykh selektsii / M.G. Smaragdov // Genetika.- 2009. – T. 45. – S. 725–728.
9. Sulimova G.Ye. DNK-markery v geneticheskikh issledovaniyakh: tipy markerov, ikh svoystva i oblasti primeneniya / G.Ye. Sulimova // Usp. sovrem. biologii. – 2004. – T. 1214. – S. 260–271.
10. Khlestkina Ye.K. Molekulyarnyye metody analiza strukturno-funktsional'noy organizatsii genov i genomov vysshikh rasteniy / Ye.K. Khlestkina // Vavilov. zhurn. genet. i selektsii. – 2011. - T. 15(4). – S. 757–768.
11. Buckley T.R. Phylogenetic analysis of New Zealand earthworms (Oligochaeta: Megascolecidae) reveals ancient clades and cryptic taxonomic diversity. / T.R. Buckley, S. James, J. Allwood // Mol. Phylogenet. Evol. – j2011. – T. 58. – P. 85-96.
12. Decaëns T. Potentia of DNA barcoding for earthworm research in taxonomy and ecology / T. Decaëns, D. Porco, R. Rougerie // Appl. Soil Ecol. – 2013. – T. 65 (35-42) <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.01.001>
13. Diamond J. Evolution, consequences and future of plant and animal domestication / J. Diamond // Nature. – 2002. – Vol. 418. – P. 700–707.
14. Perez-Losada M. Taxonomic assessment of Lumbricidae (Oligochaeta) earthworm genera using DNA barcodes / M. Perez-Losada, R. Bloch, J.W. Breinholt // Eur. J. Soil Biol. – 2012. – T. 48. – P. 41-47.
15. Rogstad S. Rogstad S.GELSTATS: acomputerprogram for population genetics analyses using VNTR multilocusprobedata / S. Rogstad, S. Pelican // BioTechniques. – 1996. – V. 21 (6). – P. 187-196.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ISSR-АНАЛИЗА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВНУТРИННЕ-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА РАЗЛИЧНЫХ ГРУПП КУЛЬТУРНОЙ ПОПУЛЯЦИИ ЧЕРВЕЙ РОДА *EISENIA*

Е. И. Тимчий, Е. И. Метлицкая, С. М Коренной, В. Т. Сметанин

Аннотация. Известно, что молекулярно-генетические методы способны обеспечить исследователей новыми и более точными средствами для разграничения видов дождевых червей и установления филогенетических расстояний между ними.

Исследовали, применяя нейтральные молекулярные маркеры, ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) внутренне-генетический полиморфизм дождевых червей рода *Eisenia* из массива вермикюльтуры кафедры биотехнологии, которые были облучены лазером типа ЛГН-2086 по

разным экспозициям во времени и культивировались на различных органических субстратах.

Применение метода ISSR-ПЦР заключается в использовании микросателлитных локусов как участков обжига праймеров, комплементарных микросателлитным повторам. Такие праймеры дают возможность амплификации фрагментов ДНК, которые расположены между микросателлитными последовательностями. Полученные паттерны являются видоспецифичными.

Исследования показали, что линия животных имеет достаточно высокий уровень гетерогенности, несмотря на то, что происходит от шести особей одного массива. Именно действие лазерного облучения и жесткий субстрат выращивания (донные залежи) оказались мощными факторами селективного давления.

Ключевые слова: генетическая изменчивость, молекулярные маркеры, микросателлитные локусы

USE OF ISSR ANALYSIS FOR STUDYING THE INTRANAL-GENETIC POLYMORPHISM OF DIFFERENT GROUPS OF CULTURAL POPULATION OF WILS OF THE GENUS *EISENIA* WORMS

K. I. Timchy, E. I. Metlitskaya, S. M. Korennay, V. T. Smetanin

Abstract. It is known that molecular genetic methods can provide researchers with new and more accurate means for distinguishing between types of earthworms and establishing phylogenetic distances between them.

Using neutral molecular markers, ISSR (Inter-SimpleSequenceRepeat), internal genetic genetic polymorphism of earthworms of the genus *Eisenia* was studied from the mass of the vermiculture of the biotechnology department, which were irradiated with a laser of the LGH-208b type at different exposures over time and cultivated on various organic substrates.

The application of the ISSR-PCR method is the use of microsatellite loci as areas for firing primers that are complementary to microsatellite repeats. Such primers allow the amplification of DNA fragments that are located between the microsatellite sequences. The resulting patterns are species specific.

Studies have shown that the animal line has a fairly high degree of heterogeneity, despite the fact that it occurs from six individuals of the same massif, it is the effect of laser irradiation and the hard growing substrate (bottom deposits) that have proved to be powerful selective pressure factors.

Keywords: genetic variability, molecular markers, microsatellite loci

МЕТОДИ ВЕРИФІКАЦІЇ ПРЕДИКАТИВНИХ ҐРУНТОВИХ КАРТ

В. Р. ЧЕРЛІНКА, кандидат біологічних наук, доцент кафедри агротехнологій та ґрунтознавства

Ю. М. ДМИТРУК, доктор біологічних наук, завідувач кафедри агротехнологій та ґрунтознавства

Інститут біології, хімії та біоресурсів

Чернівецький національний університет ім. Ю. Федьковича, Україна

E-mail: v.cherlinka@chnu.edu.ua

Анотація. Аналіз можливих методів верифікації отриманих результатів є необхідним і важливим процесом для винесення обґрунтованих висновків щодо якості проведеного моделювання. На відміну від поширених в літературі рекомендацій щодо процесу верифікації отриманих результатів моделювання ґрунтового покриву суто з математичної сторони, запропоновано, так звану, крос-валідацію, яка дозволяє співставити модельні дані з реальними ґрунтовими обстеженнями та існуючими картами. Це потенційно дає змогу відслідкувати помилки не тільки модельного експерименту, а й «законсервовані» на існуючих ґрунтових картах. Встановлено, що для охоплення всього спектру можливих крос-валідацій польових, картографічних і модельних даних та отримання максимально достовірних і коректних як з математичної, так і ґрунтознавчої сторони результатів, кількість закладених розрізів має відповідати плану великомасштабного ґрунтового обстеження, а схема розташування повинна відповідати репрезентативним точкам місцевості, виділеним на основі геоморфологічного аналізу.

Ключові слова: *морфометричні параметри, ЦМР, ґрунтова карта, кореляція, предиктори, прогносні алгоритми, крос-валідація*

Актуальність. Для виробництва сільськогосподарської продукції, необхідної для постійно зростаючого населення та задоволення потреб промисловості, виробники у всьому світі зосереджують свої зусилля на максимізації кількості врожаю з одночасним підвищенням його якості та мінімізацією витрат. Єдиний шлях до вирішення цих завдань в 21 столітті — точне землеробство. Проте, застосування точного землеробства традиційно було трудомістким і вартісним для багатьох виробників процесом. У сучасній практиці точного сільського господарства відсутні високоточні та недорогі в реалізації картографічні технології, які б дозволили товаровиробникам керувати варіаціями технологічного характеру відповідно до ґрунтових умов в умовах конкретних ґрунтових ареалів. За допомогою сучасних технологій проксимального і дистанційного зондування та прогнозного моделювання ґрунтових ресурсів такі карти можна створювати

й широко застосовувати для високопродуктивного точного сільського господарства.

Майбутня інтеграцію супутникових даних із даними щодо ґрунтів забезпечить створення точних карт ґрунтів [1–3]. Вони будуть достойною альтернативою поточним методам дослідження земель, а зменшення впливу на навколишнє середовище буде значною мірою досягнуто за рахунок зниження кількості агрохімікатів, що застосовуються. Завершальним продуктом, як це бачиться з позицій сьогодення, буде «прецизійна ґрунтова карта», доступна для товаровиробників у високій роздільній здатності. Вона посилить розуміння потреб рослин в агроєкосистемах з використанням інформації про ґрунти і забезпечить економічний шлях впровадження точного землеробства.

Отже, реалізація пропонованих заходів матиме вплив на економічно та екологічно обґрунтовану інтенсивну сільськогосподарську діяльність, а такий підхід запропонує інноваційний та недосягнутий на сьогодні рівень деталізації для планування поточної діяльності.

Проте, для високопродуктивного агровиробництва, моніторингу та управління якістю довкілля важливо мати всебічну інформацію про ґрунтовий покрив конкретної території. Водночас аналіз літературних джерел показує [4], що великомасштабні ґрунтові обстеження (наприклад, масштабу 1:10 000) проведені не для всіх держав. Так, в Україні, необстеженими залишилося близько 20 з 60 млн. га [5]. Оскільки ретельно досліджувалися тільки землі сільськогосподарського призначення, то території населених пунктів, лісів, гірські регіони в більшості випадків залишилися поза увагою дослідників. Одержані ще в 1957–1961 рр. результати застаріли, в них чимало недоречностей, а корекція цих даних не проводилася понад 25 років [5, 6]. Ситуація в інших державах Європи різна, але аналогічні проблеми зустрічаються нерідко.

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Внаслідок помилок за ручного виділення картограм крутизни схилів (в Україні саме на них базуються методи виділення ґрунтів різного ступеня еродованості) наявні похибки, іноді значні, щодо просторового паттерну ґрунтових таксонів. Заповнення прогалів та коригування меж картографічних даних у таких умовах логічне шляхом моделювання. Кількість досліджень, присвячених саме моделюванню хорології таксономічних ґрунтових одиниць наростає [7–13]. При цьому застосовується великий спектр математичних методів: від багатофакторного регресійного аналізу, крігінгу, нейронних мереж до різного роду класифікаційних дерев [14]. Загальна ідея, яка лежить в основі застосування таких методів, полягає у використанні опорних точок ландшафтів з приуроченими до них ґрунтовими таксонами [15], що загалом відповідає концепції великомасштабної ґрунтової зйомки на «ключачах» [16]. Основним джерелом предикторів у такій симуляції є цифрова модель рельєфу (DEM), аналіз якої дозволяє виділити цілий ряд геоморфологічних та пов'язаних з ними параметрів. Оскільки модельовані змінні (різновиди ґрунтів) відносяться не до числового, а категоріального типу даних, а отримані з ЦМР показники, як правило, числові, то використання лише просунутих математичних методів дозволяє встановити неочевидні на перший погляд залежності між усіма цими параметрами [6, 11, 17–20].

Результати моделювання мають, як правило, відхилення від реального стану речей як за рахунок власне моделювання, так і за рахунок ймовірних помилок на самих ґрунтових картах, які беруть за основу для розрахунку вхідних параметрів. Тому аналіз можливих методів верифікації отриманих результатів є необхідним і важливим процесом для винесення обґрунтованих висновків щодо якості проведеного моделювання.

Отже, **метою** нашого **дослідження** в цьому аспекті було дослідження способів верифікації модельованих даних та рекомендації стосовно оптимального поєднання способів верифікації, методики створення навчального набору даних і самого алгоритму побудови моделі. Водночас ми намагалися зробити процес дослідження максимально прозорим та відтворюваним для широкого загалу. Тому ми пропонуємо використовувати великомасштабні ґрунтові та топографічні карти і вільне програмне забезпечення — геоінформаційні системи GRASS [21] і Quantum [22], векторизатор Easy Trace [23] та мову статистичних розрахунків R-statistic [24].

Матеріали і методи досліджень. Згідно мети досліджень нами були визначено такі завдання: а) оцифрування та атрибутування картографічних матеріалів; б) побудова ЦМР з роздільною здатністю 5 м; в) аналіз цифрових моделей рельєфу і виділення з них у GIS GRASS набору карт морфометричних та інших похідних характеристик; г) генерація навчальних вибірок згідно описаних методичних підходів; д) створення в R-statistic симулятивних моделей ґрунтового покриття (карт-версій або карт-моделей) з використанням 14 основних типів предикативних алгоритмів; ж) закладка мережі ґрунтових розрізів і аналіз методів верифікація якості прогнозного моделювання та самої карти ґрунтового покриття.

В якості об'єкта було обрано фрагмент території України в межах Чернівецької області, приурочений до Прут-Дністровського межиріччя. Адміністративно цей ареал відноситься до території міста Чернівці (рис. 1), а при його виборі було вирішено деякі суто українські проблеми, детально описані в ряді праць [6, 25, 26]. Головними з них були проблеми з доступом до топографічних та ґрунтових даних та їх актуальністю, системою координат тощо. Відповідний даній території фрагмент сканованого листа топографічної карти М 1:2 000 був геореєстрований в GIS Quantum [22] з використанням системи координат Pulkovo 1942 CS63 Zone X2 [27].

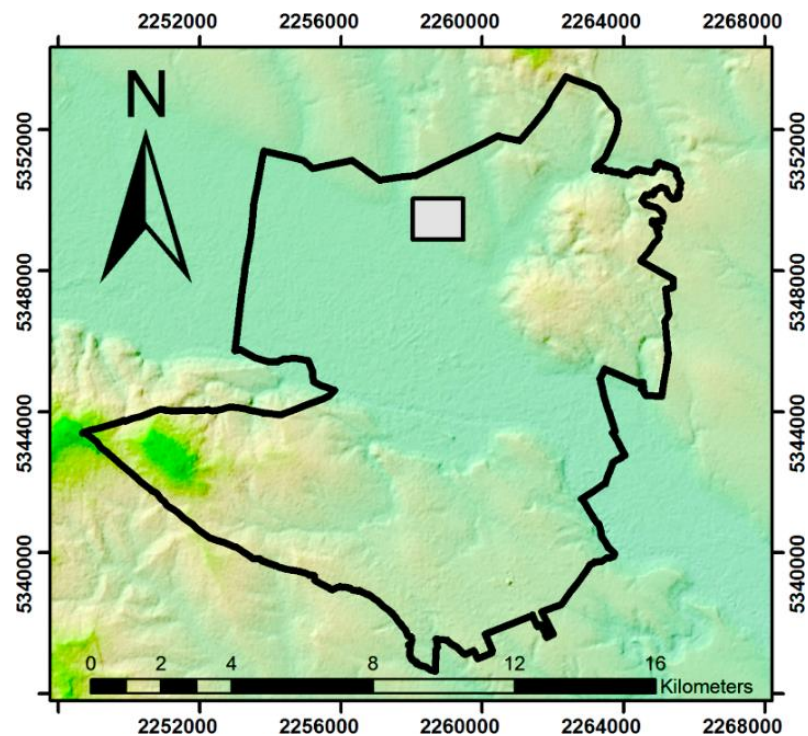


Рис. 1. Ареал досліджень

Інформативні ґрунтові матеріали базувалися на архівній ґрунтовій карті ареалу дослідження (зйомка 1993 р.). Тестовий район було підібрано з можливостями охоплення ґрунтової катени повного складу.

Для опрацювання даних були використані інструментальні можливості вільного програмного забезпечення: оцифрування — Easy Trace [23], підготовка карт морфометричних параметрів — GIS GRASS [21] та побудова предикативної моделі ґрунтового покриття — мова статистичних розрахунків R-statistic [24]. Цифрова модель рельєфу з роздільною здатністю 5 м була побудована за допомогою регуляризованих напружених сплайнів [28] в GIS GRASS, а вибір параметрів сплайну здійснювався згідно рекомендацій [29]. Була обрана саме 5 м роздільна здатність, оскільки при відносно високій точності відтворення топографії вона забезпечує також практичне співпадіння площ векторизованих і растрованих ґрунтів [30].

Цифрова модель рельєфу послужила основою для виділення ряду його морфометричних характеристик: крутизни (slope) та експозиції (aspect) схилів (модуль `r.slope.aspect` [31]), кривизни поверхні (профільної, планової, поздовжньої, мінімальної та максимальної — `profc`, `planc`, `longc`, `minic` та `maxic` відповідно) — модулем `r.param.scale` на основі роботи [32], даних по сонячній радіації (`rad`) — модулем `r.sun` [33], форм рельєфу (`gmf`) в `r.geomorphon` [34]. Також були згенеровані додаткові карти гідрологічних показників: топографічного індексу вологості (`twi`) [35] в `r.topidx`, акумуляції (`flowaccum`) та напрямку водних потоків (`flowdirect`) в `r.terraflow` [36], довжини водних потоків (`flowlength`) [37] в `r.flow` та відстані до них (`diststream`, `r.stream.distance` [38]).

Для створення симулятивних моделей ґрунтового покриття нами був використаний скрипт [30, 39, 40] на мові R-statistic [24], який включає в себе ряд адаптацій для вирішення поставлених завдань та реалізує 14 основних типів предикативних алгоритмів [30, 39].

При цьому створення навчальної вибірки здійснювалося рандомізовано- зваженим методом на основі проведеного детального аналізу [39]). Для оцінки якості моделі використали індекс каппа Когена [41, 42], який в даному випадку показує ступінь відповідності між оригінальними та прогнозними даними.

Результати дослідження та їх обговорення. Аналіз шляхів верифікації реальних, картованих і модельних ґрунтів показує, що існує кілька можливих варіантів цього процесу (рис. 2). Зокрема, їх можна розділити на три групи залежно від виду вхідної інформації: наявна ґрунтова карта (полігональний тип даних), достовірні польові обстеження ґрунтів (точковий тип даних) та їх комбінація. Ці групи даних є базисом для побудови трьох відповідних їм предикативних моделей. Відмітимо, що єдиний вид верифікації, який не потребує моделювання, відповідає першому варіанту (V1) і полягає у порівнянні польових обстежень з картографічним матеріалом. Створені моделі першого ($Model_{map}$), другого ($Model_{profile}$) та третього ($Model_{combined}$) типів будуються на основі вище перелічених алгоритмів і можуть кроссверифікуватися кількома способами, як між собою (V9–V11), так і з джерелами даних (V2–V8). При цьому $Model_{combined}$ можна перевірити 5 варіантами валідації (V6–V10), а дві інші моделі лише 4-ма: V2, V4, V9, V11 та V3, V5, V10, V11 — для $Model_{map}$ і $Model_{profile}$ відповідно. Потреба у тому чи іншому варіанті валідації визначається при плануванні експерименту залежно від його мети і в екстремальних випадках можуть бути залучені всі 11 способів.

Конкретно в нашому випадку, ми планували дослідити точність існуючої карти агрогруп ґрунтів, оскільки існували певні сумніви в її достовірності, зокрема у точності проведення ґрунтових контурів. Саме тому і була запланована та схема закладки ґрунтових розрізів по катені, яка передбачала, в першу чергу, контроль ґрунтових меж та точності виділення самих ґрунтових відмін. Оскільки найпростішим і очевидним є порівняння діагностованих в польових умовах ґрунтів з відображеними на ґрунтовій карті (V1), то аналіз отриманих даних показав, наскільки співпадають реально досліджені ґрунти з картованими. Відмітимо, насамперед те, що підозри щодо якості цієї карти підтвердилися, оскільки ґрунтова карта співпала з закладеними розрізами лише у кількох випадках, а у всіх інших випадках ми спостерігаємо розходження (іноді доволі сильне) між генетичними типами реальних ґрунтів та даними з карти. Це свідчить лише про досить системні помилки даної карти, оскільки не співпадають з картою 15 із 18 закладених розрізів. Враховуючи достатньо простий у геоморфологічному відношенні рельєф, такі помилки картування можна вважати дуже грубими. Окрім того польові дослідження і картовані дані мають лише одну спільну агрогрупу ґрунтів, в ареалі якої якраз і розташовані три розрізи що збігаються. Всі інші агрогрупи мало того, що не співпадають за якістю, не співпадають і за кількістю: за нашими дослідженнями виділено 8 агрогруп проти 6 на карті.

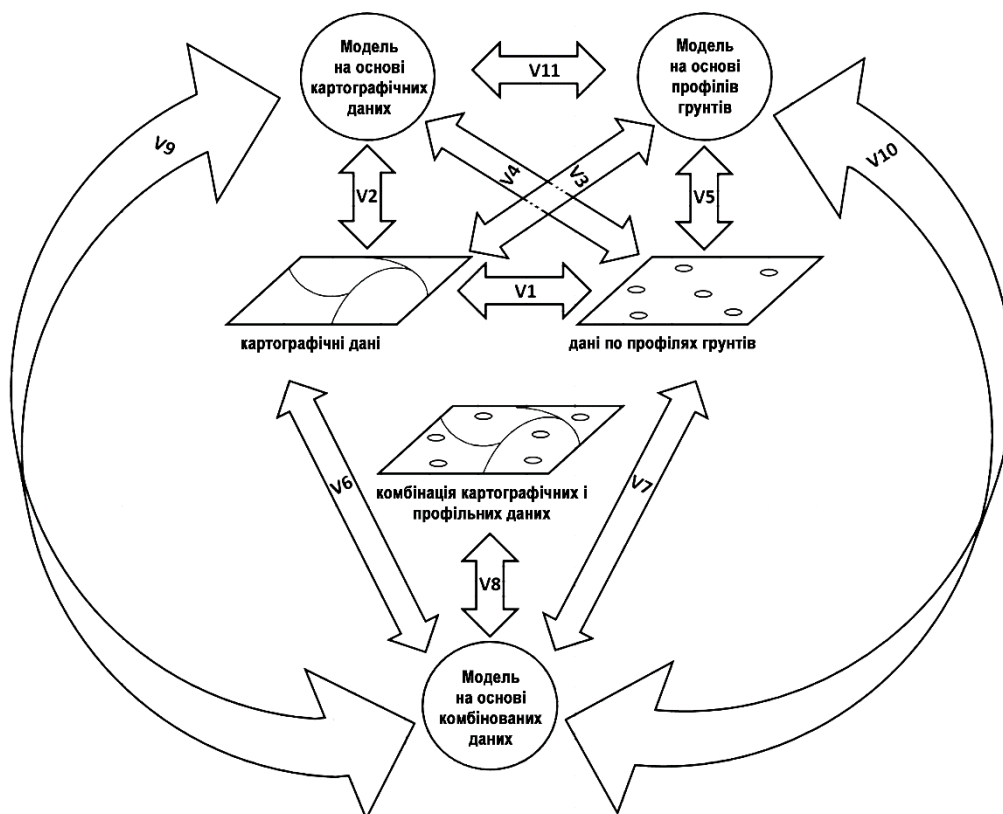


Рис. 2. Типи верифікації реальних, картографічних та модельних даних

Наявність таких грубих розходжень вказує на те, що подальше моделювання на основі картографічних даних ($Model_{map}$) у нашому випадку має сенс лише для оцінки якості предикативних алгоритмів (за рахунок покриття ареалу досліджень нехай і хибними зате повними даними). Відповідно, валідація даних згідно $Model_{combined}$ та відповідних їй варіантів (V6-V10) тут унеможлиблюється, оскільки така модель може бути побудована лише у випадку повного співпадіння польових досліджень з картованими даними. Ще одна модель ($Model_{profile}$) та набір відповідних їй варіантів (V3, V5, V10 та V11) в принципі може бути побудована, оскільки в якості навчального датасету буде використана польова діагностика, яка має вищу достовірність відносно картограми агрогруп за рахунок наших особистих спостережень. Проте, проведене моделювання ґрунтового покриття, апіорі не може бути точним, оскільки мета закладення розрізів у нашому випадку не підпорядкована цілям великомасштабного ґрунтового картографування (яке передбачає зовсім іншу схему закладки ґрунтових профілів), а контролю за точністю ґрунтових меж та виділення самих ґрунтових відмін.

Оскільки результати польових досліджень показали, що продовження роботи можливе лише з $Model_{map}$ і $Model_{profile}$, то ми спробували отримати максимум корисної інформації з цієї ситуації. Точність моделей у випадках оцінки картографічних і реальних даних, як було зауважено вище, визначається за допомогою каппи Когена. Вона, власне, дозволяє встановити, наскільки точно модель може описати умови розміщення ґрунтів, і, відповідно, відтворити ґрунтову карту.

Розглянемо ближче $Model_{map}$. Як нами встановлено, «завдяки» точності існуючої карти, дане моделювання має суто академічний інтерес у зв'язку із

валідацією набору предикативних алгоритмів. Отримані 14 симуляцій ґрунтового покриття показують досить цікаві закономірності щодо якості моделювання навіть при аналізі лише візуальних характеристик отриманих карт. Оцінка їх числових характеристик виявляє, що найбільш точними є 2 класифікаційні моделі (Random forest і Bagged trees) та K-Nearest Neighbors. Такий масив симуляцій ґрунтового покриття цікавий з точки зору його відповідності оригінальній карті і, відповідно до цього, прогностичній «силі» для ареалів з відсутньою інформацією (для досліджень, де це є актуально). Оскільки алгоритми аналізують весь спектр предикативних параметрів, виробляючи класифікаційні правила, то при високому рівні співпадіння модельних і реальних даних можна буде говорити про певний рівень статистичної достовірності результатів і в ареалах «білих плям». Саме тому отримані нами висновки в цьому плані досить обнадійливі з огляду на діапазон значень κ Когена. Якщо проранжувати моделі за зростанням якості предикції по κ основного набору даних, то для алгоритму PLR виявилися найгірші результати серед інших. За ним у порядку зростання розміщуються PLS, NSC, LDA, NDA, MLR, NN, SVM, KNN, RF та BGT. Останні два алгоритми відносяться до класифікаційних, і їх високі результати, очевидно, свідчать про найбільшу придатність такого роду підходів у картографічному відтворенні структури ґрунтового покриття на основі картографічної ж вибірки. Відмітимо, що цілий ряд алгоритмів перетнув межу якості предикції в 90 % (MLR, NN, SVM, KNN, RF та BGT), з яких два останніх (RF та BGT) практично відтворюють оригінальну ґрунтову карту. Це черговий раз підтверджує наші попередні дослідження [39], в яких показано, що рандомізовано-зважена вибірка навчальних даних є оптимальною для задач відтворення та моделювання карт ґрунтового покриття.

Аналіз рівня співставності отриманих результатів за якістю симуляції з подібними дослідженнями показує, що каппа більшості наших моделей перевищує усереднені значення з літературних джерел. Отримані нами дані мають у найгіршій моделі PLR — незначне сходження ($\kappa = 0,01-0,20$), PLS, NSC — істотне сходження ($\kappa = 0,61-0,80$), а у ліпших (LDA, NDA, MLR, NN, SVM, KNN, RF та BGT) — майже повне сходження ($\kappa = 0,81-0,99$). Відповідно, це дозволяє оцінити якість симулятивних карт-версій як таку, що не поступається рівню згаданих нами аналогічних за літературними даними. Окрім того вважаємо, що існує ще певний потенціал щодо підвищення загальної κ , зокрема, шляхом ретельнішого добору предикторів моделі та розширення їх числа включенням даних дистанційного зондування Землі, карт антропогенних відкладів (підстилаючих або материнських порід) тощо. Значним корисним ефектом такого роду моделювання є можливість заповнення прогалин на існуючих картографічних матеріалах даними з предикативних карт-версій та отримання, таким чином, комбінованих ґрунтових карт. Хоча такі результати отримані на деякою мірою «віртуальних» даних, це ніяк не принижує цінність висновків про ранжування предикативних алгоритмів та вибір способу отримання навчальної вибірки. У випадку аналізу картографічних матеріалів з прогалинами в ареалах такий підхід дозволяє отримати хоча б якісь дані на науковій основі з певним рівнем статистичної достовірності та використовувати їх для прикладних

задачах ґрунтознавства, агрономії, землевпорядкування та землеустрою тощо, тобто сферах, де потреба у таких даних стоїть найбільш гостро.

Не менш цікавим є детальний аналіз Model_{profile}. Як ми згадували, структура вихідних даних була спроектована не для цілей великомасштабного ґрунтового картографування, а для зв'язки ґрунтових меж та точності виділення самих ґрунтових відмін. Це на самому старті накладає певні обмеження на якість очікуваних результатів, оскільки точки закладення розрізів не є характерними точками місцевості (ключами у термінології великомасштабного картографування). Використання 14 предикативних алгоритмів дозволило отримати серію прогнозних карт, які загалом дозволяють зробити висновок про недостатність лише 18 розрізів (причому розташованих неоптимально для типового картування на ключах) для повноцінного моделювання ґрунтового покриття такої території. Так, в середньому на 1 ґрунтовий розріз припадає 9,28 га, що навіть по стандарту для цієї категорії складності місцевості є замало [16], хоч і відповідає усередненій площі на 1 розріз [5].

Високі значення κ Когена, отриманих при цьому, не повинні вводити в оману: 6 алгоритмів з 14 показали начебто 100 співпадіння навчальних та повних даних. Насправді це сталося так лише тому, що сама вибірка складається всього з 18 розрізів, і на такому маленькому обсязі даних це співпадіння не є показовим. Звичайно навіть з таких даних можна зробити певні висновки про якість алгоритмів. Так, стабільно високі, і як в попередньому варіанті моделювання 100 % результати показали RF і BGT. Стали 100 % MLR, NN, NDA та LDA. Дещо ліпші параметри каппа стали у PLS і NSC, трохи знизилися у SVM, а у PLR та KNN вони різко впали.

Значно цікавішим є візуальний контроль отриманих симуляцій. З огляду на певний ґрунтознавчий досвід, з отриманих таким способом карт найбільше подібні до реальних лише RF і BGT. Очевидно, що крос-валідації за каппа (у тих випадках де вона становить 100 %) формально будуть достовірними, але такі предикативні карти для використання не рекомендується.

Ці результати чітко окреслюють коло і технічні характеристики майбутніх досліджень:

кількість закладених розрізів має відповідати плану великомасштабного ґрунтового обстеження;

схема їх закладки повинна відповідати ключовим точкам місцевості на основі ЦМР і геоморфологічного аналізу.

Лише в такому разі доцільно говорити про задіявання всього спектру можливих крос-валідацій польових, картографічних та модельних даних та отримання максимально достовірних та коректних як з математичної, так і ґрунтознавчої сторони результатів.

Висновки і перспективи. Проведені дослідження показали, що існує 11 можливих шляхів верифікації реальних, картованих і модельних ґрунтів, які можна розділити на три групи залежно від виду вхідної інформації: полігональний тип даних (ґрунтові карти), точковий тип даних (достовірні польові обстеження ґрунтів) та їх комбінація. Таке групування даних передбачає можливості щодо побудови відповідних трьох наборів предикативних моделей, які включають 14 типів основних предикаційних

алгоритмів. Єдиний вид верифікації з описаних, який не потребує безпосереднього моделювання відповідає першому варіанту (V1) і полягає у прямому порівнянні польових обстежень з картографічним матеріалом.

Аналіз отриманих симуляцій ґрунтового покриття з точки зору їх відповідності оригінальній карті дозволяє рекомендувати деякі алгоритми для створення предикативних карт, які містять ареали з відсутньою інформацією про ґрунтовий покрив з результатами певного рівня статистичної достовірності. Показано, що отримані значення k Когена для деяких алгоритмів показують практично 100 % співпадіння модельних карт з оригінальними. Загалом, зростання якості предикції по k показує таку динаміку: PLR, PLS, NSC, LDA, NDA, MLR, NN, SVM, KNN, RF та BGT. Високі результати двох останніх алгоритмів свідчать, очевидно, про їх найбільшу придатність для модельного відтворення структури ґрунтового покриття (на основі картографічної навчальної вибірки). Підтверджено, що рандомізовано-зважена вибірка навчальних даних є оптимальною для задач відтворення та моделювання карт ґрунтового покриття.

References

1. Vykorystannia danykh suputnykovoї ziomky v systemakh tochnoho zemlerobstva / S. R. Truskavetskyi, T. Yu. Byndych, L. P. Koliada ta in. // *Inzheneriia pryrodokorystuvannia*. — 2017. — №1 (7). — S. 29–35.
2. Achasov A. B., Achasova A. O. Metodychni osnovy suchasnoho prostоровoho monitorynhu gruntiv // *Visnyk Kharkivskoho natsionalnoho universytetu imeni V. N. Karazina*. — Serii: Ekolohiia. — 2011. — № 944. — Vyp. 6. — S. 20–27.
3. Achasov A. B., Titenko H. V., Kurilov V. I. Dani dystantsiinoho zonduvannia yak osnova kartohrafuvannia gruntiv: ekonomichnyi aspekt // *Visnyk Kharkivskoho natsionalnoho universytetu imeni V. N. Karazina*. — Serii: Ekolohiia. — 2015. — № 1104. — Vyp. 10. — S. 60–66. — Rezhym dostupu: http://journals.urau.ua/visnyk_khnu_ecology/article/download/25458/33191.
4. Soil resources of Europe / Ed. by Robert J. A. Jones, Beata Houskova, Peter Bullock, Luca Montanarella. European Soil Bureau Research Report No.9, EUR 20559 EN. — 2 edition. — Luxembourg : Office for Official Publications of the European Communities, 2005. — 420 p. — Access mode: http://eusoils.jrc.ec.europa.eu/ESDB_Archive/eusoils_docs/esb_rr/n09_EUR20559.pdf.
5. Kanash O. P. Grunty — providna skladova zemelnykh resursiv // *Zemleustrii i kadastr*. — 2013. — № 2. — S. 68–76.
6. Cherlinka V. Using Geostatistics, DEM and Remote Sensing to Clarify Soil Cover Maps of Ukraine // *Soil Science Working for a Living: Applications of soil science to present-day problems* / Ed. by David Dent, Yuriy Dmytruk. — Cham, Switzerland : Springer-Verlag GmbH, 2017. — Jan. — P. 89–100. — Access mode: https://doi.org/10.1007/978-3-319-45417-7_7.
7. MacMillan R. A. Experiences with applied DSM: protocol, availability, quality and capacity building // *Digital Soil Mapping with Limited Data* / Ed. by Alfred E. Hartemink, Alex B. McBratney, Maria de Lourdes Mendonca-Santos. — Amsterdam : Springer Netherlands, 2008. — P. 113–135.
8. Browning D. M., Duniway M. C. Digital soil mapping in the absence of field training data: A case study using terrain attributes and semiautomated soil signature derivation to distinguish ecological potential // *Applied and Environmental Soil Science*. — 2011. — Vol. 2011. — Access mode: <https://doi.org/10.1155/2011/421904>.

9. An appropriate data set size for digital soil mapping in Erechim, Rio Grande do Sul, Brazil / Alexandre ten Caten, Ricardo Simao Diniz Dalmolin, Fabrício de Araujo Pedron et al. // *Revista Brasileira de Ciencia do Solo*. — 2013. — Vol. 37, no. 2. — P. 359–366. — Access mode: <https://doi.org/10.1590/s0100-06832013000200007>.

10. Machine learning for predicting soil classes in three semi-arid landscapes / Colby W. Brungard, Janis L. Boettinger, Michael C. Duniway et al. // *Geoderma*. — 2015. — Vol. 239. — P. 68–83. — Access mode: <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2014.09.019>.

11. Malone B. P., Minasny B., McBratney A. B. Using R for Digital Soil Mapping. Progress in Soil Science. — Springer International Publishing, 2016. — 262 p. — ISBN: 978-3-319-44327-0. — Access mode: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-44327-0>.

12. An overview and comparison of machine-learning techniques for classification purposes in digital soil mapping / Brandon Heung, Hung Chak Ho, Jin Zhang et al. // *Geoderma*. — 2016. — Vol. 265. — P. 62–77. — Access mode: <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2015.11.014>.

13. Heung B., Hodul M., Schmidt M. G. Comparing the use of training data derived from legacy soil pits and soil survey polygons for mapping soil classes // *Geoderma*. — 2017. — Vol. 290. — P. 51–68. — Access mode: <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2016.12.001>.

14. Florinsky I. V. Digital Terrain Analysis in Soil Science and Geology. — Amsterdam : Academic Press / Elsevier, 2012. — 379 p. — ISBN: 978-0-12-385036-2. — Access mode: <https://doi.org/10.1016/c2010-0-65718-x>.

15. Mapping of reference area representativity using a mathematical soilscape distance / P. Lagacherie, J. M. Robbez-Masson, N. Nguyen-The, J. P. Barthès // *Geoderma*. — 2001. — Apr. — Vol. 101, no. 3-4. — P. 105–118. — Access mode: [https://doi.org/10.1016/s0016-7061\(00\)00101-4](https://doi.org/10.1016/s0016-7061(00)00101-4).

16. Tekhnicheskiye ukazaniya po korrektyrovke materialov krupnomasshtabnoho obsledovaniya pochv kolkhozov y sovkhozov Ukraynskoï SSR. — K. : MSKh USSR, 1977. — 128 s.

17. Digital soil mapping using logistic regression on terrain parameters for several ecological regions in Southern Brazil / E. Giasson, S. R. Figueiredo, C. G. Tornquist, R. T. Clarke // Digital Soil Mapping with Limited Data / Ed. by Alfred E. Hartemink, Alex B. McBratney, Maria de Lourdes Mendonça-Santos. — Amsterdam : Springer Netherlands, 2008. — P. 225–232. — Access mode: https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8592-5_19.

18. Updating the 1:50,000 Dutch soil map using legacy soil data: A multinomial logistic regression approach / Bas Kempen, Dick J. Brus, Gerard B. M. Heuvelink, Jetse J. Stoorvogel // *Geoderma*. — 2009. — Jul. — Vol. 151, no. 3. — P. 311–326. — Access mode: <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2009.04.023>.

19. Debella-Gilo M., Etzelmüller B. Spatial prediction of soil classes using digital terrain analysis and multinomial logistic regression modeling integrated in GIS: Examples from Vestfold County, Norway // *Catena*. — 2009. — Apr. — Vol. 77, no. 1. — P. 8–18. — Access mode: <https://doi.org/10.1016/j.catena.2008.12.001>.

20. Hengl T. A practical guide to geostatistical mapping. — 2 edition. — Luxembourg : Office for Official Publications of the European Communities, 2009. — 271 p. — ISBN: 978-90-9024981-0. — Access mode: http://www.academia.edu/download/40396676/A_Practical_Guide_to_Geostatistical_Mapping.pdf.

21. GRASS Development Team. Geographic Resources Analysis Support System (GRASS GIS) Software // *Version 7.2*. — 2017. — Access mode: <http://grass.osgeo.org> (online; accessed: 25.05.2017).

22.QGIS Development Team. QGIS Geographic Information System, Open Source Geospatial Foundation. — 2015. — Access mode: <http://qgis.osgeo.org> (online; accessed: 25.05.2017).

23.EasyTrace group. Easy Trace 7.99. Digitizing software. — 2015. — Access mode: <http://www.easytrace.com> (online; accessed: 25.05.2017).

24.R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. // *R Foundation for Statistical Computing*. — 2017. — Access mode: <http://www.r-project.org> (online; accessed: 25.05.2017).

25.Cherlinka V. R., Dmytruk Yu. M. Problemy stvorennia, heorektyfikatsii ta vykorystannia krupnomasshtabnykh tsyfrovyykh modelei reliefu // Heopolytyka y ekoeodynamyka rehionov. — 2014. — T. 10, № 1. — S. 239–244. Rezhym dostupu <http://geopolitika.crimea.edu/arhiv/2014/tom10-v-1/040cherlin.pdf>.

26.Cherlinka V. R. Adaptatsiia velykomasshtabnykh kart hruntiv do yikh praktychnoho vykorystannia u HIS // Ahrokhimiia i gruntoznavstvo. Mizhvid. tem. nauk. zb. — Vyp. 84. — Kharkiv : TOV «Smuhasta typohrafiia», 2015. — S. 20–28. — Rezhym dostupu: <http://agrosoil.yolasite.com/resources/2015-AiG-84-pp20-28.pdf>.

27.Evenden G., Warmerdam F. Proj. 4 — Cartographic Projections Library // *Source code and documentation*. — 1990. — Access mode: <https://proj4.org/>.

28.Mitasova H., Mitas L. Interpolation by regularized spline with tension: I. Theory and implementation // *Mathematical Geology*. — 1993. — Vol. 25, no. 6. — P. 641–655. — Access mode: <https://doi.org/10.1007/BF00893171>.

29.Hofierka J., Cebecauer T., Šurí M. Optimisation of interpolation parameters using cross-validation // Digital Terrain Modelling / Ed. by Robert Joseph Peckham, Gyoza Jordan. — Berlin Heidelberg : Springer, 2007. — Lecture Notes in Geoinformation and Cartography. — P. 67–82. — Access mode: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-36731-4_3.

30.Cherlinka V. R. Vplyv rozdilnoi zdatnosti tsyfrovyykh modelei reliefu na yakist predykatyvnoi symuliacii gruntovoho pokryvu // Gruntoznavstvo. — 2017. — T. 18, № 1-2. — S. 79–95. — Rezhym dostupu : <http://arss.dp.ua/index.php/ass/article/view/11>.

31.Hofierka J., Mitasova H., Neteler M. Geomorphometry in GRASS GIS // Geomorphometry: Concepts, Software, Applications / Ed. by Tomislav Hengl, Hannes I. Reuter. — Amsterdam : Elsevier, 2009. — Vol. 33 of *Developments in Soil Science*. — P. 387–410. — Access mode: [https://doi.org/10.1016/S0166-2481\(08\)00017-2](https://doi.org/10.1016/S0166-2481(08)00017-2).

32.Wood J. D. The geomorphological characterisation of digital elevation models : Phd thesis / Joseph D. Wood ; University of Leicester, UK. — Leicester : UoL, 1996. — 185 p. — Access mode: <https://lra.le.ac.uk/bitstream/2381/34503/1/U077269.pdf>.

33.Hofierka J., Suri M. The solar radiation model for Open source GIS: implementation and applications // Proceedings of the Open source GIS-GRASS users conference / Ed. by Marco Ciolli, Paolo Zatelli ; Dipartimento di Ingegneria Civile e Ambientale. — Trento, Italy : Universita' di Trento, 2002. — P. 1–19. — Access mode: http://www.ing.unitn.it/~Grass/conferences/GRASS2002/proceedings/proceedings/pdfs/Hofierka_Jaroslav.pdf.

34.Jasiewicz J., Stepinski T. F. Geomorphons — a pattern recognition approach to classification and mapping of landforms // *Geomorphology*. — 2013. — Jan. — Vol. 182. — P. 147–156. — Access mode: <https://doi.org/10.1016/j.geomorph.2012.11.005>.

35.Soil attribute prediction using terrain analysis / Ian D. Moore, P. E. Gessler, G. A. Nielsen, G. A. Peterson // *Soil Science Society of America Journal*. — 1993. — Vol. 57, no. 2. — P. 443–452. — Access mode: <https://doi.org/10.2136/sssaj1993.572npb>.

36.Efficient flow computation on massive grid terrain datasets / Lars Arge, Jeffrey S. Chase, Patrick Halpin et al. // *Geoinformatica*. — 2003. — Vol. 7, no. 4. — P. 283–313. — Access mode: <https://doi.org/10.1023/A:102552642>.

37.Mitasova H., Hofierka J. Interpolation by regularized spline with tension: II. Application to terrain modeling and surface geometry analysis // *Mathematical Geology*. — 1993. — Vol. 25, no. 6. — P. 657–669. — Access mode: <https://doi.org/10.1007/BF00893172>.

38.Jasiewicz J., Metz M. A new GRASS GIS toolkit for hortonian analysis of drainage networks // *Computers & Geosciences*. — 2011. — Aug. — Vol. 37, no. 8. — P. 1162–1173. — Access mode: <https://doi.org/10.1016/j.cageo.2011.03.003>.

39.Cherlinka V. R. Variatsii prohnozhnoi efektyvnosti gruntovykh kart zalezchno vid sposobiv pobudovy navchalnykh vybirok predykatyvnykh alhorytmiv // *Ekolohiia ta noosferolohiia*. — 2017. — T. 28, № 3-4. — S. 55–71. — Rezhym dostupu: <http://erae.dp.ua/index.php/erae/article/view/20>.

40.Cherlinka V. R. Morfometrychni parametry reliefu yak bazys dlia predykatyvnoho modeliuvannia prostorovoho poshyrennia gruntovykh vidmin // *Ahrokhimiia i gruntoznavstvo. Mizhvid. tem. nauk. zb.* — Vyp. 86. — Kharkiv : TOV «Smuhasta typohrafiia», 2017. — S. 5–16. — Rezhym dostupu: http://agrosoil.yolasite.com/resources/2017-86/2017_AiG-86_5-16_Chерlinka.pdf.

41.Landis J. R., Koch G. G. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data // *Biometrics*. — 1977. — Mar. — Vol. 33, no. 1. — P. 159–174. — Access mode: <https://doi.org/10.2307/2529310>.

42.Li W., Zhang C. A Random-Path Markov Chain Algorithm for Simulating Categorical Soil Variables from Random Point Samples // *Soil Science Society of America Journal*. — 2007. — Vol. 71, no. 3. — P. 656–668. — Access mode: <https://doi.org/10.2136/sssaj2006.0173>.

МЕТОДЫ ВЕРИФИКАЦИИ ПРЕДИКАТИВНЫХ ПОЧВЕННЫХ КАРТ

В. Р. Черлинка, Ю. М. Дмитрук

Аннотация. Анализ возможных методов верификации полученных результатов является необходимым и важным процессом для получения обоснованных выводов о качестве проведенного моделирования. В отличие от распространенных в литературе рекомендаций относительно процесса верификации полученных результатов моделирования почвенного покрова чисто с математической стороны, предложена, так называемая, кросс-валидация, которая позволяет сопоставить модельные данные с реальными почвенными обследованиями и существующими картами. Это потенциально позволяет отследить ошибки не только модельного эксперимента, но и «законсервированные» на существующих картах. Установлено, что для охвата всего спектра возможных кросс-валидаций полевых, картографических и модельных данных и получения максимально достоверных и корректных как с математической, так и почвоведческих сторон результатов, количество заложенных разрезов должно соответствовать плану крупномасштабного почвенного обследования, а схема их расположения должна соответствовать репрезентативным точкам местности, выделенным на основе геоморфологического анализа.

Ключевые слова: морфометрические параметры, ЦМР, почвенная карта, корреляция, предикторы, прогнозные алгоритмы, кросс-валидация

VERIFICATION METHODS FOR PREDICATIVE SOIL MAPS

V. R. Cherlinka, Y. M. Dmytruk

Abstract. *An analysis of possible verification methods from the results is a necessary and important process for making substantiated conclusions about the quality of the modeling performed. In contrast to the popular literature recommendations on the process of verifying the results of simulation of soil coverings purely from the mathematical side, a so-called cross-validation is proposed, which allows comparing model data with real soil surveys and existing maps. This potentially allows you to track errors not only in the model experiment, but also «preserved» on existing ground maps. It has been established that in order to reach the full spectrum of possible cross-validations of field, cartographic and model data and obtain the most reliable and correct results from both the mathematical and soil sciences, the number of inlaid sections should correspond to the plan of large-scale soil survey, and the layout of the arrangement should correspond to representative points areas allocated on the basis of geomorphological analysis.*

Keywords: *morphometric parameters, DEM, soil map, correlation, predictors, predictive algorithms, crossvalidation*

ВПЛИВ ПРАЙМУВАННЯ ГІБЕРЕЛІНОМ ЗА ЯРОВИЗАЦІЇ НА РІСТ ТА ВМІСТ РОЗЧИННИХ ВУГЛЕВОДІВ В ПРОРОСТКАХ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ

В. В. ЧУМАКОВА, аспірант¹

О. О. АВКСЕНТЬЄВА, кандидат біологічних наук, доцент кафедри фізіології
і біохімії рослин та мікроорганізмів

Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна

E-mail: viktorija.shulik@karazin.ua

Анотація. В роботі досліджували вплив праймування гібереліном (ГК) за яровизації на ростову реакцію, вміст та фракційний склад розчинних вуглеводів в проростках 3-х сортів озимої пшениці – Дорідна, Статна та Альянс. Моделюючи різний рівень трофічного забезпечення процесу яровизації та досліджуючи вплив ГК, у дослідах використовували наступні варіанти 1) зернівки + вода (контроль, оптимальне трофічне забезпечення); 2) зернівки + 10 мг/л ГК, (оптимальне трофічне забезпечення); 3) ізольовані зародки + вода (контроль, відсутність трофічного забезпечення) 4) ізольовані зародки + 10 мг/л ГК, (відсутність трофічного забезпечення). Яровизацію проводили протягом 45 діб за температури 4 °С в чашках Петрі на зволоженому фільтрувальному папері. За результатами дослідження встановлено, що під впливом ГК у всіх досліджуваних сортів пшениці озимої відбувалася стимуляція ростових процесів (лінійного росту та накопичення біомаси) у проростках, інтенсивність якої залежала від рівня трофічного забезпечення цих процесів. Праймування ГК у варіанті з відсутністю трофічного забезпечення неістотно стимулювало вміст вуглеводів у сортів Дорідна і Статна, дуже значно у сорту Альянс за рахунок зміни вмісту олігоцукрів. Обговорюються закономірності фітогормональної та трофічної регуляції яровизаційних процесів у пшениці озимої.

Ключові слова: *Triticum aestivum* L., яровизація (верналізація), ГК, трофічні фактори, ростова реакція, розчинні вуглеводи.

Актуальність. Пшениця м'яка – найцінніша продовольча культура, продуктивність якої залежить від реалізації генетично закладених властивостей, а також впливу умов навколишнього середовища, що діють на кожному етапі онтогенезу рослини. Одним із найважливіших етапів розвитку рослин озимої пшениці є процес яровизації, для нормального проходження якого необхідний комплекс взаємодіючих екзо- та ендогенних факторів – температура, вода, кисень, а також забезпеченість поживними (трофічними) речовинами. Вагомим фактором регуляції перебігу яровизаційного процесу є генетичний контроль, який у пшениці м'якої

¹ Науковий керівник - О. О. Авксентьєва, кандидат біологічних наук, доцент кафедри фізіології і біохімії рослин та мікроорганізмів Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна

здійснюється за системи генів *VRN*, що контролює потребу в яровизації та визначає тип розвитку рослин (ярий або озимий) та опосередковано її продуктивність (Dennis, Peacock, 2009). За сучасності в умовах глобальної зміни клімату, що в Україні супроводжується частими відлигами в зимовий період, відсутністю снігового покриву та тим самим неможливістю проходження тривалого яровизаційного періоду рослинами пшениці, можливі зміни в темпах розвитку цієї важливої сільськогосподарської культури, що призводить до втрат врожаю. Тому дослідження ендо- та екзогенних регуляторних факторів, що впливають на процес яровизації пшениці озимої є актуальним.

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Яровизація має метаболічну природу, яка обумовлена перебігом фізіолого-біохімічних процесів, а роль гормональних і трофічних факторів є однією з найважливіших у процесі переходу рослин до генеративної фази розвитку (Авксентьева, Жмурко, 2011). За проходження яровизації на стадії проростків потреба в метаболітах забезпечується за рахунок запасу пластичних і біологічно активних (БАР) речовин ендосперму (Aoki et al., 2006). Розчинні вуглеводи відіграють важливу поліфункціональну роль у рослинному організмі протягом всього онтогенезу (Koch, 2004). В період яровизації – тривалої дії позитивних температур – цукри можуть виступати як трофічні субстрати, транспортні форми вуглеводів, осмоліти – захисники від низькотемпературного стресу та сигнальні молекули, які опосередковано регулюють розвиток рослин через експресію генів-регуляторів розвитку або їх епігенетичний контроль.

Серед відомих класів фітогормонів гібереліни (гіберелова кислота, ГК) виконують основну роль в процесах індукції флорального морфогенезу рослин, а також регуляції яровизації (верналізації). ГК присутні у рослинному організмі на всіх етапах розвитку, проте їх вміст та активність різних форм залежить від різноманітних механізмів регуляції фітогормонального балансу. Так, упродовж, верналізації активність ГК зростає, крім того, показано, що після періоду яровизації стимулюється експресія генів, що кодують біосинтез ГК (Shang et al., 2017). Відомо, що ГК можуть частково замінити дію низьких температур, сприяючи цвітінню деяких рослин (Pearce et al., 2013). За обробки ГК встановлені зміни у біохімічному складі рослин, а саме – зменшення вмісту білкового, небілкового та загального азоту та одночасне зростання вмісту розчинних цукрів (Firuzeh et al., 2015). Також є дані про взаємозв'язок між вуглеводами і ГК на рівні регуляції трансдукції гормональних та цукрових сигналів та їх метаболічної активності. Показано, що ГК підвищують активність ферменту сахарозофосфатсинтази, стимулюючи експорт сахарози з листя, що й призводить до репродуктивного розвитку (Silva Vieira et al., 2013).

Отже вірогідно, що гормональні та трофічні фактори можуть відігравати істотну роль у регуляції яровизаційних процесів. Незважаючи на це, даних про вплив ГК на ростову реакцію проростків та фракційний розподіл розчинних цукрів у озимої пшениці впродовж експозиції за дії низьких температур (верналізації) недостатньо.

Метою даного дослідження було вивчення впливу гіберелінів та умов трофічного забезпечення яровизаційного процесу на ростову реакцію та

вміст розчинних вуглеводів в яровизованих проростках сортів озимої м'якої пшениці.

Матеріали та методи дослідження. В якості рослинного матеріалу для досліджень використовували насіння сортів озимої пшениці м'якої *Triticum aestivum* L. – Дорідна, Статна та Альянс селекції Інституту рослинництва імені В. Я. Юр'єва НААНУ [<http://www.yuriev.com.ua/index.php?lang=ua>]. Дані сорти універсального типу використання, невибагливі до умов вирощування, мають підвищену зимостійкість та в польових умовах толерантні до основних захворювань пшениці озимої. Фізіолого-біохімічні експерименти проводили на кафедрі фізіології і біохімії рослин та мікроорганізмів Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна протягом 2016-2017 р. Моделюючи різний рівень трофічного забезпечення процесу яровизації та досліджуючи вплив ГК, у досліджах використовували наступні варіанти яровизації: 1) зернівки + вода (контроль, оптимальне трофічне забезпечення); 2) зернівки + ГК, концентрація 10 мг / л (оптимальне трофічне забезпечення); 3) ізольовані зародки + вода (контроль, відсутність трофічного забезпечення); 4) ізольовані зародки + ГК, концентрація 10 мг / л (відсутність трофічного забезпечення). Зернівки пшениці стерилізували 15 % розчином гіпохлориту натрію, пророщували в темряві за $t = 22 \pm 2^\circ \text{C}$ протягом двох діб для прокльовування. Для моделювання контрастних умов трофічного забезпечення у частини зернівок, що проклюнулися, видаляли ендосперм, залишаючи ізольовані зародки. Яровизацію протягом 45 діб за фіксованої температури $+4^\circ \text{C}$ проводили в чашках Петрі. Праймування розчином ГК здійснювали протягом яровизації, додаючи його у чашки Петрі по 5 мл щотижня. Відбір проб (10 проростків кожного варіанту) здійснювали на 45-у добу яровизації – для проведення аналізу ростової реакції та визначення вмісту вуглеводів. Визначали загальну довжину проростків, надземної частини та кореня, а також їх загальну біомасу.

Для визначення вмісту розчинних моно-, олігоцукрів та їх суми використовували метод, заснований на відновленні фериціаніду калію редукуючими цукрами у лужному середовищі до фероціаніду. Останній у присутності желатину утворює із сірчаноокислим залізом стійке синє забарвлення, за інтенсивністю якого фотоколориметричним методом визначають кількість редукуючих цукрів (Методи..., 1987).

Розчинні цукри визначали в повітряно-сухому рослинному матеріалі, для чого проростки фіксували водяною парою протягом 30 хвилин за температури 110°C та підсушували протягом 1 години за температури 70°C . Витяжки цукрів отримували, екстрагуючи їх з рослинного матеріалу 80 % етиловим спиртом. У супернатанті, отриманому після 10 хвилин центрифугування витяжки при 3000 об / хв, спочатку визначали вміст редукуючих цукрів. Для визначення суми цукрів витяжки попередньо гідролізували 5 % HCl протягом 10 хвилин за 70°C . За різницею вмісту суми та моноцукрів визначали вміст олігоцукрів. Для проведення біохімічного аналізу та побудови калібрувального графіку використовували реактиви ЧДА виробництва Китай, НВФ «Сінбіас». Вміст цукрів визначали фотоколориметричним методом за використання ФЕК КФК-2МП. Проведено дві серії експериментів, біохімічні аналізи виконані у чотирьох аналітичних повтореннях. Статистична обробка даних виконана у табличному процесорі Microsoft Excel 2016. Істотність відмінностей між

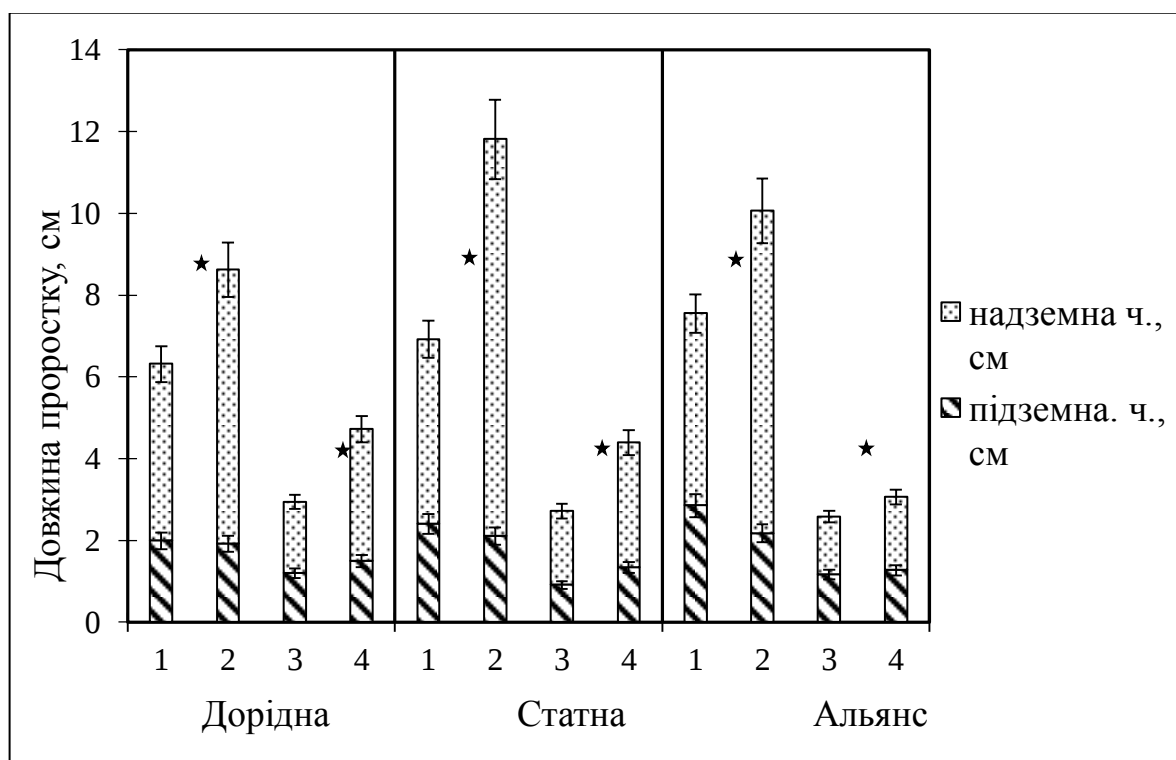
варіантами визначали з використанням t-критерія Стюдента за $P \leq 0,05$. На графіках наведені середні значення з двох серій дослідів та їх стандартні похибки.

Результати дослідження та їх обговорення.

Ростові процеси.

Відомо, що ГК задіяні у регуляції ростових процесів, для перебігу яких необхідні трофічні речовини і, перш за все вуглеводи. Для з'ясування можливого зв'язку участі ГК у регуляції ростових процесів за яровизації пшениці озимої на різних фонах трофічного забезпечення у дослідях проведено визначення лінійного росту проростків та накопичення ними біомаси.

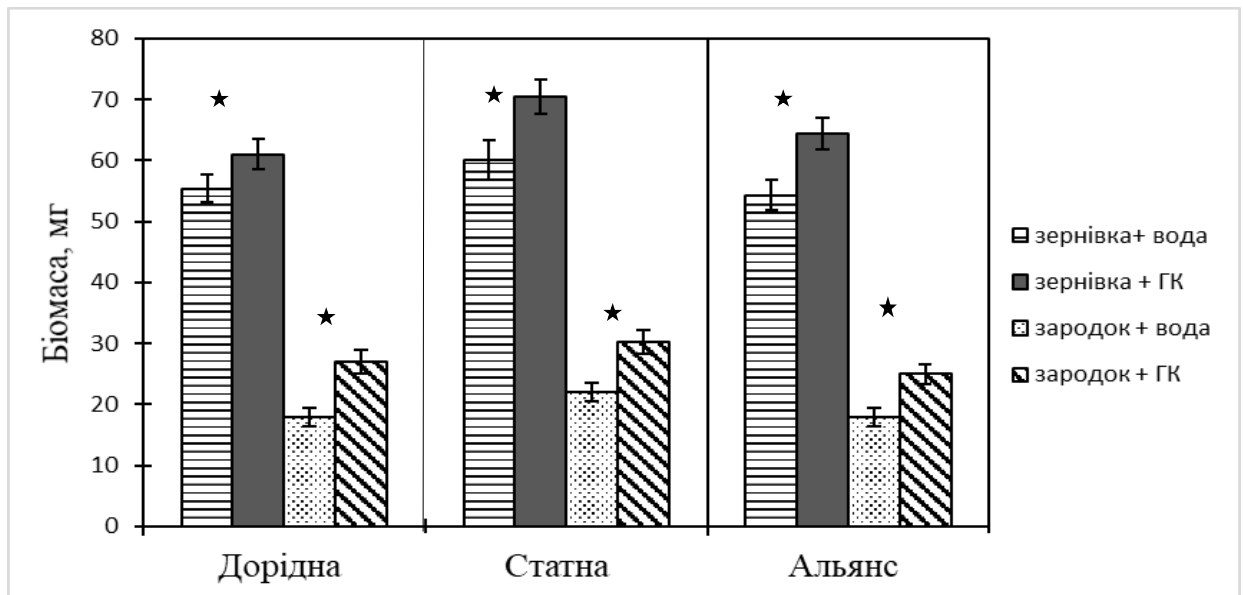
Результати визначення довжини надземної частини і кореневої системи проростків досліджуваних сортів наведені на рисунку 1. Вони показали, що у всіх сортів ГК істотно посилювала лінійний ріст надземної частини як проростків, одержаних з цілих зернівок, так і проростків, одержаних з ізолюваних зародків, порівняно до відповідних контролів. Разом з тим, лінійний ріст надземної частини проростків за відсутності трофічного забезпечення був істотно пригнічений порівняно з їх ростом за оптимального забезпечення (рис. 1). Результати показали також, що у досліджуваних сортів за однакової закономірності ефектів ГК на лінійний ріст залежно від трофічного забезпечення між ними проявляються відмінності за рівнем прояву цих ефектів. У сорту Дорідна стимулювання ГК лінійного росту за оптимального трофічного забезпечення було меншим, ніж у сортів Стана і Альянс. У варіантів з відсутністю трофічного забезпечення у сорту Дорідна ефект стимулювання ростових процесів був дещо вищим, ніж у сортів Статна і Альянс. Вірогідно, це пов'язано з генотиповими особливостями сортів, які можуть бути обумовлені різним рівнем фітогормональної регуляції перебігу трофічних процесів.



★ - різниця достовірна при $p \leq 0,05$

Рис. 1. Вплив ГК на ростову реакцію проростків сортів озимої пшениці за контрастних трофічних умов яровизації. Варіанти дослідів: 1 – зернівки + вода (контроль); 2 – зернівки + ГК; 3 – зародки + вода (контроль); 4 – зародки + ГК.

Інтегральним показником функціонування рослинного організму є біосинтетичні процеси, які характеризуються накопиченням біомаси рослиною. Тому ми визначали біомасу проростків досліджуваних сортів пшениці за яровизації на фоні різного рівня трофічного забезпечення цього процесу та праймування насіння розчином ГК. Результати дослідження показали, що біомаса проростків за умов оптимального трофічного забезпечення яровизації майже у 3 рази перевищувала біомасу проростків, що проходили яровизацію за нестачі трофічного фактору (рис. 2). ГК як в умовах оптимального трофічного забезпечення (варіант зернівки + ГК), так і за його дефіциту (варіант ізольовані зародки + ГК) стимулювала накопичення біомаси у всіх досліджуваних сортів.



★ - різниця достовірна при $p \leq 0,05$

Рис. 2. Вплив ГК на накопичення біомаси проростків сортів озимої пшениці за контрастних трофічних умов яровизації.

Факт стимуляції ГК лінійного росту і накопичення біомаси у варіанту зернівки + ГК, порівняно до варіанту зернівки + вода пояснюється наступним. Відомо, що ГК при проростанні насіння, поступаючи через щиток зародка до ендосперму, зумовлює зростання активності амілолітичного комплексу, у результаті чого запасний крохмаль гідролізується до D-глюкози та інших простих вуглеводів, які забезпечують ростові процеси необхідною речовиною та енергією (Aoki et al., 2006). Стимуляція ГК ростових процесів у проростках, одержаних з ізольованих зародків, може бути пов'язана з посиленням обмінних процесів за рахунок зростання активності ферментів, у тому числі сахарофосфатсинтази (Silva Vieira et al., 2013), яке відбувається за дії ГК.

Той факт, що ефекти ГК на ростові процеси зі значно більшою інтенсивністю проявляються у всіх сортів у варіантах з оптимальним трофічним забезпеченням, ніж за його відсутності, свідчить про зв'язок регуляції росту цим гормоном з трофічними факторами за яровизації пшениці озимої.

За результатами наших попередніх досліджень показано, що упродовж яровизації в умовах оптимального трофічного забезпечення екзогенна сахароза (3 % розчин) гальмувала ростові процеси, а за дефіциту трофічних факторів стимулювала ростову реакцію проростків озимої пшениці та пролонговано впливала на фенотайпінг рослин, що може свідчити про те, що цей вуглевод має безпосередній вплив та важливе значення на підготовку рослин до яровизації та успішного її протікання (Авксентьєва, Шулік, 2017).

Таким чином, визначення ростових процесів сортів пшениці озимої показало їх залежність від трофічної забезпеченості за яровизації. Встановлено, що праймування гібереліном насіння досліджуваних сортів за яровизації інтенсивно стимулює ростову реакцію проростків, як в умовах оптимального так і дефіциту трофічного забезпечення. Ці результати дають підставу припустити, що трофічне забезпечення процесу яровизації поряд з біологічно активними речовинами та генетичними факторами, може виступати вагомим чинником регуляції процесів росту і, вірогідно, розвитку пшениці озимої.

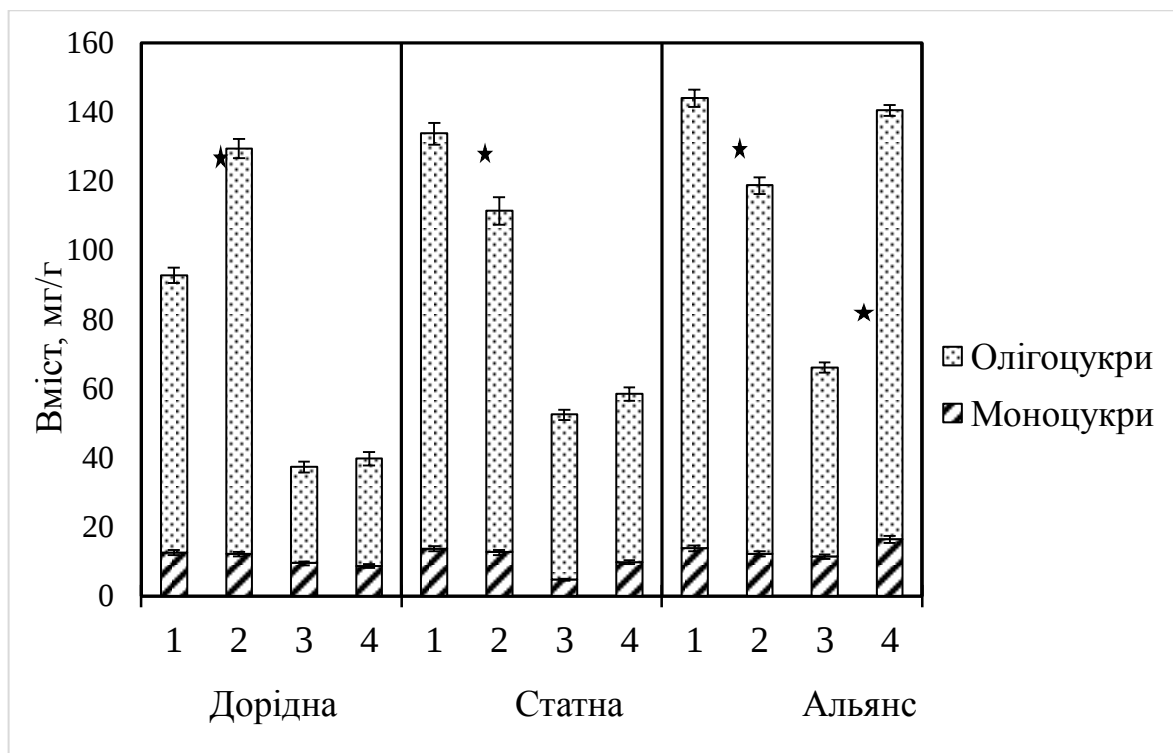
Вміст вуглеводів.

Вуглеводи відіграють істотну роль як сигнальні молекули у регуляції росту і розвитку рослин шляхом участі у експресії/репресії генів (Koch, 2004). Вірогідно, їх регуляторний ефект реалізується, коли в компартментах клітини досягається певна оптимальна концентрація, але не може реалізуватися коли їхній вміст виходить за межі оптимуму – стає надмірним або недостатнім. Про це побічно може свідчити встановлений нами факт залежності ростових процесів від рівня трофічної забезпеченості проростків за яровизації.

Дослідження впливу контрастних умов трофічного забезпечення та гіберелінів на вміст розчинних цукрів показали, що після 45 діб яровизації у всіх сортів озимої пшениці найнижчий вміст вуглеводів був у проростків варіанту ізольовані зародки + вода (умови дефіциту трофічного забезпечення) (рис. 3). Також у всіх варіантах вміст моноцукрів був нижчим порівняно до вмісту олігоцукрів. Так як моноцукри є найбільш метаболічно активними вуглеводами, можливо, вони в максимальній кількості витрачаються вже на перших етапах яровизації, а по її завершенню (у наших дослідах на 45 добу) вміст їх вичерпується для забезпечення біосинтезів. Результати визначення вмісту вуглеводів показали (рис. 3), що незалежно від варіантів досліду у проростках сорту Дорідна він був нижчим, ніж у сортів Статна і Альянс. У варіанті з оптимальним трофічним забезпеченням праймування ГК зумовлювала зростання вмісту вуглеводів у проростках сорту Дорідна, але у сортів Статна і Альянс ефект ГК за цього варіанту був протилежним. У варіанті з відсутністю трофічного забезпечення ефект ГК на вміст вуглеводів у сортів Дорідна і Статна був не істотним, у той же час як у сорту Альянс він був дуже значно стимулюючим (рис.3). Описані

ефекти у всіх сортів та по варіантах дослідів проявлялися за рахунок зміни вмісту фракції олігоцукрів. Виявлені особливості прояву ефектів ГК на вміст вуглеводів пов'язані зі стимуляцією фітогормоном ростових процесів.

У сорту Дорідна вона проявлялася меншою мірою, ніж у сортів Статна і Альянс (див. рис. 1, 2), що зумовлює у першого відповідно менші витрати вуглеводів на ростові процеси, ніж у двох останніх, а відтак і нижчий їх вміст у проростках цих сортів за дії ГК.



★ - різниця достовірна при $p \leq 0,05$

Рис. 3. Вплив ГК на вміст розчинних вуглеводів в проростках сортів озимої пшениці за контрастних трофічних умов яровизації. Варіанти дослідів: 1 – зернівки + вода (контроль); 2 – зернівки + ГК; 3 – зародки + вода (контроль); 4 – зародки + ГК.

Висновки та перспективи.

1. Під впливом ГК у всіх досліджуваних сортів пшениці озимої відбувалася стимуляція ростових процесів у проростках, інтенсивність якої залежала від рівня трофічного забезпечення цих процесів.
2. Вміст вуглеводів у проростках за яровизації залежав від рівня стимулюючої дії ГК на ростові процеси.
3. Прояв ефектів праймування ГК на ростові процеси та вміст вуглеводів був різним у досліджуваних сортів, що свідчить про його залежність від генотипових особливостей сорту.
4. Гормональні та трофічні фактори у взаємодії з генотиповими особливостями сорту пов'язані у механізмах регуляції ростових процесів та, вірогідно, розвитку пшениці озимої за яровизації.

Подальше дослідження закономірностей фітогормональної та трофічної регуляції яровизаційних процесів у пшениці озимій у зв'язку з генетичним її контролем генами *Vrn* вагоме для з'ясування фізіолого-генетичних механізмів регуляції розвитку озимих злаків.

Робота виконана в рамках науково-дослідної теми «Дослідження молекулярно-генетичних та фізіолого-біохімічних механізмів яровизаційного та фотоперіодичного контролю онтогенезу рослин *in vivo* та *in vitro*» № Держреєстрації 0118U 002104.

References

1. Dennis, E., Peacock, W. (2009). Vernalization in cereals. *Journal of Biology*, 8, (57), 1–4. doi.org/10.1186/jbiol156.
2. Avksentyeva, O. A., Zhmurko, V. V. (2011). *Fiziologiya tsveteniya* [Physiology of flowering]. Kharkiv, Ukraine: V.N. Karazin KhNU, 130.
3. Aoki, N., Scofield, G. N., Wang, X.-D., Offler, C. E., Patrick, J. W., Furbank, R. T. (2006). Pathway of Sugar Transport in Germinating Wheat Seeds. *Plant Physiology*, 141 (4), 1255–1263. doi: 10.1104/pp.106.082719.
4. Koch, K. (2004). Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, 7 (3), 235–246. doi: 10.1016/j.pbi.2004.03.014.
5. Shang, M., Wang, X., Zhang, J., Qi, X., Ping, A., Hou, L., Xing, G., Li, G. and Li, M. (2017). Genetic Regulation of GA Metabolism during Vernalization, Floral Bud Initiation and Development in Pak Choi (*Brassica rapa* ssp. *Chinensis* Makino). *Front. Plant Sci.*, 8, 1533. doi: 10.3389/fpls.2017.01533.
6. Pearce, S., Vanzetti, L.S., Dubcovsky J. (2013). Exogenous Gibberellins Induce Wheat Spike Development under Short Days Only in the Presence of VERNALIZATION1. *Plant Physiology*, 163, 1433-1445. doi: 10.1104/pp.113.225854.
7. Firuzeh, R., Khavari-Nejad, R. A., Najafi, F., Saadatmand, S. (2015). Effect of Gibberellins on Sugar, Protein and Malondialdehyde Contents in Savory Plant (*Satureja hortensis* L.) under Salt Stress. *J. Appl. Environ. Biol. Sci.*, 5 (7S), 23-29.
8. Silva Vieira, M. R., Simoes, A. N., Rocha, A. T., Silva, L. Z., Sousa, P. A. (2013). Relationship between gibberellins and carbohydrates in vegetable products. *African Journal of Plant Science*, 7 (10), 445-447. doi: 10.5897/ajps2013.1054
9. Ermakov, A. I., Arasimovich, V. V., M. I., Yarosh, N. P. et al ed. (1987). *Metody biokhymicheskogo issledovaniya rastenyi* [Methods for the biochemical analysis of plants]. Leningrad: Ahropromyzdat, 430 s.
10. Avksentyeva, O. A., Shulik, V. V. (2017). *Doslidzhennya vplyvu kontrastnykh umov trofichnoho zabezpechennya za yarovyzatsiyi na mitotychnu aktyvnist' merystem, rist ta rozvytok ozymoyi pshenytsi* [Research of influence of contrasting trophic conditions of vernalization on the mitotic activity of meristems, growth and development of winter wheat]. *ScienceRise: Biological Science*, 2 (5), 4–9. doi: 10.15587/2519-8025.2017.99664.

ВЛИЯНИЕ ПРАЙМИРОВАНИЯ ГИББЕРЕЛЛИНОМ В ПЕРИОД ЯРОВИЗАЦИИ НА РОСТ И СОДЕРЖАНИЕ РАСТВОРИМЫХ УГЛЕВОДОВ В ПРОРОСТКАХ ПШЕНИЦЫ МЯГКОЙ

В.В. Чумакова, О.А. Авксентьева

Аннотация. В работе исследовали влияние праймирования гиббереллином (ГК) в период яровизации на ростовую реакцию, содержание и

фракционный состав растворимых углеводов в проростках 3-х сортов озимой пшеницы - Доридная, Статная и Альянс. Моделируя различный уровень трофического обеспечения процесса яровизации и исследуя влияние ГК, в опытах использовали следующие варианты 1) зерновки + вода (контроль, оптимальное трофическое обеспечение); 2) зерновки + 10 мг / л ГК, (оптимальное трофическое обеспечение); 3) изолированные зародыши + вода (контроль, отсутствие трофического обеспечения); 4) изолированные зародыши + 10 мг / л ГК, (отсутствие трофического обеспечения). Яровизацию проводили в течение 45 суток при температуре 4 °С в чашках Петри на увлажненной фильтровальной бумаге. По результатам исследования установлено, что под влиянием ГК во всех исследуемых сортах пшеницы озимой происходила стимуляция ростовых процессов (линейного роста и накопления биомассы) в проростках, интенсивность которой зависела от уровня трофического обеспечения этих процессов. Праймирование ГК в варианте с отсутствием трофического обеспечения несущественно стимулировало содержание углеводов у проростков сортов Доридная и Статная, очень значительно у сорта Альянс за счет изменения содержания фракции олигосахаров. Обсуждаются закономерности фитогормональной и трофической регуляции яровизационных процессов у озимой пшеницы.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., яровизация (вернализация), ГК, трофические факторы, ростовая реакция, растворимые углеводы.

INFLUENCE OF GIBERELIN PRIMING ON GROWTH AND CONTENT OF SOLUBLE CARBOHYDRATES IN SEEDLING OF SOFT WHEAT UNDER VERNALIZATION

V.V. Chumakova, O.O. Avksentiyeva

Abstract. The present study was designed to investigate the influence of gibberellin (GA) priming under vernalization on the growth response, content and fractional composition of soluble carbohydrates in seedlings of 3 varieties of winter wheat - Doridna, Statna and Alians. Modeling different levels of trophic support of the vernalization process and investigating the influence of GA, the following variants were used in the experiments: 1) grains + water (control, optimal trophic support); 2) grains + 10 mg / l GA3, (optimal trophic support); 3) isolated embryos + water (control, lack of trophic support); 4) isolated embryos + 10 mg / l GA3 (lack of trophic support). Vernalization was carried out during 45 days at 4 ° C in Petri dishes on wet filter paper. According to the results, the stimulation of growth processes was identified under the GA effect in all investigated winter wheat varieties. The stimulation occurred as linear growth and biomass accumulation of seedlings, the intensity of which depended on the level of trophic support of these processes. The GA priming in the variant with the lack of trophic support did not significantly stimulate the content of carbohydrates in the varieties Doridna and Statna. It noticeably stimulated the content of carbohydrates in the Alians variety due to changes of oligosaccharides

content. The patterns of phytohormonal and trophic regulation of vernalization processes in winter wheat are discussed.

Keywords: *Triticum aestivum L., vernalization, GA, trophic factors, growth reaction, soluble carbohydrates.*

ОСОБЛИВОСТІ РОСТУ ТА МОРФОГЕНЕЗУ СОСНИ ЗВИЧАЙНОЇ У ЗОНІ РАДІАЦІЙНОГО ВПЛИВУ АВАРІЇ НА ЧОРНОБИЛЬСЬКІЙ АЕС

Ю. О. БОНДАР, кандидат біологічних наук, доцент кафедри радіобіології та рпадіоекології

І. М. ГУДКОВ, доктор біологічних наук, професор, завідувач кафедри радіобіології та радіоекології

Національний університет біоресурсів і природокористування України

E-mail: ingudkov@ukr.net

Анотація. Лісові насадження в умовах радіаційних аварій здатні затримувати до 90 % радіоактивних опадів. Внаслідок цього в них можуть формуватися високі дози як зовнішнього, так і внутрішнього опромінення рослин іонізуючою радіацією. Встановлено, що хвойні дерева набагато активніше накопичують ^{137}Cs і ^{90}Sr , ніж листяні. У цих умовах у рослин сосни, види якої відзначаються високою чутливістю до багатьох несприятливих факторів, у тому числі й іонізуючої радіації, відзначали аномалії в формуванні меристем, загибель верхівкових бруньок, закладку великої кількості бічних бруньок з невпорядкованою орієнтацією, спостерігали утворення вкорочених пагонів з короткою або гігантською хвоєю, яка була потовщеною або більш видовженою порівняно зі звичайною, утворення терат.

Причиною появи таких морфологічних змін була елімінація центральних клітин апікальних стеблових меристем та клітин перехідної зони, в той же час як значна частина бруньки формувалась з клітин периферійної зони. Результатом цього було зняття апікального домінування і формування низькорослих дерев з багаточисельними морфологічними порушеннями. У меристемних клітинах таких дерев спостерігали порушення поділу клітин: збільшення кількості К-мітозів, клітин з абераціями хромосом.

Ключові слова: аварія на Чорнобильській АЕС, сосна звичайна, морфози, порушення поділу клітин

Актуальність. Велике значення у перерозподілі та фіксації радіонуклідів у навколишньому середовищі мають лісові екосистеми. Ліс може відігравати роль глобального міграційного фактора. Радіонукліди, що осідають на кронах дерев, під впливом атмосферних опадів і внаслідок опадання листя переміщуються в лісову підстилку і залучаються до основних біоекологічних процесів. Саме тому надзвичайно важливим є виявлення закономірностей накопичення радіонуклідів різними видами деревних порід [1]. Особливу роль у перерозподілі радіонуклідів в лісових екосистемах відіграє сосна звичайна (*Pinus silvestris* L.), яка окрім того, що є основним лісоутворюючим видом на забруднених радіоактивними

речовинами територіях, постраждалих внаслідок аварії на Чорнобильській АЕС, ще й є однією з найбільш радіочутливих видів рослин [2].

Метою даного **дослідження** є визначення особливостей росту і розвитку рослин сосни звичайної в умовах радіоактивного забруднення території.

На прикладі унікальних популяцій сосни цього виду, що проростають на території Хренівського бору у Воронізькій області (РФ), яка не постраждала внаслідок аварії на Чорнобильській АЕС, показана надзвичайна полімофність цієї рослини і виділено 21 кліматичний екотип для даного виду [3]. Вивчено популяцію дерев середньою висотою 32,5 м, з яких збирали шишки в березні і пророщували насіння, отримане з цих шишок. Аналіз хромосом та ядерець меристематичних клітин корінців проростків сосни виявив значну варіабельність числа хромосом з перетяжками в межах одного дерева, у різних дерев та в популяції в цілому. Число ядерець суттєво варіювало (від 2 до 12). Максимальне значення хромосомних порушень за мітозу не перевищувало 2,1 %, що для сосни є рівнем спонтанного мутаційного процесу. Знайдено близько 1 % клітин з мікроядрами, що вказує на наявність нерепарованих пошкоджень хромосом. Умови існування цієї популяції сосни не оптимальні внаслідок суттєвого антропогенного впливу. В оптимальних умовах Усманського бору (РФ) варіабельність хромосомних порушень клітин меристем коренів проростків сосни звичайної значно менша.

Вивчення інших популяцій сосни звичайної, які не зазнавали впливу понадфонового іонізуючого опромінення, показало, що вони надзвичайно чутливі до умов зовнішнього середовища [4–6]. Встановлено, що під впливом несприятливих умов зростає самоопилення рослин, що спричиняє дефіцит гетерозигот і зміщення в загальнопопуляційному пулі в бік збільшення гомозигот. Життєздатність пилку сосни за пророщування в сахарозі та у воді зменшується, як і довжина пилкових трубочок. Найсуттєвіші зміни спостерігались за дефіцитом води. Отже, сосна належить до надзвичайно чутливих до несприятливих умов середовища видів рослин.

Дослідження, які були проведені у 80–90-х роках минулого століття щодо аналізу популяцій сосни, що росли в місцях проведення ядерних випробувань 40–50-х років, свідчить про високу здатність виду до консервації генетичних змін, викликаних дією радіаційного чинника [7, 8]. З метою вивчення порушень мейозу дослідили 279 зразків (пагони з чоловічими (мікростробіли) та жіночими (мегастробіли) шишками і насіння) від 119 рослин сосни звичайної, що росли в семи лісництвах Алтайського краю (РФ). Встановлено, що популяції дерев достовірно (в десятки разів) відрізняються за числом клітин з порушеннями в першому мейотичному поділі та за числом шишок із порушеннями в залежності від району. Головний тип генетичних змін – затримання утворення веретена поділу, яке спричиняло нерозходження хромосом і їх лізис, а також порушення в розходженні унівалентів. В контрольних зразках спостерігали 1–3 % аберацій в першому поділі мейозу та 0,4–0,8 % – другому, що не перевищує рівень спонтанної мінливості. Автори приходять до висновку, що негативний вплив радіонуклідів на окремі рослини накопичувався протягом багатьох років, а мейоз виступає в ролі бар'єра по відношенню до передачі нащадкам

деяких типів мутацій, внаслідок чого утворюється нежиттєздатне насіння та стерильний пилок. Порушення клітинних поділів є ознакою, яка знаходить під контролем відбору. Встановлено, що частота аномалій в мейозі в дослідних популяціях сосни достовірно відрізняється від того, що відзначено в контрольній популяції.

Соснові насадження в умовах радіаційної аварії здатні затримувати до 90 % радіоактивних опадів [9, 10]. Значна поглинальна здатність обумовлена тим, що поверхня багаторічної не опадаючої хвої протягом цілого року концентрує радіонукліди. В 1986 р. внаслідок аварії на Чорнобильській АЕС на площі до 500 га поглинута доза перевищувала 150 Гр, що спричинило повну загибель сосни та ялини 15–30-річного віку протягом трьох наступних років [11]. На інших територіях зі значно меншою дозою опромінення того ж року відзначали утворення вкорочених пагонів з густо розташованими зачатками листків та передчасне опадання хвої.

Найчастіше у 1987 р. у рослин сосни відзначали аномалії в формуванні меристем, пошкодження меристем, загибель верхівкових бруньок, закладку великої кількості бічних бруньок з невідповідною орієнтацією. Утворювались вкорочені пагони з короткою або гігантською хвоєю, яка була потовщеною або більш видовженою порівняно зі звичайною. Кількість бруньок на таких пагонах перевищувало норму.

В 1988 р. відзначено утворення терат, які ще називають „відьмині мітли”. Причиною появи таких морфологічних змін була елімінація центральних клітин апікальних стеблових меристем сосни та клітин перехідної зони, в той же час як значна частина бруньки формувалась з клітин периферійної зони. Взимку 1987–1988 рр. було знайдено потовщення бруньок та заглиблення в місці розташування апексу. У пагонів з жовтою та вкороченою хвоєю латеральні бруньки здебільшого не розвивались. Значне розширення бруньки обумовлювалось збільшення кількості клітин периферійної меристеми. Покривні луски нерідко модифікувались в голки.

В 1993–1994 рр. у 50–60 % рослин сосни та ялини 2–9-річного віку була відзначена друга хвиля аномального морфогенезу, яка обумовлювалась поєднанням зовнішнього, інкорпорованого та хронічного опромінення [12]. Причиною появи цього явища були пожежі 1990–1992 років у 30-кілометровій зоні навколо Чорнобильської АЕС, що призвело до вигорання лісової підстилки і, як наслідок, до осадження на деревах та інших компонентах біогеоценозу радіоактивно забрудненої золи.

Пізня стадія аварії на Чорнобильській АЕС характеризується появою численних морфологічних змін у соснових насадженнях на території колишнього «Рудого лісу» та на порядок нижчими значеннями для інших територій зони відчуження [13]. Дослідження, які були проведені у 2005–2009 рр., показали, що основним видом морфологічних порушень у рослин сосни звичайної були зняття апікального домінування за розвитку крони дерева, поодинокі зустрічались оголення пагонів та депігментація хвої на окремих гілках – виникнення хлорофільних мутацій. Авторами була розроблена модель дозового навантаження на верхівкову меристему сосен з урахуванням вмісту радіонуклідів у різних органах та тканинах рослини та їх сезонну динаміку. Використовуючи дану модель було визначено, що на контрольному полігоні поблизу міста Іванків Київської області за дозового навантаження на

верхівкову меристему 4,5 мГр / год морфологічні зміни виявляються у 6 % дерев, на полігоні «Копачі» (зона відчуження Чорнобильської АЕС) даний показник складає 1,9 сГр / год за 46 % дерев, а на полігоні «Рудий ліс» потужність дози досягала декількох Гр / год і частота морфологічних порушень складала 69 %.

За вивчення аномально вкороченої хвої сосни звичайної, яку збирали в районі с. Янів у січні 2001 р., була виявлена зміна рівня експресії 42 генів, у двох з них відзначали особливий рівень експресії [14]. Це гени, що кодують убіквітинзв'язувальний фермент та аскорбатпероксидазу. Автори приходять до висновку, що в аномальній хвої особливо зростає синтез аскорбатпероксидази. Це не дивно і очевидно навіть без складних аналізів, адже добре відомо, що різні стресові чинники, у тому числі й іонізуюча радіація, спричиняють окислювальний стрес, яких супроводжуються утворенням перекису водню, вільних радикалів, окислених сполук, а еволюційно сформовані системи, до складу яких входить аскорбатпероксидаза, призначені утилізувати такі сполуки і захищати клітину від пошкоджуючої дії стресового чинника.

Вивчення каріотипу сосни звичайної з зони відчуження ЧАЕС проводили в 1999 р. [15]. Як об'єкт дослідження використовували вкорочену та нормальну хвою 7–12-річних дерев, яку збирали в червні 1999 р. поблизу с. Янів на посадках, розташованих у пунктах тимчасового захоронення та локалізації радіоактивних відходів, де потужність зовнішнього γ -опромінення складала 1–3 мР / год. Загальна кількість клітин з хромосомними абераціями та порушеннями мітотичного апарату у контрольній хвої складала 23,14 %, а у аномальної – 35,86 %. Кількість клітин з К-мітозами у контрольній хвої складала 18 %, а у аномальної – 24,1 %, клітин з мітками в контролі 4,4 %, в досліді – 8,5 %, клітин з фрагментами в контролі – 0,74 %, в досліді – 3,26 %. Отже, в умовах радіаційної аномалії відзначаються суттєві порушення процесу поділу соматичних клітин хвої. На жаль, автори не приводять відповідних даних для рослин, які вирощувались в чистій зоні, тому важко оцінити наскільки отримані дослідниками результати відхиляються від значень спонтанної мінливості у сосни даного регіону.

У роботах інших авторів, які досліджували соснові насадження на території колишнього «Рудого лісу» біля села Копачі та міста Іванків (умовний контроль), відзначається, що найбільша кількість аберантних змін (75–95 % від загальної кількості аберацій) апікальної меристеми насінневих корінців була представлена фрагментами, водночас відзначалася тенденція до зростання їх внеску в загальну кількість аберацій із збільшенням забруднення майданчика, тоді як внесок інших видів аберацій, відповідно, зменшувався [16]. Відносна кількість аберацій корелювала з рівнями радіоактивного забруднення дерев і її можна ранжирувати так: «Рудий Ліс» на траншеї > «Рудий Ліс» поза траншеєю > «Копачі» > «Іванків». Частота порушень у генетичному матеріалі зростала від 8 % за дозового навантаження 4,5 мГр / рік на полігоні «Іванків» до 34 % за дози 5,3 Гр / рік на полігоні «Рудий ліс». Отримані результати описуються класичною залежністю «доза-ефект».

На дослідній ділянці лісництва Дубровицького району Рівненської області було встановлено, що найбільша частка сумарної активності ^{137}Cs

екосистеми (76,5 %) була зосереджена у ґрунті, в тому числі 18,1 % у лісовій підстилці та 58,4 % – у мінеральних шарах ґрунту [1]. Відповідно, компоненти надземної фітомаси ценозу утримували 23,5 % валового запасу ^{137}Cs лісової екосистеми. У зв'язку із значною фітомасою частка деревного ярусу у розподілі ^{137}Cs в екосистемі є визначальною серед компонентів фітоценозу – 13,7 %. На основі отриманих результатів радіологічного дослідження було визначено, що вміст радіонуклідів ^{137}Cs у дуба звичайного (*Quercus robur* L.) становив в середньому 1786 Бк/кг; сосни звичайної (*Pinus sylvestris* L.) 2394 Бк/кг; берези повислої (*Betula pendula* R.) – 1590 Бк/кг. Загалом, автори роблять висновок, що хвойні дерева набагато активніше накопичують ^{137}Cs і ^{90}Sr , ніж листяні породи (вони є більш швидкоростучими, окрім того важливу роль в накопиченні нуклідів відіграє хвоя).

Проведено аналіз насіння сосни звичайної, яке збирали на Старопетрівській лісній дослідній станції Київської області (контроль) та в різних місцях 30-кілометрової зони ЧАЕС (с. Новошепеличі, с. Чистогалівка, с. Дитятки) [17]. Насіння контрольного варіанту за період формування отримало поглинену дозу від 0,03 до 6 Гр. Зразки насіння, зібраного в різних місцях 30-кілометрової зони, з різних дерев об'єднували в одну партію для нівелювання явища індивідуальної мінливості. Частину зразків насіння сосни звичайної контрольного та дослідного варіантів додатково опромінювали γ -радіацією в дозах 0,03, 3 та 6 Гр. В неопроміненому контролі схожість насіння складала $67,2 \pm 5,3$; після опромінення в дозі 0,03 Гр – $58,2 \pm 2,7$; дозі 3 Гр – $66,0 \pm 5,2$ і 6 Гр – $63,2 \pm 4,1$ %. Подібні показники проростання насіння сосни звичайної були зареєстровані й іншими дослідниками [18]. Однак, життєздатність протопластів клітин, виділених з коренів проростків довжиною 40–60 мм і визначених за допомогою вітальних барвників без додаткового опромінення у всіх варіантах складала 99,9 %, після опромінення в дозі 20 Гр складала від 86 до 98 %, в дозі 40 Гр – від 76 до 97,8 %. Авторами виявлені незначні розбіжності в кінетиці елімінації розривів ДНК в різних варіантах, тому робиться висновок, що репаративні системи ефективно працюють лише у разі значного радіаційного навантаження на систему. Проведені дослідження збіднює фактична відсутність контролю, адже всі проби насіння відбирались в місцевостях, що зазнали суттєвого впливу радіаційного забруднення, адже в оптимальних умовах росту схожість насіння сосни звичайної варіює в межах 90–98 % [3].

Дослідження, що проводились в найбільш радіоактивно забруднених місцях Брянської області (РФ) протягом 2007–2011 рр. показали, що основним дозоутворюючим радіонуклідом даної місцевості був ^{137}Cs , питома активність якого у верхньому 5-см шарі ґрунту коливалась в діапазоні 1570–96900 Бк / кг та в 20–1320 разів перевищувала цей показник на контрольній ділянці [19]. Максимальний вміст ^{137}Cs і ^{90}Sr в шишках соснових дерев перевищував цей параметр для контрольних полігонів у 315 та 78 разів відповідно, поглинута доза генеративними органами коливалась в межах 0,13–129,9 мГр / год. Якість насіння експериментальних популяцій протягом всіх років досліджень вирізнялась підвищеною мікроковою мінливістю і не виявляла зв'язку з рівнями радіоактивного забруднення майданчиків або поглинутою генеративними органами сосни дозою. Тому автори прийшли до

висновку, що кількість абортивного насіння та його схожість визначалась впливом інших факторів, зокрема погодними умовами.

Вивчення міграції ^{137}Cs у кедрових лісах забруднених внаслідок аварії на АЕС «Фукусіма-1» (Японія) у 2014–2016 рр. показало, що питома активність у надземній біомасі, зокрема деревній рослинності, за дослідний період залишалась сталою, в той час як у підстилці вміст радіонуклідів значно зменшився (від 20 ± 11 % у 2014 р. до $4,6 \pm 2,7$ у 2016 р.). Причинами пониження у підстилці концентрації ^{137}Cs були вимивання у ґрунт та зменшення забруднення свіжого опаду листя. 80 % радіонуклідів екосистеми містились у верхньому 5-см шарі ґрунту [20]. Порівнявши перерозподіл радіоактивного та стабільного цезію між різними компонентами екосистеми автори прийшли до висновку, що радіонуклід поступово наближається до квазірівноважного стану зі своєю стабільною формою у надземній біомасі. Баланс маси запасів радіонуклідів, що враховував надходження ^{137}Cs у підстилку та дерева, дозволив приблизно оцінити щорічний притік внаслідок кореневого всмоктування на рівні 2 ± 1 % від його загальної кількості в екосистемі.

Отже, техногенні катастрофи, до яких належить й наймасштабніша радіаційна аварія на Чорнобильській АЕС, можуть призводити до зміни рослинного покриву внаслідок різної чутливості окремих видів рослин до дії пошкоджуючого чинника [2]. Вивчення особливостей росту й розвитку сосни звичайної в умовах радіонуклідного забруднення територій однозначно свідчить про цей процес. І хоча такі дослідження проводяться протягом тривалого часу з використанням різноманітних методів та підходів, однак значна кількість даних залишилась фрагментарними, неповними, нерідко відсутній повноцінний адекватний контроль. Відсутні також чіткі дані про частоту та кількість морфогенних аномалій, немає їх класифікації. На сьогодні через 32 роки після аварії на Чорнобильській АЕС розглядаються вже віддалені, але абсолютно очевидні наслідки радіаційної дії. Необхідно провести детальний системний моніторинг насаджень сосни в зоні відчуження Чорнобильської АЕС за ознакою частоти появи морфогенетичних аномалій у дерев різного віку, життєздатності насіння, стану бруньок, аномалій поділу соматичних клітин хвої та проростаючого насіння. Для відбору проб потрібно залучити значно більше рослин, ніж в проведених до цього часу дослідженнях, що дозволить отримати достовірні результати, охарактеризувати стан насаджень сосни та з'ясувати причини пригнічення їх росту. При цьому обов'язково слід враховувати і безсумнівний вплив на ці процеси місця зростання рослин – ґрунтове покриття, кислотність ґрунту, забезпечення водою та елементами живлення, інше.

References

1. Trohymchuk, I. M. (2015). Lisorozvedennya na radioacsi'no zabrydneni' terutorii [Forest felling on radioactive contaminated territory]. Herald of Cherkasy University, 19, 121–126.
2. Gudkov, I. M. (2016). Radiobiologiya [Radiobiology]. Oldi-Plus, 504.
3. Butorina, A. K., Cherkashchina, A. I., Chernobov, A. I., Avdeyeva, I. A. (2005). Izmenchivost csutologicheskikh pokazatele' semyan sosnu obuknovenno'

ynikalnogo Hrenovskogo bora [Variability of cytological indices of pine seed of the ordinary exceptional Khrenovsky boron]. Genetics, 41 (6), 778–783.

4. Korshikov, I. I., Kalafat, L. A. (2004). Sravnitelnoe izychenie allozimnogo polimorfizma v gryppah derev'ev sosnu obuknovenno' (Pinus silvestris L.) s razno' semenno' prodyktivnostyu [Comparative study of allozym polymorphism in groups of pine trees (Pinus silvestris L.) with different seed production]. Cytology and Genetics, 38 (2), 9–14.

5. Shigapov, Z. H., Timeryanov, A. Sh., Yanbaev, Yu. A., Shigapov, A. I. (1996). Dinamika geneticheskoy struktury potomstva po godam na lesosemennoi plantacii i v prirodnoi populyacii sosnu obuknovennoi (Pinus silvestris L.) [Dynamics of the genetic structure of offspring by years on the forest-seed plantation and in the natural population of pine common]. Genetics, 32 (10), 1362–1370.

6. Romanovsky M. G. (1989). Gematofytnaya smertnost' senmyapochek sosny obuknovennoy [Gametophyte death rate of Scots pine buds]. Genetics, 25 (1), 99–107.

7. Tikhomirov, F. A., Fedotov, I. S. (1982). Radiochustvitelnost' generativnykh i vegetativnykh organov sosny obuknovennoy v usloviakh osennego i vesennego oblucheniya [Radiosensitive of generative and vegetative organs of Scots pine in the conditions of autumn and spring irradiation]. Radiobiology, 22 (4), 502–510.

8. Peltek, S. E. i dr. (1996). Izuchenie populyatsiy vyshykh rasteniy, nahodyaschihsya v zone vliyaniya Semypalatinskogo poligona [Study of higher plants populations located in the zone of influence of the Semipalatinsk test site]. Cytology and Genetics, 30 (4), 9–14.

9. Grodzinskiy, D. M., i dr. (1991). Antropogennaya radionuklidnaya anomal'ya i rasteniya [Anthropogenic radionuclide anomaly and plants]. Kiev, Ukraine: Lybid, 160.

10. Kozubov, G. M., Taskaev, A. I. (1994). Radiobiologicheskie i radioekologicheskie issledovaniya drevesnykh raiteniy [Radiobiological and radioecological studies of woody plants]. Sankt-peterburg, Russia: Nauka, 248.

11. Gudkov, I. M., Gaichenko, V.A., Kashparov, V.O. (2017). Sil'skogospodars'ka radioekologiya [Agricultural radioecology]. Kiev, Ukraine: Lira-K, 268.

12. Srochinskiy, B. V. (1998). Osobennosti belkovogo sostava anomal'noy hvoi eli (Picea abies) i sosny (Pinus silvestris) iz 10 km zony Chornobyl'skoy AES [Special of the protein consist of the anomal fir needles (Picea abies) and pine (Pinus silvestris) from the 10 km zone of the Chernobyl Nuclear Power Plant]. Cytology and Genetics, 32 (5), 35–40.

13. Yoschenko, V. I., Bondar, Yu. O. (2009). Dozovaya zavisimost' chastoty morfologicheskikh izmeneniy v nasazhdeniyakh Pinus sylvestris L. V Chernobyl'skoy zone otchuzhdeniya [Dose dependence of the frequency of morphological changes in plantations of Pinus sylvestris L. in the Chernobyl exclusion zone]. Radiation biology. Radioecology, 48 (1), 258–274.

14. Zelena, L. B., Sorochn'sky, B. V. (2005). Osoblivosti ekspresii geniv u morfologichno anomal'noi hvoi sosny zvychainoi [Special of gene expression in morphological abnormal Scots pine needles]. Ukrainian Botanical Journal, 77 (1), 78–83.

15. Zelenaya, L. B., Srochinskiy, B. V., Grodzinskiy, D. M. (2002). Osobennosyu kariotipa tkaney sosny (Pinus silvestris L.) sformirovavshih morfologicheskies anomalii v usloviakh zonu otchuzhdeniya Chernobyl'skoy AES [Special karyotype of pine matter (Pinus silvestris L.) that formed morphological anomalies in the Chernobyl exclusion zone]. Reports NAS Ukraine, 1, 172–175.

16. Yoschenko, V. I., et al. (2011). Chronic irradiation of Pinus sylvestris in the Chernobyl exclusion zone: dosimetry and radiobiological effects. Health Physics, 101 (4), 393–408.

17. Sokolov, M. V., Isaenkov, C. B., Sorochn'sky, B. V. (1998). Hronichne oprominennya v malykh dozah zdatne modifikuvaty pokaznyky zhittediyal'nosti sosny

zvychainoi (Pinus silvestris L.) [Chronic irradiation in small doses can modify the viability indicators of pine (Pinus silvestris L.)]. Cytology and Genetics, 32 (4), 65–71.

18. Shevshenko, V. A., i dr. (1996). Geneyticheskie posledstvia dlya populyacii rasteniy radioaktivnogo zagryazneniya okruzhayuschey sredy v svazi s Chernobyl'skoy avariey [Genetic implications for the plants population of radioactive contamination of the environment in connection with the Chernobyl accident]. Radiation biology. Radioekology, 36 (4), 531–545.

19. Geras'kin, S. A., Vasil'ev, D. V., Kuz'menkov, A. G. (2015). Osobennosti formirovaniya semyan sosny obyknovennoy v otдалennuy period posle avarii na Chernobyl'skoy AES [Special of pine seed formation in the remote period after the accident at the Chernobyl nuclear power plant]. Radiation biology. Radioekology, 55 (5), 539–547.

20. Yoschenko, V., Takase, T., Hinton, T. G., Nanba, K., Onda, Y., Konoplev, A., Goto, A., Yokoyama, A., Keitoku, K. (2018). Radioactive and stable cesium isotope distributions and dynamics in Japanese cedar forests. Journal of Environmental Radioactivity, 186, 34–44.

ОСОБЕННОСТИ РОСТА И МОРФОГЕНЕЗА СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ В ЗОНЕ РАДИАЦИОННОГО ВЛИЯНИЯ АВАРИИ НА ЧЕРНОБЫЛЬСКОЙ АЭС

Ю. О. Бондарь, И. Н. Гудков

Аннотация. Лесные насаждения в условиях радиационных аварий способны задерживать до 90 % радиоактивных осадков. Вследствие этого у них могут формироваться высокие дозы, как внешнего, так и внутреннего облучения растений ионизирующей радиацией. Установлено, что хвойные деревья намного активнее накапливают ^{137}Cs и ^{90}Sr , чем лиственные. В этих условиях у растений сосны, виды которой определяются высокой чувствительностью ко многим неблагоприятным факторам, в том числе и ионизирующей радиации, определили аномалии в формировании меристем, гибель верхушечных почек, закладку большого количества боковых почек с беспорядочной ориентацией, наблюдали образование укороченных побегов с короткой или гигантской хвоей, которая была утолщенной или более удлинённой по сравнению с обыкновенной, образование терат.

Причиной появления таких морфологических изменений была элиминация центральных клеток апикальных стеблевых меристем и клеток переходной зоны, в то же время как большая часть почки формировалась из клеток периферийной зоны. Результатом этого было снятие апикального доминирования и формирование низкорослых деревьев с многочисленными морфологическими нарушениями. В меристемных клетках таких деревьев наблюдали нарушения деления клеток: увеличения количества К-митозов, клеток с аберрациями хромосом.

Ключевые слова: авария на Чернобыльской АЭС, сосна обыкновенная, морфозы, нарушения деления клеток

FEATURES OF PINE TREE'S GROWTH AND MORPHOGENESIS IN THE RADIATION EFFECT ZONE OF THE CHORNOBYL NPP ACCIDENT

Yu. Bondar, I. Gudkov

Abstract. *Forest plantations can hold up to 90 % of radioactive precipitation in the conditions of radiation accidents. As a result, plants can obtain high doses of both external and internal irradiation by ionizing radiation. It is established that conifers are much more active accumulate ^{137}Cs and ^{90}Sr than deciduous trees. Under these conditions pine trees which are characterized by high sensitivity to many unfavorable factors, including ionizing radiation, noted anomalies in the formation of meristems, the death of apical buds, the formation of a large number of side buds with disordered orientation, observed the formation of truncated shoots with short or a giant needles that were thickened or more elongated than conventional, the formation of teratomas. The reason for the appearance of such morphological changes was the elimination of the central cells of the apical stem meristems and cells of transitional zone, while a significant part of the bud was formed from cells of the peripheral zone. The result was the removal of apical dominance and the formation of low-growing trees with many morphological disturbances. There was a violation of the division of cells in meristem cells of such trees: an increase in the number of K-mitoses, cells with chromosomal aberrations.*

Keywords: *accident at the Chernobyl nuclear power plant, pine tree, morphoses, violation of cell division*

АНАЛІЗ РОСТОВИХ ТА ЗАПЛІДНЮЮЧИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ГАММА-ОПРОМІНЕНОГО ПИЛКУ ТЮТЮНУ ДУХМЯНОГО

Л. В. ГРУБСЬКА, кандидат біологічних наук, докторант
І. М. ГУДКОВ, доктор біологічних наук, професор, завідувач кафедри
радіобіології та радіоекології
А. В. КЛЕПКО, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник,
докторант
С. В. АНДРЕЙЧЕНКО, доктор біологічних наук, професор
**Національний університет біоресурсів та природокористування
України**
E-mail: Grubskalyuda@bigmir.net

Анотація. Гамма-опромінений пилок дуже часто використовується як інструмент генетичного реконструювання рослинної клітини. З цього приводу виникає потреба у проведенні поглиблених наукових досліджень для створення базової радіобіологічної теорії, щоб пояснити встановлені явища. Метою роботи було вивчення дії гамма-опромінення в різних дозах на проростання пилку тютюну духмяного (*Nicotiana alata*) *in vitro*, ростові властивості пилкових трубок та мітотичний поділ генеративної клітини на спермії. Попередньо висушений пилок опромінювали гамма-променями ^{60}Co в дозах 50 – 3000 Гр, а потім пророщували на стерильній водопровідній воді з додаванням 10 % цукрози та 0,01 % борної кислоти. Проростання та довжину пилкових трубок визначали за допомогою окуляр-мікрометра під мікроскопом «МБИ-3» на збільшенні $\times 150$. Ядра пилку забарвлювали 2 % ацетоорсеїном. Встановлено, що гамма-радіація пригнічує проростання та ріст пилкових трубок, зводячи їх нанівець при дозах вище 2000 Гр. В той же час поділ генеративної клітини на спермії повністю припинявся за дози 300 Гр і вище. Також було відмічено дозозалежне уповільнення швидкості росту пилкових трубок. Сукупність встановлених радіаційних змін в пилку, на нашу думку, має сприяти здійсненню гіногенезу та апоміксису.

Ключові слова: пилок, *Nicotiana alata*, пилкові трубки, гіногенез, апоміксис, гамма-опромінення

Актуальність. На сучасному етапі розвитку людства, коли спостерігається невпинне стрімке зростання загальної чисельності населення, поступове виснаження природних та земельних ресурсів, а також різка зміна кліматичних умов на всій планеті, найважливішого значення набуває проблема прискорення селективного процесу та розробки нових підходів збагачення видового генофонду для створення високопродуктивних рослинних форм з ознаками підвищеної резистентності до різних абіотичних та біотичних чинників.

Доведено, що успішність реалізації такої програми базується, в першу чергу, на використанні прийомів генетичного конструювання клітини. В той же час, ефективність застосування останніх прямим чином залежить від нашого вміння управляти процесом запліднення та своєчасно запускати амфіміктний або апоміктний шлях розвитку ембріону. На відміну від амфіміксису, апоміксис дає змогу безпосередньо отримувати гаплоїди та дигаплоїди і тим самим досягати бажаної гомозиготності генів вже в першому поколінні, що значно скорочує час для виведення інбредних ліній та нових сортів.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Аналіз даних наукової літератури щодо виникнення апомікса у вищих рослин свідчить про те, що використання опроміненого іонізуючою радіацією пилку у запиленнях з метою індукції гаплоїдного та диплоїдного партеногенезу набуває все більш широкого застосування у рослинництві. Так, групі індійських вчених на чолі з М. Кундю вдалося отримати гаплоїди грейпфрута (*Citrus grandis*) шляхом проведення запилення пилком цитруса видів *Citrus limetta* та *Citrus sinensis*, після його гамма-опромінення в дозах 300 та 400 Гр, відповідно [1]. За менших доз гаплоїди не утворювались. Автори сповістили, що виживання гаплоїдів залежало від стану ендосперма, котрий в більшості випадків був недорозвинутим. Через це, насінні зачатки разом з ембріонами вилучали на 50-й день після запилення та переносили на поживне середовище і таким чином отримували зрілі гаплоїдні рослини.

Двом польським вченим, К. Мусіаль та Л. Прживарі, вдалося отримати гаплоїди ківі (*Actinidia deliciosa*) сорту «Гайвард» шляхом запилення гамма-опроміненим пилком того ж виду, але іншого сорту, зокрема «Томурі» або «Матуа» [2]. Виявилось, що найбільший вихід гаплоїдів спостерігався при дозі в 800 Гр. До того ж, отримане гаплоїдне насіння було повноцінним, оскільки містило ембріони разом з розвинутим ендоспермом. Це згодом давало можливість вирощувати гаплоїдні рослини без використання спеціального поживного середовища та методики культивування ембріонів. До того ж, групою французьких вчених було показано, що ефективність індукції гаплоїдного партеногенезу у ківі залежить від генотипу донора пилку. При цьому показано здатність у деяких гаплоїдних рослин спонтанно подвоювати свій геном і переходити на дигаплоїдний рівень [3].

Група турецьких вчених досліджувала вплив батьківського геному пилку на утворення гаплоїдів у кавуна (*Citrullus lanatus*) [4]. Встановлено, що найбільший вихід гаплоїдів, а саме 6,25 гаплоїдних ембріонів на 100 насінин, вдається отримати у запиленнях гамма-опроміненим в дозі 275 Гр пилком сорту «Устун F1». Отримані дані також вказують на існування генетичної детермінованості гіногенезу.

Гіногенетичні гаплоїди вдалось отримати також у гарбуза (*Cucurbitata* перо L.), причому дози опромінення пилку в 25 Гр та 50 ГР виявились найбільш ефективними для індукції партеногенетичного розвитку яйцеклітин [5]. Також встановлено, що частота появи гаплоїдних рослин гарбуза виду *Cucurbitata moschata* на 100 насінин та 100 ембріонів дорівнювала 0,24 та 0,94, відповідно. Через те, в одному плоді такого гарбуза могло знаходитись до 33 % гаплоїдного насіння [6].

Використання гамма-опроміненого пилку зумовило виникнення гаплоїдного партеногенезу у дині, що згодом дало змогу отримати зрілі гаплоїдні рослини. Гаплоїди проявляли схильність до спонтанного перетворення у дигаплоїди та ($1n/2n$) – міксоплоїди [7]. Також в літературі повідомлялось про успішне отримання гаплоїдів цибулі шляхом комбінованого застосування гіногенезу та культури ембріонів [8]. У мушмули японської (*Eriobotrya japonica*) вдалося отримати життєздатне гаплоїдне насіння шляхом застосування дози в 150 Гр для опромінення пилку з наступною індукцією гіногенезу [9]. В той же час, є повідомлення про безуспішні спроби отримати зрілі гаплоїди слив та полуниць [10, 11].

Тут варто також звернути увагу на те, що у деяких рослин, зокрема у деяких видів тютюну, запилення пилковими сумішами з гамма-опроміненим компонентом іншого виду, як правило, зумовлює індукцію диплоїдного партеногенезу та появу дигаплоїдних рослин, міняючи при цьому стадію гаплоїдизації [12].

Таким чином, проведений аналіз літератури показав, що гамма-опромінення пилку може стати основою для створення сучасних біотехнологій в рослинництві для прискорення селекції та сортовиведення лише в тому разі, якщо будуть детально вивчені радіобіологічні реакції пилку на гамма-опромінення та встановленні найбільш оптимальні дозові межі для індукції певного генетичного феномену, а саме гаплоїдного партеногенезу, диплоїдного партеногенезу, мутагенезу, трансгенезу та партенокарпії, що стане передумовою для побудови загальної концепції щодо участі гамма-опроміненого пилку у заплідненні та ембріогенезі.

Метою дослідження було вивчення дії гамма-опромінення в різних дозах на проростання пилку тютюну духмяного (*Nicotiana alata*) *in vitro*, ростові властивості пилкових трубок та мітотичний поділ генеративної клітини на спермії.

Матеріали та методи дослідження. Тютюн духмянний (*Nicotiana alata*) – це однолітня квіткова рослина, яку протягом літнього періоду вирощували у вегетаційному будиночку за звичайних умов. З метою збору пилку, спочатку збирали нерозкриті бутони, вилучали з них пиляки перед початком антезису та переносили їх в чашки Петрі, де тримали протягом 30 год при температурі 20 °C та вологості повітря 60 %. Після розкриття пиляків з них витрушували пилки, котрий згодом зберігали в бюксах за -18 °C.

Пилки пророщували в розчині 10 % цукрози та 0,01 % борної кислоти на водопровідній воді, яку попередньо профільтрували під тиском через мікропоровий фільтр фірми «Millipore» з діаметром пор в 0,22 мкм. Для пророщування 0,2 мг пилку спочатку його переносили на покривне скельце, а потім за допомогою голки рівномірно розподіляли по поверхні краплі, що містила 0,04 мл поживного середовища. Приготовлені таким чином препарати розміщали в чашках Петрі разом зі шматками вологого фільтрувального паперу для запобігання висихання пилкової суспензії. Пророщування контрольного та гамма-опроміненого пилку проводили у трьох повторностях за температури +28 °C та освітленості в 800 лк. Пилки вважали пророслими, якщо довжина пилкової трубки була не менше діаметра пилкового зерна. Вважається, що за такої ситуації в пилку вже починається синтез пектинових речовин, котрі так необхідні для побудови

клітинної стінки [13]. Проростання та довжина пилкових трубок визначали за допомогою окуляр-мікрометра під мікроскопом «МБИ-3» (Росія) на збільшенні $\times 150$. В деяких випадках з метою більш довготривалого зберігання тимчасових препаратів пилку їх фіксували та фарбували 0,1 %-вим розчином анілінового блакитного в лактофенолі, що складався з рівних об'ємних частин молочної кислоти, гліцерину, води та фенолу [14]. Проростання пилку та середню довжину пилкових трубок визначали у виборці з двохсот довільно відібраних пилкових зерен. При цьому довірчі інтервали встановлювали в межах $\pm 1,96$ стандартної похибки (SE), керуючись двобічною кривою нормального розподілу даних при $p = 0,95$.

Опромінення сухого пилку гамма-променями проводили при потужності дози 0,2 Гр / с. Для спостереження за поділом генеративної клітини в пилкових трубках використовували фіксацію та забарвлення ацетоорсеїном. Для цього до краплі пилкової суспензії додавали ідентичну за об'ємом краплю 2 %-вого розчину орсеїну в 45 %-вій оцтовій кислоті. Суміш накривали покривним скельцем та декілька разів прогрівали над полум'ям спиртівки, після чого краї препарату окантовували розплавленим парафіном [14].

Статистичні відмінності для різних доз опромінення визначали за допомогою дисперсійного аналізу «ANOVA» та непарного критерія Ст'юдента з поправкою Бонфероні при $p < 0,05$ [15].

Дослідження та їх обговорення. Пилкок тютюну духмяного відноситься до типу двоклітинного пилку, який за правилом складається з вегетативної та генеративної клітини, причому генеративна міститься безпосередньо у цитоплазмі вегетативної клітини. Кожне пилкове зерно має три аперттури, або пори, через одну з яких відбувається утворення та ріст пилкової трубки. Ознакою утворення пилкової трубки є втрата міжапертурної ідентичності та поява домінантної пори з вираженою елонгацією інтини, що за своєю довжиною перевищує діаметр пилкового зерна. У двоклітинного пилку поділ генеративної клітини відбувається в пилковій трубці, при цьому ядро вегетативної клітини теж переміщується у пилкову трубку і повільно просувається там в напрямку її кінчика без здійснення мітотичного поділу. Через це, поява у пророслого пилку трьох ядер має свідчити про здійснення мітотичного поділу генеративної клітини та утворення сперміїв.

Проведеними дослідженнями було встановлено, що поступове підвищення дози опромінення пилку тютюну духмяного з 50 Гр до 100 Гр спричиняє пригнічення утворення сперміїв у 93 % пилкових зерен (табл. 1). Крім того, з'ясовано, що при дозах вище 200 Гр спермії взагалі не утворювались (рис. 1, крива С), що вказує на неспроможність такого пилку до здійснення подвійного запліднення ембріонального мішка за браком активних сперміїв.

Таблиця 1. Аналіз ростових та запліднюючих властивостей пилку тютюну духмяного

Доза опромінення, Гр	Проростання пилку, %	Довжина пилкових трубок, мкм	Пилкові зерна з двома сперміями, %	Швидкість росту пилкових трубок, мкм/год
0	81 $\pm$ 12	737 $\pm$ 165	100	38 $\pm$ 7
50	80 $\pm$ 13	712 $\pm$ 173	82	35 $\pm$ 6

100	75 ± 12	698 ± 154	7	32 ± 6
300	62 ± 10	630 ± 142	1	25 ± 5
1000	34 ± 7	475 ± 130	0	14 ± 6
1500	7 ± 3	120 ± 17	0	6 ± 2
2000	2 ± 1	15 ± 6	0	1 ± 1

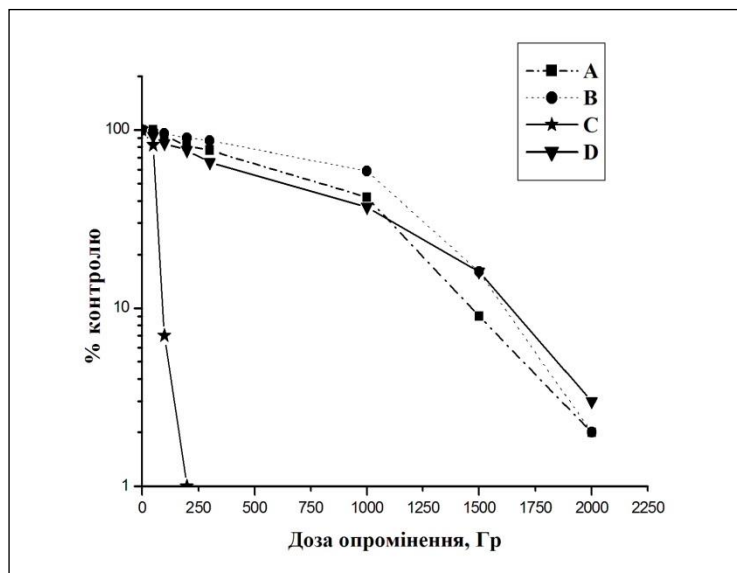
В той же час не виключається здатність такого пилку до гіногенезу та утворення партеногенетичних гаплоїдів, оскільки реститутивне генеративне ядро може приймати безпосередню участь у здійсненні потрійного запліднення центрального ядра та утворенні ендосперму. На користь такої думки також вказують дані щодо уповільнення швидкості росту пилкових трубок. Так, при дозі в 300 Гр середня швидкість росту пилкових трубок *in vitro* зменшувалась в 1,5 рази, при дозі в 1000 Гр – в 2,7 рази, а при дозі в 1500 Гр – в 6,3 рази порівняно з контролем. Дозова крива залежності швидкості росту пилкових трубок на поживному середовищі від дози опромінення пилку наводиться на рисунку 1 (крива D).

Відомо, що повільне просування пилкових трубок в маточці за умов перебігу протамної фази запліднення є важливою передумовою для електрофізіологічної стимуляції насінних зачатків та підготовки їх до нестатевого розвитку шляхом апоміксиса [16].

Суттєвою ознакою дозових кривих проростання пилку та росту пилкових трубок є наявність плеча (рис. 1, криві А, В), що вказує на перебіг процесів пострадіаційного відновлення в пилкових зернах, котрі пов'язані з синтезом елементів інтини, клітинної стінки та каллози.

На відміну дозова крива, що описує залежність мітотичного поділу генеративної клітини від дози опромінення пилку плеча не має (рис. 1, крива С). А це, в свою чергу, може непрямым чином вказувати на відсутність позапланового синтезу ДНК та її репарації в пилкових ядрах. Підтвердженням такої гіпотези є залежність репарації ядерної ДНК в пилку від пострадіаційного зволоження опроміненого пилку [17], которого в наших дослідках проведено не було.

В дослідках також було показано, що проростання опроміненого пилку зберігається ще при дозі в 2000 Гр, хоча і знаходиться на дуже низькому рівні (1 – 3 %). Крім того, з'ясовано, що середня довжина пилкових трубок з ростом дози опромінення пилку повільно зменшується в діапазоні до 1000 Гр, досягаючи при цій дозі величини в 1,5 рази менше контрольної. Після цього процес значно прискорюється, тому при дозі в 2000 Гр середня довжина пилкових трубок вже становила лише 3 % від тієї величини, що спостерігалась при 1000 Гр. (див. табл. 1, рис. 1).



Примітка: А – проростання пилку; В – довжина пилкової трубки; С – поділ генеративної клітини; D – швидкість росту пилкових трубок

Рис. 1. Залежність проростання пилку, поділу генеративної клітини та швидкості росту пилкових трубок від доз зовнішнього опромінення пилку тютюну духмяного гамма-променями ^{60}Co

Висновки і перспективи. Проведені дослідження встановили, що опромінення сухого пилку тютюну духмяного гамма-променями ^{60}Co призводить до пригнічення проростання та росту пилкових трубок при дозах опромінення вище 300 Гр, що також супроводжується помітним уповільненням швидкості росту пилкових трубок. Аналіз дозових кривих встановив наявність пострадіаційного відновлення в пилкових зернах, що був пов'язаний з процесами синтезу полісахаридного матриксу та клітинної мембрани, а не з репарацією генетичного матеріалу пилку.

Уповільнення росту пилкових трубок, відсутність утворення спермій та зменшення середньої довжини пилкових трубок є важливою передумовою адаптації та підготовки рослини до здійснення апоміксиса замість амфіміксиса.

Перспективою подальших досліджень є вивчення особливостей росту пилкових трубок гамма-опроміненого пилку *in vivo* в міжвидових та внутрішньовидових тест системах запилення, а також за умов застосування різних режимів опромінення та пострадіаційної обробки пилку.

References

1. Kundu, M., Dubey, A., Srivastav, M., Malik S. (2017). Induction of haploid plants in citrus through gamma-irradiated pollen and ascertainment of ovule age for maximum recovery of haploid plantlets. *Turkish Journal of Biology*, 41, 469–483. doi:10.3906/biy-1606-28.
2. Musial, K., Przywara, L. (1998). Influence of irradiated pollen on embryo and endosperm development in kiwifruit. *Annals of Botany*, 82, 747–756. doi:10.1006/anbo.1998.0747.
3. Chalak, L., Legave, J. M. (1997). Effects of pollination by irradiated pollen in Hayward kiwifruit and spontaneous doubling of induced parthenogenetic trihaploids. *Scientia Horticulturae*, 68, 83–93. doi:10.1016/S0304-4238(96)00976-4.
4. Taskin, H., Yucel, N. K., Baktemur, G., Comlekcioglu, S., Buyukalaca S. (2013). Effects of different genotypes and gamma ray doses on haploidization with

irradiated pollen technique in watermelon (*Citrullus lanatus* L.). Canadian journal Plant Science, 93, 1165–1168. doi:10.4141/CJPS2013-059.

5. Kurtar, E. S. Sari, N., Abak K. (2002). Obtention of haploid embryos and plants through irradiated pollen technique in squash (*Cucurbita pepo* L.). Euphytica, 127(3), 335–344. doi: 10.1023/A:1020343900419.

6. Kurtar, E. S. Balkaya, A., Ozbakir, M., Ofluoglu T. (2009). Induction of haploid embryo and plant regeneration via irradiated pollen technique in pumpkin (*Cucurbita moschata* Duchesne ex. Poir). African Journal of Biotechnology, 8 (21), 5944–5951. doi:10.5897/AJB09.730.

7. Lotfi, M. Alan, A. R., Henning, M. J., Jahn, M. M., Earle E. D. (2003). Production of haploid and doubled haploid plants of melon (*Cucumis melo* L) for use in breeding for multiple virus resistance. Plant Cell Reproduction, 21, 1121–1128. doi:10.1007/s00299-003-0636-3.

8. Keller, J. (1990). Culture of unpollinated ovules, ovaries, and flower buds in some species of the genus *Allium* and haploid induction via gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.). Euphytica, 47(3), 241–247. doi: 10.1007/BF00024247.

9. Blasko, M. Badenes, M. L., Naval, M. M. (2016). Induced parthenogenesis by gamma-irradiated pollen in loquat for haploid production. Breeding Science, 66, 606–612. doi: 10.1270/jsbbs.16021.

10. Peixe, A. Campos, M. D., Cavaleiro, C., Barroso, M., Pais S. (2000). Gamma-irradiated pollen induces the formation of 2n endosperm and abnormal embryo development in European plum (*Prunus domestica* L., cv. “Rainha Cláudia Verde”). Scientia Horticulturae, 86, 267–278. doi: 10.1016/S0304-4238(00)00156-4.

11. Murti, R. H., Kim, H. Ye., Yeoung, Yo. Rog. (2013). Effectiveness of gamma ray irradiation and ethyl methane sulphonate on in vitro mutagenesis of strawberry. African Journal of Biotechnology, 12(30), 4803–4812. doi: 10.5897/AJB12.1386.

12. Pandey, K. K. (1986). “Egg-transformation” induced by irradiated pollen in *Nicotiana*: critical appraisal of Chyi and Sanford's observations. Theoretical and Applied Genetics, 72, 739–742. doi:10.1007/BF00266538.

13. Andreychenko, S. V., Grodzinskiy, D. M. (1983). Opyljajushhaja sposobnost' i rostovye svoystva pyl'cevyh zeren posle gamma-oblucheniya [Pollinating ability and growth properties of pollen grains after gamma irradiation]. Fiziologiya i biohimiya kul'tury rastenij, 15(2), 148–152. (in Russian).

14. Pausheva, Z. P. (1980). Praktikum po citologii rastenij [Practice of plant cytology]. 3-rd ed. Moscow: Kolos, 304. (in Russian).

15. Gljants, S. (1999). Mediko-biologicheskaja statistika [Biomedical statistics]. Moscow: Praktika, 460. (in Russian).

16. Hojsgaard, D. H., Martinez, E. J., Quarin, C. L. (2013). Competition between meiotic and apomictic pathways during ovule and seed development results in clonality. New Phytologist, 197, 336–347.

17. Grodzinskiy, D. M., Andreychenko, S. V. (1983). Vneplanovyy sintez DNK v pyl'cevyh zernah petunii gibridnoj posle gamma-oblucheniya [Unscheduled DNA synthesis in pollen grains of hybrid petunia after gamma irradiation]. Doklady AN USSR. Ser. B, 9, 60–62. (in Russian).

АНАЛИЗ РОСТОВЫХ И ОПЛОДОТВОРЯЮЩИХ СВОЙСТВ ГАММА-ОБЛУЧЕННОЙ ПЫЛЬЦИ ТАБАКА ДУШИСТОГО

Л. В. Грубская, И. Н. Гудков, А. В. Клепко, С. В. Андрейченко

Аннотация. Гамма-облученная пыльца очень часто используется как инструмент генетического реконструирования растительной

клетки. По этой причине возникает потребность в проведении углубленных научных исследований для создания базовой радиобиологической теории, способной объяснить открытые явления. Целью работы было изучение действия гамма-радиации в разных дозах на прорастание пыльцы табака душистого (*Nicotiana glauca*) *in vitro*, ростовые свойства пыльцевых трубок и митотическое деление генеративной клетки на спермии. Предварительно высушенную пыльцу облучали гамма-лучами ^{60}Co в дозах 50 -3000 Гр, а потом проращивали на стерильной водопроводной воде с добавлением 10 % сахара и 0,01 % борной кислоты. Прорастание и длину пыльцевых трубок определяли с помощью окуляр-микрометра под микроскопом «МБИ-3» на увеличении $\times 150$. Ядра пыльцы окрашивали 2 %-ным раствором ацетоорсеина. Проведенные исследования показали, что гамма-радиация постепенно угнетает прорастание и рост пыльцевых трубок, а также полностью их подавляет при дозах выше 2000 Гр. В то же время деление генеративной клетки на спермии совсем прекращается уже при дозе в 300 Гр и выше. Одновременно отмечено дозозависимое замедление скорости роста пыльцевых трубок. Совокупность выявленных радиационных изменений в пыльце, как нам кажется, должна способствовать реализации гиногенеза и апомиксиса.

Ключевые слова: пыльца, *Nicotiana glauca*, пыльцевые трубки, гиногенез, апомиксис, гамма-облучение.

ANALYSIS OF GROWING AND FERTILIZING PROPERTIES OF NICOTIANA GLAUCA GAMMA-IRRADIATED POLLEN

L. V. Grubska, I. M. Gudkov, A. V. Klepko, S. V. Andreychenko

Abstract. Gamma-irradiated pollen is very often used as a tool for genetic reconstruction of plant cell. In view of this the necessity of pursuing detailed research in order to develop a basic radiobiologic theory for the explanation of discovered phenomena has emerged. The present research aimed at studying gamma-irradiation effects of different doses on germination of tobacco (*Nicotiana glauca*) pollen on artificial feeding medium, growth properties of pollen tubes and mitotic division of generative cell on sperms. The dry tobacco pollen was gamma-irradiated in the dose range 50 – 3000 Gy and then germinated in the solution of 10 % sucrose and 0,01 % boric acid in sterile tap water. Germination and the length of pollen- tubes was determined by the aid of ocular-micrometer under the light microscope “MBU - 3” at the magnification $\times 150$. The pollen nuclei were stained with 2% acetoorsein. Gamma-radiation was shown to gradually suppress germination and pollen tube growth, the doses higher than 2000 Gy being critical for said events. Meanwhile the generative cell division on sperms completely ceased at the dose 300 Gy and higher ones. Simultaneously the dose-dependent slowing of pollen tube grown speed was established. The multiplicity of physiological changes which emerged in pollen after gamma-irradiation, to our opinion, was in favour of gynogenesis and apomixis occurrence.

Keywords: pollen, *Nicotiana glauca*, pollen-tube germination, apomixes, gynogenesis, radiation

**ПАТОМОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ У ЛІМФОЇДНІЙ ТКАНИНІ БУРСИ
ФАБРІЦІУСА КУРЕЙ, ВИКЛИКАНІ РІЗНИМИ ВАКЦИННИМИ
ТА ПОЛЬОВИМИ ШТАМАМИ ВІРУСУ ХВОРОБИ ГАМБОРО
ВИЯВЛЕНИМИ В УКРАЇНІ**

А.С. ПАСТИРЯ, аспірант кафедри вірусології,
*Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
ННЦ «Інститут біології та медицини»,*
О.А. ІВАЩЕНКО, кандидат біологічних наук,
*Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
ННЦ «Інститут біології та медицини»,*
О.О. НЕЧИПУРЕНКО, кандидат біологічних наук,
*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного
НАН України,*
І.Г. БУДЗАНІВСЬКА, доктор біологічних наук, професор,
*Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
ННЦ «Інститут біології та медицини»,*
В.П. ПОЛІЩУК, доктор біологічних наук, професор,
*Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
ННЦ «Інститут біології та медицини»*
E-mail: ann.pastyria@gmail.com

Анотація. Вірус інфекційної бурсальної хвороби був вперше виявлений у провінції Гамборо США у 1962 році і з того моменту широко розповсюдився в усьому світі. Хвороба Гамборо відрізняється тяжкою імуносупресією в уражених птахів, та часто, смертністю. З 1986 року у центральній Європі з'явилися високовірулентні штами вірусу, що призводили до 70% смертності птиці. Вакцинація стала основним методом захисту від захворювання. Важливо диференціювати постінфекційний та поставкцинальний вплив вірусу на бурсу фабріціуса птахів для контролю процесу вакцинації. Тому метою роботи було виявлення впливу різних вакцинних та високовірулентних штамів вірусу на бурсу Фабріціуса курей. Для цього здійснювали гістологічне дослідження бурс вакцинованих та інфікованих птахів. Зразки відбирали із різних птахофабрик України. У результаті проведеної роботи було встановлено залежність ступеню виснаження клоакальної сумки від залишкової вірулентності вакцинних штамів а також показано тяжке виснаження бурси (до 100% лізису лімфоцитів) при інфікуванні високовірулентними штамами вірусу. Результати роботи можуть бути в подальшому використані для аналізу поствакцинальної реакції у курей під час проведення профілактичних заходів у місцях промислового вирощування птиці.

Ключові слова: вірус ІБХ, гістологічний аналіз, вакцинні штами ІБХ, високовірулентні штами ІБХ

Актуальність (Introduction). Починаючи із 1980-тих років високовірулентні штами вірусу хвороби Гамборо поширилися у центральній Європі. У 1990-тих роках ці штами було вже описано у Японії, Росії, країнах Близького Сходу, Азії, Південної Америки та Африки. Починаючи з 2000-го років у США з'явилися повідомлення про спалахи інфекції, викликані високовірулентними штамами вірусу. Окрім того випадки захворювання, викликаного вищезгаданими штамами вірусу ІБХ були зафіксовані в Україні [1].

Зважаючи на поширення високовірулентних штамів вірусу інфекційної бурсальної хвороби у світі, в тому числі й в Україні, для захисту птиці почали застосовувати масштабне вакцинування, насамперед, живими атенуйованими вакцинами. Здебільшого такі вакцини створюють застосовуючи штами із високим рівнем залишкової вірулентності [2]. Тим не менш масові вакцинації призвели до деяких негативних наслідків. Так вищезгадані вакцинні штами, розмножуючись у тканинах бурси призводили до значного виснаження фолікулів, по аналогії з високовірулентними вірусами [3]. Вплив українських ізолятів вірусу на бурсу Фабріціуса до сьогодні лишається невстановленим. Внаслідок цього постала необхідність диференціювання вакцинних та польових штамів вірусу, що були виділені у курей із птахофабрик України.

Аналіз останніх досліджень та публікацій (Analysis of recent researches and publications). Відомо, що вакцинні штами вірусу ІБХ реплікуються в лімфоїдних органах інфікованої птиці, насамперед у бурсі, викликаючи її ураження та часткову атрофію. Для захисту від захворювання використовують вакцини, що відповідно до рівня антитіл материнського походження який здатні долати поділяються на м'які, середні та середні-плюс. М'які вакцини є найменш ефективними у присутності високого рівня антитіл материнського походження. Середні та середні-плюс вакцини здатні забезпечувати кращий захист від вірулентних штамів вірусу. Середні-плюс штами вакцинні штами найбільшою мірою пошкоджують бурсу та зумовлюють імуносупресію у курчат. Такі вакцини використовують для захисту птиці від польових високовірулентних штамів вірусу [2,4]. Для диференціювання різних штамів вірусу використовують різноманітні методи, серед яких молекулярно-генетичні (ПЛР, рестрикційний аналіз, секвенування), імуноферментний аналіз та гістологічні дослідження. Останні можуть бути корисними для встановлення поствакцинальних реакцій у курей та оцінки ефективності вакцинації в господарствах. Зважаючи на велику різноманітність вакцин та широке розповсюдження польових штамів вірусу ІБХ важливою є діагностика впливу різних штамів на ключовий орган-мішень вірусу - сумку Фабріціуса [1,5]

Мета (Purpose) – виявлення впливу різних вакцинних та високовірулентних штамів вірусу виявлених в Україні на бурсу Фабріціуса курей методом гістологічного аналізу.

Методи (Methods). У роботі були досліджені птахи із 16 господарств, 10 областей України, а саме Київської, Черкаської, Львівської, Вінницької, Волинської, Дніпропетровської, Луганської, Тернопільської, Харківської та АР Крим. В господарствах використовували вакцини різних виробників,

таких як «Полімун-ІБХ МВ/5», «Полімун-ІБХ-плюс МВ/3», «Полімун-ІБХ-лайт МВ/20» (Україна), «Хіпрагамборо-GM97» (Іспанія), «Нобіліс Гамборо 228Е» (Нідерланди). Аналіз морфолого-патологічного стану птахів, взятих для дослідження, проводили з метою виявлення і опису зовнішніх ознак захворювання. Для цього проводили розтин трупів птахів, аналіз, фіксування та фотографування патологічних змін органів та систем органів курей. За виявлення таких проявів як виснаження, набряклість та гіперемованість бурси, наявність желеподібного трансудату, крововиливів на клоакальній сумці (рис. 1) та, інколи, у м'язах, збільшенні розмірів нирок та селезінки проводили відбір патологічного матеріалу для подальших гістологічних досліджень. Для гістологічного дослідження відбирали зразки бурс без ознак автолізу, що не підлягали замороженню. Органи з видимими патологічними змінами тканин відбирали на межі з нормальними частинами, щоб були захоплені здорові і змінені ділянки. Розмір зразків бурс становив 2-4 см. Відібрані зразки одразу переносили у контейнери з 10 % розчином формаліну.

Відібрані зразки тканин бурс фіксували у 10 % розчині формаліну та витримували у мікрохвильовій печі упродовж 40 секунд за потужності 400 Вт із водним навантаженням 400 мл. Після фіксації проводили первинне зневоднення тканин, занурюючи зразки у 96 % розчин етанолу, та витримували у мікрохвильовій печі протягом 10 хв за потужності 100 Вт. Після цього зразки нарізали гістологічним лезом (товщина зрізу становила 3 – 4 мм, ширина та довжина не більше 1,5 см) та поміщали у пластикові касети Turboflowe. Після фіксації здійснювали проведення досліджуваних зразків із використанням автоматизованої станції Microm STP-120. Тривалість обробки тканин та реактиви, які використовували для її проведення, наведено у таблиці 2.4. [6,7]



Рис. 1. Зображення бурси Фабріціуса: А – нормальний стан органу, Б – орган за ураження вірусом інфекційної бурсальної хвороби.

Після зневоднення та парафінізації зразків тканин, останні заливали рідким парафіном і переносили на кріоконсоль на 30 - 40 хвилин для застигання парафіну. На наступному етапі виготовляли мікротонкі зрізи патологічного матеріалу залитого у парафін. Попередню прирізку виконували встановлюючи «крок» мікротому 50 мкм, а для виготовлення зразків тканин органів – 5 мкм, кут нахилу предметного столика 10°. Готові зрізи переносили безпосередньо на предметні скельця [6,7].

1. Характеристика і тривалість етапів попередньої обробки зразків бурс у автоматизованій станції STP-120

Етапи занурення патматеріалу у	Характеристика етапу	Тривалість етапу, години
1	50 % етанол	2
2	70 % етанол	2
3	96 % етанол	3
4	96 % етанол	3
5	ксилол	3
6	кслиол	2
7	рідкий парафін	2

Гістологічні зрізи висушували упродовж 3 – 4 годин за температури + 42 °С, після чого фарбували розчинами еозину та гематоксиліну. Для цього зрізи послідовно занурювали на 5 хвилин у розчини ксилолу (99,85 %), етанолу (96 %), етанолу (70 %) та дистильовану воду, а потім фарбували розчином гематоксиліну. Після витримування у розчині барвника упродовж 1 хв препарати відмивали протягом 3 хв у воді й дофарбовували розчином еозину та знову відмивали барвник водою протягом 3 хв. Потім зрізи витримували протягом 3 хв у етанолі 70 і 96 % та ксилолі. Після висушування отримані препарати заключали у Mounting Medium Glue.

Мікроскопію зразків здійснювали із застосуванням світлового мікроскопу Ахіоскор 2 plus за збільшення у 100, 200 та 400 разів. Зразки фотографували за чотирьохсоткратного оптичного збільшення. Одержані цифрові фотографії маркували, аналізували і описували виявлені гістологічні зміни.

Результати (Results). Для встановлення характерних паталого-морфологічних змін в бурсі здійснювали мікроскопію отриманих зразків та визначали ступінь виснаження фолікул клоакальної сумки птахів.

Ступінь виснаження фолікул бурс птиці, інфікованої високовірулентними штамами вірусу хвороби Гамборо варіював від 90 до 100 % (рис. 2). Окрім виснаження фолікул бурси, у всіх зразках також виявляли множинні крововиливи у міжфолікулярній стромі та точкові крововиливи у фолікулах фабріцієвої сумки. Також було виявлено лімфоцитарні інфільтрати у міжфолікулярній стромі.

За 100% виснаження фолікул бурс спостерігали повну відсутність В-лімфоцитів у фолікулах клоакальної сумки (рис. 2).

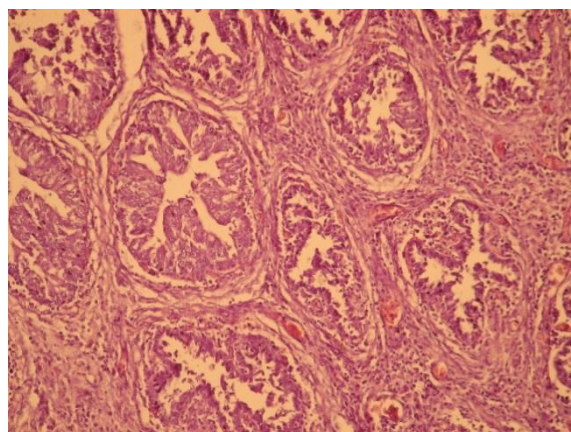
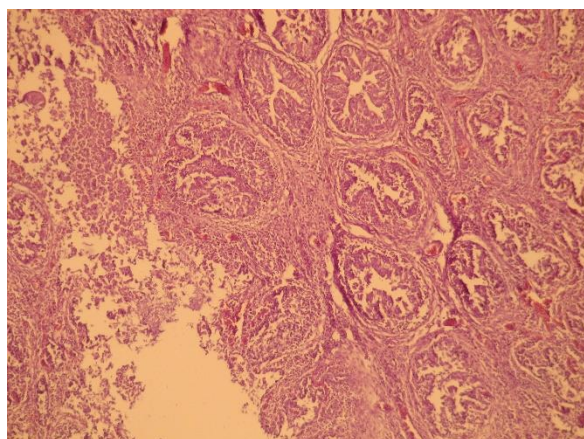


Рис. 2. Виснаження фолікул бурс птахів на 100%, викликані польовими штамами вірусу, крововиливи та інфільтрати у міжфолікулярній стромі (А – збільшення в 100 разів, В – збільшенн в 400 разів).

Результати проведених нами гістологічних досліджень збігаються із даними інших авторів [4]. При дослідженні різних штамів вірусу хвороби Гамборо, поширених у США, авторами було показано, що за інфікування високовірулентними штамами характерним є значне (до 100 %) виснаження фолікулів бурс птахів та характерні крововиливи у міжфолікулярній стромі. [4]

З метою визначення патологічних змін, викликаних у тканинах бурси за інфікування високовірулентними штамами вірусу ІБХ, було проаналізовано характерні зміни, викликані вакцинними штамами.

При вакцинуванні птахів за допомогою вакцин на основі м'яких штамів, таких як GM97, 228E та MB/20 спостерігали ступінь виснаження фолікул бурс, що складав 40 – 50 % (рис. 3). Слід наголосити, що в фолікулах та міжфолікулярній стромі бурс ми не виявили крововиливів та лімфоцитарних інфільтратів, на відміну від бурс птиці, інфікованої високовірулентними штамами. Подібні результати були отримані Murmi та співавторами [8] при дослідженні впливу штаму GM97 на тканини бурси вакцинованих курей.

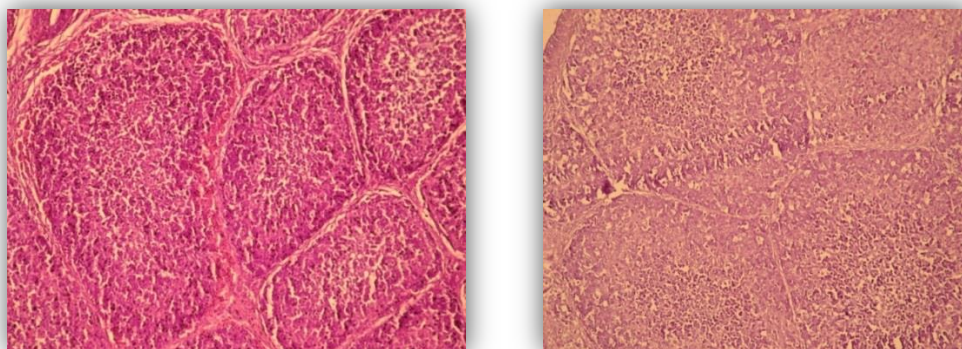


Рис. 3. Вплив м'яких (А) та середніх (Б) вакцинних штамів вірусу ІБХ на фолікули бурси (виснаження 40 %): збільшення у 400 разів.

На відміну від м'яких штамів, для середніх вакцинних штамів (V877, MB/5) було показано вищий ступінь виснаження фолікул бурс, який становив від 60 до 70 % (рис. 3). У міжфолікулярній стромі бурс також не було виявлено лімфоцитарних інфільтратів, на відміну від бурс птиці, інфікованої високовірулентним штамом.

Середні плюс вакцинні штами (MB та MB/3) спричиняють найтяжче серед вакцинних штамів виснаження бурси. Рівень виснаження при цьому складає 80 %, а інколи досягає 90 % (рис. 4). Втім відмінністю від високовірулентних штамів залишалась відсутність крововиливів у фолікулах та інфільтратів лімфоцитів у міжфолікулярній простір.

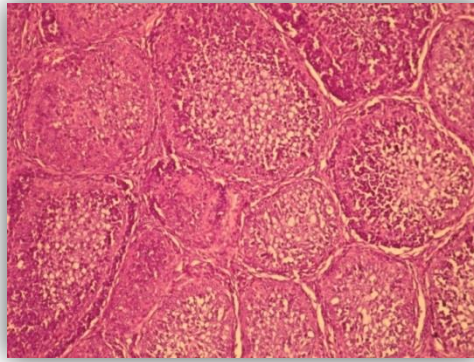


Рис. 4. Вплив середніх-плюс вакцинних штамів вірусу ІБХ на фолікули бурси (виснаження бурси 90 %): збільшення у 400 разів.

Висновки і перспективи (Discussion). Таким чином у результаті гістологічного дослідження було показано, що вакцинні штамі із різним рівнем залишкової вірулентності викликали відмінні ступені виснаження бурси птахів. Так для м'яких штамів виснаження становить 40 – 50 %, середніх – 60 – 70 %, а для середніх плюс воно складає 80 – 90 %. Було також показано, що польові високовірулентні штами, виявлені в Україні, подібно до штамів охарактеризованих в інших країнах, можуть спричинювати значне виснаження бурс, рівень якого становив від 90 до 100 %. Окрім того на відміну від усіх вакцинних штамів, за інфікування високовірулентними вірусами спостерігали значні крововиливи у фолікулах та міжфолікулярному просторі, а також лімфоцитарні інфільтрати у міжфолікулярному просторі. Таки чином згадані зміни були специфічними для ураження польовими високовірулентними штамами вірусу хвороби Гамборо. Отримані нами результати можуть бути використані для аналізу посвакцинальної реакції при проведенні профілактичних заходів на птахофабриках та диференціювання впливу вакцинних та польових штамів вірусу ІБХ.

References

- 1.Berg, T. P. (2000). Acute infectious bursal disease in poultry: a review. *Avian Pathology*, 29 (1),175–194.
- 2.Muller, H., Mundt, E., Eterradossi, N. and Islam, M.R. (2012). Current status of vaccines against infectious bursal disease. *Avian Pathol.*, 41(1), 133–139.
- 3.Igwe, A.O., Nwachukwu, O.J., Chinyere C.N., Shittu, I. (2017). Evaluation of pathological changes of natural infectious bursal disease virus infection in the lymphoid organs of Black Harco pullets. *Sokoto Journal of Veterinary Sciences*, 15 (2), 18–28.
- 4.Jackwood, D.J., Saif, Y.M., Moorhead, P.D. (1985). Immunogenicity and antigenicity of infectious bursal disease virus serotypes I and II in chickens. *Avian Dis.* 29 (4), 1184–1194.
- 5.Singh, J., Banga H. S., Brar, R. S., Singh, N. D., Sodhi, S., Leishangthem, G. D. (2015). Histopathological and immunohistochemical diagnosis of infectious bursal disease in poultry birds. *Veterinary World*, 8 (11), 1331–1339.
- 6.Goralskii, L.P., Homych, V.T., Kononskii, O.I. (2005). Osnovi gistologichnoi tehniki u normi ta pry patologii [Fundamentals of histological technique in norm and at pathology]. *Zhitomyr. Polissia*, 288.

7.Silva, M.S., Rissi, D.R., Swayne, D.E. (2016). Very virulent infectious bursal disease virus produces more severe disease and lesions in specific – pathogen free (SPF) leghorns than in SPF broiler chickens. Avian Diseases, 60 (1), 63–66.

8.Murmu, R., Islam, M.N., Most Juli, S.B., Khan, M.A.S., Harun-ur-Rashid, S.M., Hossain, F.M.A. and Rahman, M.M. (2014). Pathogenicity and immunosuppressive properties of GM-97 strain of infectious bursal disease virus in commercial broiler chickens J. Adv. Vet. Anim. Res., 1(1), 1–7.

ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ЛИМФОИДНОЙ ТКАНИ БУРСЫ ФАБРИЦИУСА, ВЫЗВАННЫЕ РАЗНЫМИ ВАКЦИННЫМИ И ПОЛЕВЫМИ ШТАММАМИ ВИРУСА БОЛЕЗНИ ГАМБОРО, ВЫЯВЛЕННЫМИ В УКРАИНЕ

**А. С. Пастыря О. А. Иващенко, А. А. Нечипуренко, И. Г. Будзанивская, В.
П. Полищук**

Аннотация. Вирус инфекционной бурсальной болезни был впервые обнаружен в провинции Гамборо США в 1962 году и с того момента широко распространился по всему миру. Болезнь Гамборо отличается тяжелой иммуносупрессией в пораженных птиц, и часто, смертностью. С 1986 года в центральной Европе появились высоковирулентные штаммы вируса, которые приводили к 70% смертности птицы. Вакцинация стала основным методом защиты от заболевания. Важно дифференцировать постинфекционное и поствакцинальное влияние вируса на бурсу Фабрициуса птиц для контроля процесса вакцинации. Поэтому целью работы было определение влияния различных вакцинных и высоковирулентными штаммов вируса на бурсу Фабрициуса кур. Для этого осуществляли гистологическое исследование бурс вакцинированных и инфицированных птиц. Образцы отбирали из разных птицефабрик Украины. В результате проведенной работы была установлена зависимость степени истощения клоакальной сумки от остаточной вирулентности вакцинных штаммов, а также показано тяжелое истощение бursы (до 100% лизиса лимфоцитов) при инфицировании высоковирулентными штаммами вируса. Результаты работы могут быть в дальнейшем использованы для анализа поствакцинальной реакции у кур при проведении профилактических мероприятий в местах промышленного выращивания птицы.

Ключевые слова: вирус ИББ, гистологический анализ, вакцинные штаммы ИББ, высоковирулентные штаммы ИББ.

PATHOMORPHOLOGICAL CHANGES IN LYMPHOID TISSUE OF BURSA FABTICIUS CAUSED BY DIFFERENT VACCINE AND FIELD STRAINS OF GUMBORO DISEASE VIRUS DETECTED IN UKRAINE

**A. P. Pastyria, O. A. Ivashchenko, O. O. Nechypurenko,
I. G. Budzanivska, V. P. Polischuk**

Abstract. The infectious bursal disease virus was detected in the Gumboro province of the United States in 1962 and since then has become

widespread throughout the world. Gumboro disease is characterized by severe immunosuppression in affected birds, and often mortality. Since 1986, very virulent strains of IBDV appeared in central Europe, and caused up to 70% mortality of chickens. Vaccination became the main method of protection against the disease. It is important to differentiate the post-infectious and post-vaccination effects of the virus on the bursa of the Fabricius of birds to control the vaccination process. Therefore, the aim of the study was to detect the effects of various vaccine and very virulent IBDV strains on the bursa of Fabricius of chickens. For this purpose, histological examination of bursas of vaccinated and infected birds was carried out. Samples were taken from different poultry farms in Ukraine. In results of the study we observed positive correlation between degree of depletion of the cloacal bursa and the residual virulence of the vaccine strains. Also, we detected very severe (up to 100%) depletion of bursa follicles caused by very virulent strains. The results of the work can be further used for the analysis of the post-vaccination reaction in chickens during preventive measures in places of industrial bird production.

Key words: IBDV, histological analysis, vaccine strains of IBDV, very virulent strains of IBDV.

ВПЛИВ НЕСАНКЦІОНОВАНИХ СМІТТЄЗВАЛИЩ НА СТАН ҐРУНТОВОГО ПОКРИВУ

О. І. НАУМОВСЬКА, кандидат сільськогосподарських наук
*Національний університет біоресурсів і природокористування
України*

Л. П. МОЛДАВАН, заступник завідувача лабораторії
«Екологічної безпеки земель, якості продукції та довкілля»

ДУ «Інститут охорони ґрунтів України»

E-mail: o_naum@i.ua

Анотація. Досліджено рівень антропогенного впливу продуктів розкладу несанкціонованого сміттєзвалища твердих побутових відходів за вмістом рухомих форм важких металів в ґрунті прилеглих територій. Встановлено, що значно збільшилися параметри сміттєзвалища в порівнянні з попередніми роками дослідження. Відмічається тенденція до збільшення частки пластикових відходів та складі в морфологічному складі ТПВ. Результати, отримані під час першого та другого періодів досліджень, порівняно з попередніми роками показують, що вміст важких металів не перевищує ГДК. Проте, прослідковується підвищення в декілька разів вмісту рухомих форм Pb, Cd, та Co в ґрунтах за останні три роки.

Ключові слова: ґрунтовий покрив, несанкціоновані сміттєзвалища, рівень антропогенного впливу, вміст рухомих форм важких металів

Актуальність. В залежності від різних джерел, ми спостерігаємо дані про рівень переробки твердих побутових відходів, що становить 3 – 8%. У той час як в країнах Європейського Союзу до 60% ТПВ підлягають переробці. Понад 90% відходів вивозиться на полігони та несанкціоновані сміттєзвалища. В результаті інвентаризації полігонів ТПВ, станом на 2018 рік в Україні налічується понад 6700 звалищ та полігонів, що функціонують, площею близько 10000 га. З них більше 15% полігонів були перевантажені, а 21% не відповідали санітарним вимогам. Також налічувалось 30000 несанкціонованих сміттєзвалищ, що охоплювали площу близько 2000 га [6].

Серед всіх твердих відходів побутове сміття складає 1 – 3 %, проте воно чим далі завдає все більшої шкоди, не дивлячись на таку відносно невелику кількість. Це відбувається внаслідок урізноманітнення його складу, збільшення кількості небезпечних хімічних речовин та предметів. Оскільки на сміттєзвалищах спостерігаються порушення заходів безпеки, це призводить до забруднення навколишнього природного середовища, порушення нормального функціонування екосистем. За відсутності роздільного збирання та утилізації відходів, які містять токсичні компоненти, збільшується ризик забруднення навколишнього середовища небезпечними

речовинами. З кожним роком полігони займають все більші площі, що потребує виводу земельних ділянок з господарського обліку, а це в свою чергу завдає шкоди сільському господарству. Ще однією вагомою проблемою є емісія звалищного газу.

Метою досліджень було дослідити вплив несанкціонованих сміттєзвалищ на рівень забруднення ґрунтового покриву (на прикладі сміттєзвалища поблизу с. Пшеничне, Васильківського району, Київської області) за вмістом рухомих форм важких металів протягом 2016-2018 років.

Матеріали і методики досліджень. На території земель сільськогосподарського призначення ВП НУБіП України «Агрономічна дослідна станція» Київської області стихійно утворилося несанкціоноване сміттєзвалище, яке розташоване вздовж ґрунтової польової дороги на окраїні населеного пункту с. Пшеничне, до якого з усіх сторін прилягають виробничі посіви сільськогосподарських культур.

Несанкціоноване сміттєзвалище знаходиться на відстані 10 м від лісосмуги та меліоративного струмка, норма відстані між якими не менше 50м та 10 – 15 м від сільськогосподарських ділянок за норми – 0,5 км [3]. За норму взято основні положення проектування полігонів твердих побутових відходів, оскільки сам факт існування несанкціонованого сміттєзвалища є порушенням екологічних нормативів. Відбір зразків ґрунту здійснювали по периметру утвореного несанкціонованого сміттєзвалища на відстані . Вміст рухомих форм важких металів здійснювали за методом атомно–абсорбційної спектроскопії.

Результати досліджень та їх обговорення. З метою зменшення негативного впливу на навколишнє середовище, які сприяли систематизації політики нашої держави в галузі поводження з ТПВ, було ухвалено наступні законодавчі та нормативно-правові акти:

1. Закон України «Про відходи» зі змінами і доповненнями та нещодавно затверджена Програма поводження з ТПВ спрямовані на розвиток технологій переробки й мінімізацію обсягів утворення відходів. Починаючи з 1 січня 2018 року даний закон забороняє викидати неперероблені відходи на полігони.

2. За новими правилами поводження з ТПВ, місцеві органи влади та громадяни мають сортувати відходи. У 2013 році були встановлені відповідні штрафи для присадибних господарств за недотримання цих правил [4] .

3. Кабінет Міністрів України ухвалив рішення про запровадження компенсаційного механізму для утилізації упаковки та відходів упаковки з визначеними цільовими показниками (35% на утилізацію упаковки, починаючи з 2011 року).

4. Полігони ТПВ негативно впливають на стан довкілля. З метою відшкодування витрат на відновлення стану навколишнього середовища введено екологічний податок (тобто почав застосовуватися принцип «забруднювач платить»).

5. Згідно Угоди про асоціацію між Україною та ЄС необхідно досягнути чинних у ЄС стандартів переробки відходів, які частково вже є обов'язковими для дотримання. Це вимагатиме таких кроків:

- забезпечення екологічно безпечного поводження з ТПВ (зокрема, дотримання вимог до полігонів для захоронення відходів);
- упровадження на практиці ієрархії поводження з ТПВ, відповідно до якої перевага надається запобіганню утворення ТПВ та їх переробці, а не спалюванню й утилізації відходів;
- поетапне досягнення цільових показників роздільного збирання відходів та переробки найважливіших фракцій, які підлягають повторному використанню;
- досягнення показників роздільного збирання відходів і переробки на рівні 60 та 50% від загального обсягу ТПВ відповідно – це одні з найважливіших цільових показників;
- забезпечення переробки упаковки та відходів упаковки на рівні 55% згідно з Директивою ЄС щодо пакувальних матеріалів № 94/62/ЄС та переробки будівельних відходів на рівні 70% згідно з Директивою №2008/98/ЄС.

На жаль, наведені заходи, не завжди повною мірою реалізуються на практиці. Щоб створити ефективну систему поводження з ТПВ, необхідно використовувати передовий міжнародний досвід, наприклад, тих європейських країн, які вже гармонізували свою нормативно–правову базу із законодавством ЄС та привели її у відповідність до застосовних директив.

У просторі досліджуване несанкціоноване сміттєзвалище розташоване вздовж ґрунтової дороги на окраїні села Пшеничне, поруч з яким знаходяться виробничі поля «Агрономічної дослідної станції», присадибні ділянки, озеро (рисунок 1.).

Станом на III декаду жовтня 2016 р. встановлено наступні розміри сміттєзвалища: ширина – 9 м, довжина – 135 м, висота – 1 м; об'єм – 1215 м³, які на III декаду 2018 року змінилися наступним чином: ширина – 10 м, довжина – 114 м, висота – 1,1 м; об'єм – 1254м³. В результаті морфологічного аналізу складу твердих побутових відходів відмічено збільшення частки пластику та скла, які мають тривалий період розкладу. Порівняно з показниками минулих досліджень у морфологічному складі найбільший відсоток складають скло і пластик, менше 10 % складають текстиль папір та органіка.



Рис. 1. Розміщення об'єкту дослідження в просторі відносно об'єктів навколишнього середовища

Порівнявши отримані результати першого та другого відбору з попередніми дослідженнями рівнів забруднення ґрунту прилеглих до несанкціонованого сміттєзвалища територій та на різних відстанях від нього встановлено, що за вмістом рухомих форм важких металів їх гранично-допустима концентрація не перевищує (табл. 1-3). Це свідчить про те, що ґрунтова екосистема здатна «переробити» ту кількість забруднюючих сполук, які надходять. Проте якщо не буде здійснено ніяких заходів щодо ліквідації джерел забруднення, то це може призвести до порушень в структурі комплексу ґрунтових мікроорганізмів, пригнічення їх біохімічної діяльності, інгібування активності цілого ряду ферментів.

Таблиця 1. Вміст рухомих форм Со у пробах ґрунту, мг/кг

Об'єкт	II дек. 2014 р.	III дек. 2016р.	III дек. 2018 р.
	Вміст Со, мг/кг		
Проба 1. АДС. (на відст 0 м від сміттєзвалища)	0,11	0,55	0,34
Проба 2. АДС. (на відст 6 м від сміттєзвалища)	0,16	0,44	0,32
Проба 3. АДС. (на відст 3 м від сміттєзвалища)	0,1	0,46	0,48
Проба 4. АДС. (на відст 9 м від сміттєзвалища)	0,11	0,53	0,35
Проба 5. АДС. (на відст 0 м від сміттєзвалища)	0,17	0,61	0,33
Проба 6. АДС. (на відст 6 м від сміттєзвалища)	0,37	0,72	0,44
ГДК	5	5	5

Таблиця 2. Вміст рухомих форм Сd у пробах ґрунту, мг/кг

Об'єкт	II дек. 2014 р.	III дек. 2016р.	III дек. 2018 р.
	Вміст Сd, мг/кг		
Проба 1. АДС. (на відст 0 м від сміттєзвалища)	0,04	0,16	0,17
Проба 2. АДС. (на відст 6 м від сміттєзвалища)	0,05	0,14	0,15
Проба 3. АДС. (на відст 3 м від сміттєзвалища)	0,04	0,16	0,16
Проба 4. АДС. (на відст 9 м від сміттєзвалища)	0,24	0,12	0,17
Проба 5. АДС. (на відст 0 м від сміттєзвалища)	0,02	0,2	0,18
Проба 6. АДС. (на відст 6 м від сміттєзвалища)	0,09	0,25	0,18
ГДК	0,7	0,7	0,7

Таблиця 3. Вміст рухомих форм Pb у пробах ґрунту, мг/кг

Об'єкт	II дек. 2014 р.	III дек. 2016р.	III дек. 2018 р.
	Вміст Pb, мг/кг		
Проба 1. АДС. (на відст 0 м від сміттєзвалища)	0,24	1,68	1,49
Проба 2. АДС. (на відст 6 м від сміттєзвалища)	0,55	1,29	1,83
Проба 3. АДС. (на відст 3 м від сміттєзвалища)	0,27	2,39	1,78
Проба 4. АДС. (на відст 9 м від сміттєзвалища)	1,48	1,01	0,75
Проба 5. АДС. (на відст 0 м від сміттєзвалища)	0,13	1,24	0,92
Проба 6. АДС. (на відст 6 м від сміттєзвалища)	0,75	2,84	0,69
ГДК	2	2	2

Висновки та перспективи:

Проаналізувавши морфологічний склад ТПВ на несанкціонованому сміттєзвалищі в селі Пшеничне, Васильківського району, Київської області, можна зробити висновок, що в порівнянні з попередніми роками прослідковується збільшення частки пластику та скла, а також поліетилену у зв'язку з тим, що більшість товарів в наш час мають упаковки саме з цих матеріалів. Також, в порівнянні з попередніми даними спостерігається збільшення розмірів несанкціонованого сміттєзвалища.

Згідно з отриманими результатами аналізу зразків ґрунту у зоні впливу несанкціонованого сміттєзвалища встановлено, що вміст важких металів у ґрунті не перевищує ГДК.

Разом з тим, для покращення становища поводження в селі Пшеничне, яке є типовим прикладом в галузі поводження з ТПВ сільської місцевості варто:

- Забезпечити облаштування та будівництво майданчиків для збору ТПВ на території земель досліджуваного населеного пункту;

- Забезпечити укладення договорів на вивіз ТПВ з жителями приватного сектору та з підприємствами, установами, організаціями, які знаходяться в районі селища;

- Розробити та забезпечити організацію виконання Програми еколого-просвітницької роботи на території сільської ради з метою виховання екологічної свідомості мешканців;

- Ліквідувати несанкціоноване сміттєзвалище передбачивши відповідні кошти з місцевого бюджету, або забезпечити виконання першої черги робіт по облаштуванню існуючого полігону ТПВ (пункт пропуску та обліку, проїзд, майданчик попереднього групування ТПВ за видами, часткове обвалування та огорожа);

- Забезпечити організацію та систематичне проведення рейдів із виявлення порушників Правил благоустрою дослідженого населеного пункту;

•Провести підготовчу роботу щодо пошуку фірм-партнерів із збирання та переробки вторинної сировини від ТПВ та вивчити можливість залучення позабюджетних коштів для подальшого впровадження роздільного збирання ТПВ;

•Розробити Програму благоустрою досліджуваного населеного пункту та передбачити кошти на виконання заходів щодо формування і провадження системи організації збирання та вивезення ТПВ.

References

1. Vidkhody vyrobnytstva i spozhyvannya ta yikh vplyv na grunty i pryrodni vody: Navchal'nyy posibnyk / Za red. V.K. Khil'chevs'koho. – K.: Vydavnycho-polihrafichnyy tsentr "Kyyivs'kyi universytet", 2007. – 152 s.
2. Myshustyn, E. N. Assotsyatsyy pochvennykh mykroorhanyzmov / E. N. Myshustyn. – M.: Nauka. – 1975.
3. Nazymko, V. V. Gruntoznavstvo. □Navchal'nyy posibnyk dlya studentiv ekolohichnykh spetsial'nostey□ / V. V. Nazymko, V. K. Kostenko, O. I. Nazymko, V. V. Kolesnikova. – Donets'k, 2008. – 197 s.
4. Khomych, V. A. Экологья городской среды: Ucheb. posobye dlya VUZov / A. V. Khomych. – Omsk: Yzd-vo SybADY, 2002. – 267s.
5. Kosarova, L. F. Экологическая безопасность khozyaystvennoy deyatel'nosti / L. F. Komarova y dr. Pod obshch. red. L. F. Komarovoy. // Alt. hos. tekhn. un-t ym. Y. Y. Polzunova. – Barnaul: Yzd-vo AltHTU, 2009. – 226 s.
6. Некоторые факты о мусоре. Elektronnyy resurs. – Rezhym dostupu: <http://climbinduk.org/node/256>.
7. Dreyer, A. A. Tverdue promushlennue y butovue otkhodu, ykh svoystva y pererabotka / Elektronnyy resurs / A. A. Dreyer, A. N. Sachkov, K. S. Nykol'skiy, Yu. Y. Marynyn, A. V. Myronov // – Rezhym dostupu: <http://www.ecoline.ru/mc/waste/solidw/index.html>.

ВЛИЯНИЕ НЕСАНКЦИОНИРОВАННЫХ СВАЛОК НА СОСТОЯНИЕ ПОЧВЕННОГО ПОКРОВА

Е. Наумовская, Л. Молдаван

Аннотация. *Исследован уровень антропогенного воздействия продуктов распада несанкционированной свалки твердых бытовых отходов по содержанию подвижных форм тяжелых металлов в почве прилегающих территорий. Установлено, что значительно увеличились параметры свалки по сравнению с предыдущими годами исследования. Отмечается тенденция к увеличению доли пластиковых отходов и составе в морфологическом составе ТБО. Результаты, полученные во время первого и второго периодов исследований по сравнению с предыдущими годами показывают, что содержание тяжелых металлов не превышает ПДК. Однако, прослеживается повышение в несколько раз содержания подвижных форм Pb, Cd, и Co в почвах за последние три года.*

Ключевые слова: *почвенный покров, несанкционированные свалки, уровень антропогенного воздействия, содержание подвижных форм тяжелых металлов*

INFLUENCE OF NONSANCED MASS-MEDIA ON THE SOIL CONDITION

O. Naumovska, I. Moldavan

Abstract. *The level of anthropogenic influence of decomposition products of unsanitary landfill of solid household wastes on the content of moving forms of heavy metals in the soil of adjacent territories is investigated. It has been established that the parameters of the landfill significantly increased compared to the previous years of the study. There is a tendency to increase the proportion of plastic waste and composition in the morphological composition of solid waste. The results obtained during the first and second study periods, compared with the previous years, show that the content of heavy metals does not exceed the MPC. However, there has been an increase in the content of mobile forms of Pb, Cd, and Co in the soil over the past three years.*

Key words: *soil cover, unauthorized dumps, level of anthropogenic influence, content of moving forms of heavy metals*