

Міністерство освіти і науки України

ISSN 2075-5457 (print)

ISSN 2220-9697 (online)

ВІСНИК



*Харківського національного
університету імені В. Н. Каразіна*

Серія "Біологія"

Випуск 29

Харків-2017

Міністерство освіти і науки України

ВІСНИК

*Харківського національного
університету імені В. Н. Каразіна*

Серія "Біологія"

Випуск 29

Започаткований у 1970 р.

THE JOURNAL

of V. N. Karazin Kharkiv

National University

Series "Biology"

Issue 29

Founded in 1970

Харків-2017

Вісник, серія «Біологія» є збірником наукових праць, який містить результати досліджень та оглядові статті з біології, зокрема з біохімії та генетики, зоології та ботаніки, фізіології тварин і рослин, мікології, мікробіології, ґрунтознавства, кріобіології та ін., а також матеріали про події наукового життя та описання оригінальних методів і приладів у галузі біології.

Для викладачів, наукових співробітників, аспірантів і студентів, які спеціалізуються у відповідних або суміжних галузях науки.

Вісник є фаховим виданням з біологічних наук (Наказ МОН України №747 від 13.07.2015 р.) та включений до Clarivate Analytics Master Journal List.

Затверджено до друку рішенням

**Вченої ради Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна
(протокол №18 від 22.12.2017).**

Є.Е.Перський – головний редактор, д.б.н., професор кафедри біохімії, Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

В.В.Жмурко – д.б.н., професор кафедри фізіології і біохімії рослин та мікроорганізмів, Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

В.В.Навроцька – відповідальний секретар, к.б.н., доцент кафедри генетики і цитології, Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

Члени редакційної колегії:

Л.О.Атраментова – д.б.н., професор кафедри генетики і цитології, Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

Н.В.Багацька – д.б.н., професор кафедри генетики і цитології, Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

В.А.Бондаренко – д.б.н., професор кафедри фізіології людини та тварин, Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

Т.В.Догадіна – д.б.н., професор кафедри ботаніки та екології рослин, Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

В.А.Токарський – д.б.н., професор кафедри зоології та екології тварин, Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

А.Ю.Утєвський – к.б.н., доцент кафедри зоології та екології тварин, Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

С.О.Костерін – д.б.н., професор, член-кор. НАНУ, Інститут біохімії НАНУ імені О. В. Палладіна

Н.О.Сибірна – д.б.н., професор кафедри біохімії, Львівський національний університет імені Івана Франка

О.О.Нікольський – д.б.н., професор кафедри системної екології екологічного факультету, Російський університет дружби народів (Росія)

О.В.Брандлер – к.б.н., старший науковий співробітник, Інститут біології розвитку РАН (Росія)

Gregory F.Oxenkrug – PhD, MD, professor, Tufts University School of Medicine, Tufts Medical Center (США)

Frederic Marion-Poll – PhD in Biology, senior professor of entomology, AgroParisTech, National Institute of Agronomical Research (Франція)

N.I.Ronkina – PhD in Biology, scientific researcher, Hannover Medical School (Німеччина)

Адреса редакції:

біологічний факультет,

Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна,

майдан Свободи, 4, Харків, Україна, 61022

тел. +38 /057/ 707-55-71

<http://seriesbiology.univer.kharkov.ua>

e-mail: seriesbiology@ukr.net

Статті пройшли внутрішнє та зовнішнє рецензування.

Свідоцтво про державну реєстрацію KB №21572–11472P від 20.08.2015

© Харківський національний університет
імені В. Н. Каразіна, оформлення, 2017

ЗМІСТ *** CONTENT

*** БІОТЕХНОЛОГІЯ *** BIOTECHNOLOGY ***

- Горшкова О.Г., Гудзенко Т.В., Волювач О.В., Васильєва Н.Ю. Метал-акумуляуюча та деструктивна активність іммобілізованих бактерій в біотехнології очищення морської води..... 5

*** БІОХІМІЯ *** BIOCHEMISTRY ***

- Barannik T.V., Shuba V.V. *In silico* analysis of the potential heme binding sites in the protein complexes containing human repulsive guidance molecule BMP co-receptor B (RGMB)..... 12
- Романько М.Є. Рівень інтенсивності процесів переокиснення ліпідів і окиснювальної модифікації білків у мембранних фракціях клітин *Escherichia coli* як біомаркер тестування біосумісності наночастинок металів..... 19

*** ГЕНЕТИКА *** GENETICS ***

- Городнянский И.Д. Взаимодействие *Wolbachia pipientis* с мобильными элементами генома дрозофилы: краткий обзор возможных случаев и предположений..... 34
- Dyka L.D., Shakina L.A., Strashnyuk V.Yu. Peculiarities of homologous conjugation of polytene chromosomes after exposure to microwaves and static magnetic field in *Drosophila melanogaster* Meig. 41
- Kovach V.A., Filiponenko N.S., Kolot N.V., Volkova N.Ye. Larval exposure to low concentrations of neonicotinoids and niacin affects *Drosophila melanogaster* indices of reproductive success 49

*** ЗООЛОГІЯ ТА ЕКОЛОГІЯ *** ZOOLOGY AND ECOLOGY ***

- Киося Е.А. Современные методы фаунистических исследований наземных тихоходок (*Tardigrada*)..... 59

*** МІКРОБІОЛОГІЯ *** MICROBIOLOGY ***

- Мерліч А.Г., Жунько І.Д., Ліманська Н.В., Іваниця В.О. Антагоністична активність проти фітопатогенних бактерій та здатність до утворення біоплівки бактерій *Enterococcus italicus* ОНУ547 та їх консорціумів з *Lactobacillus plantarum*..... 71
- Поточилова В.В., Войцеховський В.Г. Етіологічна роль та чутливість анаеробних бактерій, виділених від хворих з гнійним некротичним панкреатитом, до антибіотиків..... 77

*** ФІЗІОЛОГІЯ ЛЮДИНИ ТА ТВАРИН *** PHYSIOLOGY OF HUMAN AND ANIMALS ***

- Зай С.Ю., Мотузюк О.П., Білобров В.Ю., Вулицька Д.А., Ноздренко О.Д., Абрамчук О.М. Зміни силової відповіді *musculus soleus* у алкоголізованих щурів з експериментально-індукованою ішемією тривалістю 1 та 2 години..... 82
- Колосова О.В. Гендерні особливості функціонального стану нервово-м'язового апарату у осіб з високим рівнем адаптації до фізичного навантаження..... 89
- Орлик Н.А., Босенко А.І. Факторна структура функціональних можливостей спортсменок 17–22 років впродовж оваріально-менструального циклу..... 94

*** ФІЗИОЛОГІЯ РОСЛИН *** PLANT PHYSIOLOGY ***

Романчук С.М. Активність β-глюкозидази в проростках <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh при дії іонізуючого випромінювання.....	103
---	-----

*** ФАУНА УКРАЇНИ НА МЕЖІ ХХ–ХХІ СТ. НОВІ КОНЦЕПЦІЇ ЗООЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ
*** FAUNA OF UKRAINE AT THE TURN OF XX–XXI CENTURIES.
NEW CONCEPTS OF ZOOLOGICAL RESEARCH ***

Банік М.В., Пономаренко О.Л., Атемасов А.А. Структура угруповань гніздових водоплавних і водно-болотних птахів Приорелля та її зміни за останні десятиліття.....	109
Варигин А.Ю. Суточна динаміка просторового розподілу підвижних беспозвоночних сообществ обрастания Одеського залива Чорного моря.....	120
Гетьман Т.П. Ихтиоцены прибрежной акватории бухты Круглая (Севастополь, Чёрное море)...	126
Дикий І.В., Марців М.В., Шельвінський В.І., Затушевський А.Т. Особливості живлення деяких видів родини Mustelidae на території Львівської області.....	135
Дрогваленко Н.А., Макарян Р.Н., Бирюк О.В., Коршунов А.В., Шабанов Д.А. Парадокс воспроизводства триплоидных <i>Pelophylax esculentus</i> в гемиклональных популяционных системах зеленых лягушек Брусовки (Донецкая область) и Кременной (Луганская область).....	142
Дупак В.С., Попельнюх В.В. Структура зимових ночівельних скупчень воронів птахів роду <i>Corvus</i> на території м. Полтава.....	151
Іванець О.Р. Гіллястові раки (Cladocera: Daphniidae, Chydoridae) Українського Розточчя: порівняльна характеристика.....	159
Ронкин В.И., Савченко Г.А., Атемасов А.А. Состояние поселения, типы семейных участков и перспективы сохранения степного сурка в меловом ландшафте НПП «Двуречанский».....	167

*** КОРОТКІ ПОВІДОМЛЕННЯ *** BRIEF COMMUNICATIONS ***

Кривицька І.А. Екотоксикологічна оцінка якості ґрунтів м. Маріуполь.....	175
У Сі, Кот Ю., Кот К., Морс Р., Доран О., Хамдаллах Амжад, Перський Є. Показники загального обміну і оксидативного стресу у щурів при тривалій дії малих концентрацій Cd ²⁺	182

*** ІНФОРМАЦІЯ *** INFORMATION ***

Правила для авторів	188
----------------------------------	-----

••• БІОТЕХНОЛОГІЯ ••• BIOTECHNOLOGY •••

УДК: 579. 695

Метал-акумуляюча та деструктивна активність іммобілізованих бактерій в біотехнології очищення морської води О.Г.Горшкова, Т.В.Гудзенко, О.В.Волювач, Н.Ю.Васильєва

Одеський національний університет імені І.І.Мечникова (Одеса, Україна)
tgudzenko@ukr.net

Проведено порівняльний аналіз метал-акумуляючої та деструктивної активності морських бактерій в біотехнології очищення багатокомпонентної за складом поліютантів морської води. Підвищенню метал-акумуляючій і ПАВ- (ПАВ: поверхнево-активна речовина) та нафтодеструктивній активності асоціації бактерій *Pseudomonas fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. cepacia* ONU327, №38, №39, №41, №47 сприяла іммобілізація на синтетичному носії типу «ВІЯ». Експериментальне випробування підтвердило, що при використанні біохімічно активних іммобілізованих бактерій досягаються максимальні результати по очищенню морської води як від неорганічних, так і органічних поліютантів. Ступінь очищення від органічних сполук досягав максимуму за обробки води іммобілізованими бактеріями у складі біофлорів на поверхні штучного носія – 74,0% для додецилсульфату натрію і 83,0% для вуглеводнів нафти; від неорганічних сполук – за обробки води клітинами бактерій, іммобілізованими на штучному носії без флокуляції – 64,4% для Cr (VI) і 71,6% для Cu (II). Виявлене дозволяє рекомендувати використовувати іммобілізовані бактерії з поліфункціональною активністю у новій технології очищення морської води в умовах багатокомпонентного за складом поліютантів забруднення.

Ключові слова: *метал-акумуляюча та деструктивна активність, іммобілізовані бактерії, хімічні забруднювачі, біотехнологія очищення морської води.*

Metal-accumulating and destructive activity of immobilized bacteria in seawater biotechnology

O.G.Gorshkova, T.V.Gudzenko, O.V.Voliuvach, N.Yu.Vasylieva

A comparative analysis of the metal-accumulating and destructive activity of marine bacteria in biotechnology for the purification of sea water with multicomponent contamination has been carried out. Increase of metal-accumulating and surfactant- and oil-destructive activity of the association of bacteria *Pseudomonas fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. cepacia* ONU327, No. 38, No. 39, No. 41, No. 47 has been promoted by immobilization on synthetic carriers such as "VIA". The experimental test has confirmed that the use of biochemically active immobilized bacteria gives maximum results in purification of sea water from both inorganic and organic pollutants. The degree of purification from organic compounds reached a maximum when water was treated with immobilized bacteria in the composition of bioflocs on the surface of an artificial carrier – 74.0% for sodium dodecylsulfate and 83.0% for petroleum hydrocarbons; from inorganic compounds – when treating water with bacterial cells immobilized on an artificial carrier without flocculation, 64.4% for Cr (VI) and 71.6% for Cu (II). These results allow recommending the use of immobilized bacteria with polyfunctional activity in a new technology for treating sea water with multicomponent pollution.

Key words: *metal-accumulating and destructive activity, immobilized bacteria, chemical pollutants, sea water purification biotechnology.*

Металл-аккумулирующая и деструктивная активность иммобилизованных бактерий в биотехнологии очистки морской воды Е.Г.Горшкова, Т.В.Гудзенко, О.В.Волювач, Н.Ю.Васильєва

Проведен сравнительный анализ металл-аккумулирующей и деструктивной активности морских бактерий в биотехнологии очистки многокомпонентной по составу загрязнителей морской воды. Повышению металл-аккумулирующей и ПАВ- (ПАВ: поверхностно-активное вещество) и нефтедеструктивной активности ассоциации бактерий *Pseudomonas fluorescens* ONU328, *P. maltophilia*

ONU329, *P. seracia* ONU327, №38, №39, №41, №47 способствовала иммобилизация на синтетическом носителе типа «ВИЯ». Экспериментальное испытание подтвердило, что при использовании биохимически активных иммобилизованных бактерий достигаются максимальные результаты по очистке морской воды как от неорганических, так и органических загрязнителей. Степень очистки от органических соединений достигала максимума при обработке воды иммобилизованными бактериями в составе биофлокул на поверхности искусственного носителя – 74,0% для додецилсульфата натрия и 83,0% для углеводородов нефти; от неорганических соединений – при обработке воды клетками бактерий, иммобилизованными на искусственном носителе без флокуляции – 64,4% для Cr (VI) и 71,6% для Cu (II). Обнаруженное позволяет рекомендовать использовать иммобилизованные бактерии с полифункциональной активностью в новой технологии очистки морской воды в условиях многокомпонентного по составу поллютантов загрязнения.

Ключевые слова: металл-аккумулирующая и деструктивная активность, иммобилизованные бактерии, химические загрязнители, биотехнология очистки морской воды.

Вступ

В різних районах Чорного моря спостерігається перевищення рівня гранично допустимих концентрацій (ГДК) нафтопродуктів, синтетичних поверхнево-активних речовин (ПАР) і таких іонів важких металів (ІВМ), як: Cr (VI), Zn (II), Cu (II) (Зайцев, 2006; Chasovnikov et al., 2016; Levent Altas, Hanife Buyukgungor, 2007; Koray Ozseker et al., 2013; Min'kovskaya, 2014). На здоров'я людей негативно впливає навантаження рекреаційних прибережних зон моря токсичними хімічними речовинами, з якими природні біологічні агенти (водорості, молюски, мікроорганізми) процесів самоочищення не завжди справляються (Вергейчик, 2009). Викладене свідчить про необхідність розробки нових екологічно безпечних біотехнологій ремедіації води від хімічного забруднення, які передбачають використання морських бактерій. Незважаючи на те, що більшість з відомих мікроорганізмів роду *Pseudomonas* володіють високим біотехнологічним потенціалом, їх з причини патогенності (наприклад *P. aeruginosa*) не використовують в охороні навколишнього середовища (Galkin et al., 2015). В останній час найбільш перспективним напрямком в біотехнології очищення води від поллютантів є використання іммобілізованих біохімічно активних непатогенних штамів мікроорганізмів, що володіють метал-акумулюючою та деструктивною активністю по відношенню до органічних поллютантів (Гудзенко та ін., 2012; Глоба, Гвоздяк, 2015; Gudzenko et al., 2014).

Мета дослідження – оцінка метал-акумулюючої, ПАР- та нафтодеструктивної активності іммобілізованих бактерій в біотехнології очищення морської води від поллютантів.

Матеріали та методи досліджень

Об'єктом дослідів були біохімічно активні непатогенні штами морських мікроорганізмів, що зберігаються в музейній колекції мікроорганізмів кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І.І.Мечникова. Дослідження їх біотехнологічних властивостей – метал-акумулюючої, ПАР- та нафтодеструктивної активності проведено при використанні в різних технологіях очищення багатокомпонентної за складом поллютантів морської води – із вмістом у ній неорганічних (іони важких металів) і органічних (нафта, ПАР) речовин у концентраціях, що перевищують ГДК.

Культивували бактерії при температурі 28°C, рН 7, на живильному пептонно-сольовому середовищі М-9 складу (г/л): KH_2PO_4 – 1,5; Na_2HPO_4 – 3; NaCl – 5; NH_4Cl – 1; пептон – 10; глюкоза – 2; дріжджовий екстракт – 5.

Для іммобілізації бактерій використовували волокнисту насадку – синтетичний носій із ультратонкого гладкого і текстурованого волокна, змонтованого у вигляді плоскої «ВІІ» ТУ995990 (далі по тексту статті просто носій), що забезпечує масообмін і перманентну регенерацію носія, на якому добре розвивається біоплівка мікроорганізмів. Відомо (Глоба, Гвоздяк, 2015), що волокнисті носії типу «ВІЯ» не мають собі рівних у світі за питомою площею поверхні і найважливішими технологічними параметрами. Біологічну модифікацію синтетичного носія здійснювали двома способами – іммобілізованими у складі биофлокул (отриманих за присутності 3% розчину перекису водню і 10% розчину хлориду кальцію) і вільними клітинами бактерій.

До початку проведення досліджень в незабрудненій зоні Чорного моря, в районі Гідробіологічної станції ОНУ 04.07.2016 р. відібрали проби морської води. Аналіз морської води здійснювали згідно з (Унифицированные методы, 1971). У морській воді концентрація Cu (II) складала 18 ± 4 мкг/л, концентрації вуглеводнів нафти, аніонних ПАР, Cr (VI) ($0,010 \pm 0,005$ мкг/л) і Zn (II) ($0,030 \pm 0,005$ мкг/л) не перевищували їх ГДК (Обобщенный перечень, № 12-04-11). У

незабруднені проби морської води дозовано вводили розчини солей, що містили концентрацію по Cr (VI) 50 мкг/л (50,0 ГДК_{Cr}), по Zn (II) 100 мкг/л (2,0 ГДК_{Zn}), по Cu (II) – 50 мкг/л (10 ГДК_{Cu}), розчин аніонної ПАР (додецилсульфат натрію, ДДСН) – 5,0 мг/л (10,0 ГДК_{ПАР}) і нафту (нафту густиною 0,84 г/см³ вводили у диспергованому стані) – 0,5 мг/л (10,0 ГДК_{нафта}). Це обумовлено тим, що нами впродовж 2015 року в різних районах Чорного моря (острів Зміїний, 16 ст. Великого Фонтану, Дачі Ковалевського) у відібраних згідно з ГОСТ 17.1.5.05-85 (ГОСТ 17.1.5.05-85) пробах морської води було зафіксовано перевищення таких ІВМ, як: Cr (VI) в діапазоні концентрацій від 10 до 32 мкг/л, Zn (II) в діапазоні концентрацій від 50 до 61 мкг/л, Cu (II) на рівні концентрацій 10–11 мкг/л, вуглеводнів нафти – 0,375–0,5 мг/л і аніонних ПАР – 2,0 мг/л.

Для постановки в лабораторних умовах дослідів використовували розчини K₂Cr₂O₇ (68,0 мг K₂Cr₂O₇/100 мл H₂O), ZnSO₄·7H₂O (44,0 мг ZnSO₄·7H₂O/100 мл H₂O), CuSO₄·5H₂O (19,5 мг кристалогідрату CuSO₄·5H₂O/100 мл H₂O).

Концентрації хімічних речовин у забруднених пробах морської води математично складали з тими концентраціями, що були зафіксовані в пробах морської води, відібраної із незабрудненої прибережної зони Гідробіологічної станції Одеського національного університету імені І.І.Мечникова. Таким чином, перед початком проведення очищення морської води (контроль) в ній містились: Cr (VI) – 50,01 мкг/л; Zn (II) – 100,03 мкг/л; Cu (II) – 68,0 мкг/л; нафта – 0,5 мг/л; ДДСН – 5,0 мг/л.

Оцінку метал-акумуляуючої, ПАР- та нафтодеструктивної активності іммобілізованих бактерій здійснювали за ступенем очищення морської води від політантів:

$$\alpha = [(C_0 - C) / C_0] \cdot 100\%, \quad (1)$$

де C₀ і C – концентрації конкретного політанту до та після обробки.

Концентрацію ІВМ визначали атомно-абсорбційним методом на полум'яному атомно-абсорбційному спектрофотометрі «Сатурн-2» у полум'ї суміші «повітря – пропан – бутан» при відповідних довжинах хвиль: 324,7 нм для Cu; 213,9 нм для Zn тощо; вміст аніонної ПАР (додецилсульфату натрію, ДДСН) визначали екстракційно-фотометричним методом (Унифицированные методы, 1971), вуглеводнів нафти – методом ІЧ-спектрометрії. Аналітичні сигнали реєстрували FTIR-спектрометром Frontier фірми PerkinElmer в діапазоні хвильових чисел 3200–2700 см⁻¹, де фіксували валентні коливання CH₃- і CH₂-груп аліфатичних і аlicиклічних сполук і бічних ланцюгів ароматичних вуглеводнів, вуглець-водневих зв'язків ароматичних сполук (Леоненко і др., 2010).

Усі досліди проводили в п'яти повторностях. Статистична обробка результатів була проведена з використанням двохфакторного дисперсійного аналізу ANOVA за допомогою програми Statistica. У якості незалежних факторів розглядали спосіб обробки і тип забруднювача, як залежна змінна розглядався показник частки забруднювача в очищеній воді у порівнянні з контролем.

Результати та обговорення

Вперше для біологічного очищення морської води нами запропоновано використовувати мікробний реагент – асоціацію бактерій, складену із колекційних штамів *Pseudomonas fluorescens* ONU328, *Pseudomonas maltophilia* ONU329, *Pseudomonas cepacia* ONU327 та морських штамів: №38, №39, №41, №47 – антагоністів патогенних бактерій, взятих у однаковому об'ємному співвідношенні.

Для зменшення витрат мікробного реагенту із збереженням біохімічної активності мікроорганізмів та можливого підвищення ступеня очищення багатокомпонентної морської води із вмістом у ній неорганічних (іони важких металів) і органічних (нафта, ПАР) речовин у концентраціях, що перевищують ГДК, використали різні технології іммобілізації мікроорганізмів на носії типу «ВІЯ» з високою адсорбційною здатністю щодо органічних сполук, особливо нафтопродуктів (Глоба, Гвоздяк, 2015; Гвоздяк та ін., 2013). Вперше використано нову технологію іммобілізації мікроорганізмів у складі біофлорів, що дозволила посилити адгезію бактеріальних клітин (обробка №1) до поверхні штучного носія зі збереженням їх функціональної активності. Крім того, використовували клітини бактерій без флокуляції, іммобілізовані на штучному носії (обробка №2), та вільні клітини асоціації бактерій (обробка №3).

Результати оцінки метал-акумуляуючої активності іммобілізованих бактерій за ступенем очищення морської води від Cr (VI), Zn (II), Cu (II) представлені на рис. 1.

Із одержаних експериментальних даних можна констатувати: Zn-акумулююча активність була найбільш високою у бактерій у складі біофлорів, іммобілізованих на штучному носії – ступінь очищення води від цього металу складав 75,5%. Іммобілізація бактерій на штучному носії без флокуляції сприяла підвищенню їх метал-акумулюючої активності відносно Cr (VI) (65%) і Cu (II) (70%). Низька акумулююча активність вільних клітин бактерій по відношенню до іонів важких металів свідчить про те, що в процесі їх вилучення із морської води вагоме значення мають процеси сорбції.

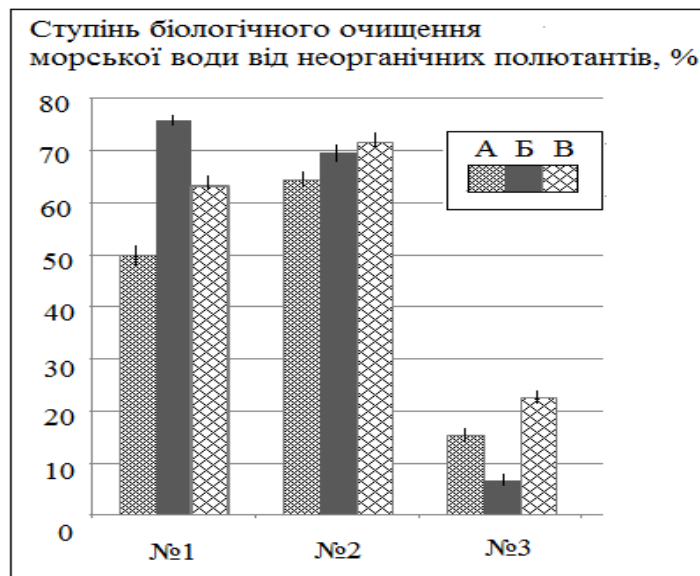


Рис. 1. Метал-акумулююча активність іммобілізованих бактерій за ступенем очищення морської води від Cr (VI) (А), Zn (II) (Б), Cu (II) (В)

Позначення: обробка №1 – іммобілізованими бактеріями у складі біофлорів на поверхні штучного носія; обробка №2 – клітинами бактерій, іммобілізованими на штучному носії без флокуляції; обробка №3 – вільними клітинами бактерій.

Порівняльний аналіз показав, що незважаючи на те, що вихідна концентрація хрому шестивалентного, який є найотруйливішим для мікроорганізмів, значно перевищувала ГДК (50,0 ГДК_{Cr}) порівняно з іншими забруднювачами (2,0 ГДК_{Zn}; 13,6 ГДК_{Cu}; 10,0 ГДК_{нафта}; 10,0 ГДК_{ддсн}), активність іммобілізованих мікроорганізмів щодо ІВМ не пригнічувалась. Ступінь очищення морської води від Cr (VI), Zn (II) і Cu (II) вільними клітинами асоціації бактерій за відсутності носія (№3) дорівнював 15,4%, 6,8% і 22,7% відповідно. Експериментально підтверджено, що використання вільних та іммобілізованих бактерій для вилучення Cr (VI) із багатокомпонентної забрудненої морської води підвищується в наступному ряді: №3 ($\alpha=15,4\%$) < №1 ($\alpha=50,0\%$) < №2 ($\alpha=64,4\%$). Тобто найефективнішою є обробка з використанням носія з іммобілізованими на його поверхні клітинами бактерій (№2).

Аналогічна закономірність спостерігалась і при очищенні морської води від Cu (II): №2 ($\alpha=71,6\%$) > №1 ($\alpha=63,1\%$) > №3 ($\alpha=22,7\%$) > контроль ($\alpha=18,8\%$). Залишкова концентрація Cu (II) у морській воді за її обробки носієм з іммобілізованими на його поверхні клітинами мікробного реагенту хоча і не відповідає ГДК_{Cu}, але суттєво зменшилась з 13,6 ГДК до 4,0 ГДК. Ступінь очищення морської води від Cu (II) за умов наявності у ній інших супутніх забруднювачів органічної та неорганічної природи був максимальним за обробки носієм з іммобілізованими на його поверхні клітинами бактерій. У контролі від початку дослідів концентрація Cu (II) зменшилась на 18,8%, що мабуть, пояснюється їх зв'язуванням з аніонною ПАР у комплексноподібні сполуки, більшість з яких є стійкими. При детоксикації морської води від Zn (II) усіма випробовуваними обробками за присутності пропонованого нами метал-резистентного мікробного реагенту спостерігалась дещо інша картина. Ступінь очищення морської води від Zn (II) порівняно із ступенем очищення води від

Cr (VI) і Cu (II) був максимальним (75,5%) за її обробки носієм з іммобілізованими на його поверхні біофлокулами бактерій (№1).

Результати оцінки ПАР- і нафтодеструктивної активності іммобілізованих бактерій за показником ефективності очищення морської води від органічних поллютантів (за присутності перелічених вище ІВМ) представлені на рис. 2.



Рис. 2. ПАР- і нафтодеструктивна активність іммобілізованих бактерій за ступенем очищення морської води від вуглеводнів нафти (А), додецилсульфату натрію (Б)

Позначення: обробка №1 – іммобілізованими бактеріями у складі біофлоків на поверхні штучного носія; обробка №2 – клітинами бактерій, іммобілізованими на штучному носії без флокуляції; обробка №3 – вільними клітинами бактерій.

В результаті досліджень встановлено, що найбільш висока здатність окиснювати органічні сполуки була притаманна бактеріям, іммобілізованим у складі біофлоків на поверхні штучного носія. Високу ПАР- і нафтодеструктивну активність проявляли також іммобілізовані на штучному носії бактерії без флокуляції. Використання вільних клітин бактерій підтвердило їх високий окиснювальний потенціал по відношенню до органічних сполук.

З рис. 2 видно: ступінь біологічного очищення морської води від нафти є максимальним і складає 83% за її обробки іммобілізованими у складі біофлоків бактеріями (№1). Як показали наші попередні дослідження, штами *Pseudomonas fluorescens* ONU328, *Pseudomonas maltophilia* ONU329, *P. seracia* ONU327 є ефективними деструкторами нафти (Gudzenko et al., 2013). Необхідно зазначити, що ефективність очищення морської води від ДДСН за біотехнологічної обробки №1 і обробки №2 однакова, $\alpha=72-74\%$, а за мікробіологічної обробки №3 складає 57%, тобто використані мікроорганізми здатні споживати ПАР як одне із джерел карбонового харчування.

Статистична обробка з використанням ANOVA показала, що і метал-акумулююча активність, і ПАР- і нафтодеструктивна активність залежать як від способу обробки, так і від типу забруднювача. Розраховані показники критерію Фішера склали $F=929,48$, $F=52,38$ відповідно для кожного з факторів впливу ($p<0,00001$, рис. 1 і 2).

Найбільш цікавим було саме дослідити і підтвердити взаємодію способу обробки синтетичного носія типу «ВІЯ» з технологією іммобілізації на його поверхні бактерій. Використання двохфакторного дисперсійного аналізу дозволило наочно довести значимість використання комбінованого підходу для створення біологічної технології для очищення води від забруднювачів різного типу в залежності від типу носія та іммобілізації бактерій.

Як видно з рис. 3, використання технології іммобілізації значно покращує ефективність очищення води. У варіанті обробки води вільними клітинами бактерій за відсутності синтетичного носія (обробка №3) залишкова концентрація конкретного поллютанта відрізнялась від контролю

незначуще. Це також підтверджується результатами, наведеними на рис. 1 і 2. При використанні першого (обробка №1) або другого варіанту (обробка №2) іммобілізації клітин на синтетичному носії показники залишкової концентрації конкретного поліюванта значуще відрізнялись від третього варіанту (обробка №3) і від контролю (рис. 3), що свідчить про високу метал-акумулюючу та ПАР- і нафтодеструктивну активність. Також наочно видно відмінність цих варіантів між собою в залежності від типу забруднювача (рис. 3).

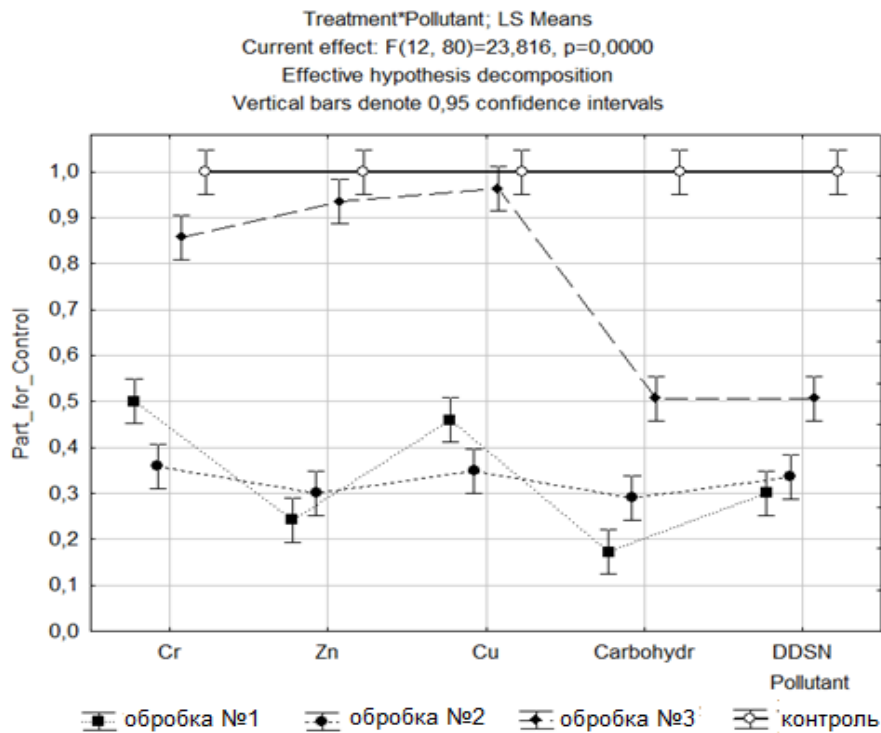


Рис. 3. Середні значення дослідів (в частках від середнього значення контролю – Part_for_Control) за різної обробки (Treatment) і типу забруднювача (Pollutant)

Позначення: обробка №1 – іммобілізованими бактеріями у складі біофлор на поверхні штучного носія; обробка №2 – клітинами бактерій, іммобілізованими на штучному носії без флокуляції; обробка №3 – вільними клітинами бактерій.

Таким чином, за результатами проведених досліджень встановлено, що іммобілізація асоціації морських бактерій (*P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. seracia* ONU327, №38, №39, №41, №47) сприяє підвищенню їх метал-акумулюючої та деструктивної активності, що дозволило використати їх в різних технологіях очищення багатоконпонентної за складом морської води від неорганічних і органічних поліювантів (у вихідних концентраціях, що перевищують ГДК). Експериментальне випробування підтвердило, що при використанні синтетичного носія типу «ВІЯ» з іммобілізованими за спеціальною технологією на його поверхні бактеріями (обробка №1 і №2) досягаються максимальні результати по очищенню морської води як від неорганічних, так і органічних поліювантів (за їх сумісної присутності). Ступінь очищення морської води від неорганічних поліювантів (Cr (VI), Zn (II), Cu (II)) був у межах від 50,0% до 75,5%, від органічних поліювантів – від 74% (для ДДСН) до 83% (для вуглеводнів нафти).

Виявлене дозволяє рекомендувати використовувати іммобілізовані у складі біофлор на поверхні синтетичного носія типу «ВІЯ» непатогенні штами морських бактерій з поліфункціональною активністю у новій технології очищення морської води в умовах багатоконпонентного за складом поліювантів забруднення.

Висловлюємо щирю подяку Д.А.Шабанову, професору кафедри зоології та екології тварин Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна, який, як рецензент, надав слушні

поради щодо поліпшення представлення результатів експерименту та допоміг в проведенні статистичного аналізу експериментальних даних.

Список літератури

- Вергейчик Т.Х. Токсикологическая химия / Под ред. Е.Н.Вергейчика – М.: МЕДпресс-информ, 2009. – 400с. /Vergeychik T.Kh. Toksikologicheskaya khimiya / Pod red. Ye.N.Vergeychika – M.: MEDpress-inform, 2009. – 400s./
- Гвоздяк П.І., Кузьмінський Є.В., Саблій Л.А., Жукова В.С. Спосіб біологічного очищення стічних вод. Патент України на корисну модель №81251. 2013. Опубл. 25.06.2013. Бюл. №12. /Gvozdyak P.I., Kuzminskyy Ye.V., Sabliy L.A., Zhukova V.S. Sposib biologichnogo ochyshchennya stichnykh vod. Patent Ukrainy na korysnu model' №81251. 2013. Opubl. 25.06.2013. Byul. №12./
- Глоба Л.И., Гвоздяк П.И. Биологическая деноксация химических патогенов в водной среде // Гигиена и санитария. – 2015. – №1. – С. 46–50. /Globa L.I., Gvozdyak P.I. Biologicheskaya denoksatsiya khimicheskikh patogenov v vodnoy srede // Gigiyena i sanitariya. – 2015. – No. 1. – S. 46–50./
- ГОСТ 17.1.5.05-85. Охрана природы. Гидросфера. Общие требования к отбору проб поверхностных и морских вод, льда и атмосферных осадков. /GOST 17.1.5.05-85. Okhrana prirody. Gidrosfera. Obshchiye trebovaniya k otboru prob poverhnostnykh i morskikh vod, l'da i atmosferynykh osadkov./
- Гудзенко Т.В., Волювач О.В., Беляєва Т.О. та ін. Вилучення міді (II) та нікелю (II) із концентрованих водних розчинів глиною, хітозаном та іммобілізованими мікроорганізмами // Мікробіологія і біотехнологія. – 2012. – №4. – С. 36–43. /Gudzenko T.V., Volyuvach O.V., Belyayeva T.O. ta in. Vyluchennya midi (II) ta nikelju (II) iz kontsentrovanykh vodnykh rozchyniv glynoyu, khitozanom ta immobilizovanyymi mikroorganizmamy // Mikrobiologiya i biotekhnologiya. – 2012. – No. 4. – S. 36–43./
- Зайцев Ю.П. Введение в экологию Черного моря. – Одесса: Эвен, 2006. – 224с. /Zaytsev Yu.P. Vvedeniye v ekologiyu Chernogo morya. – Odessa: Ewen, 2006. – 224s./
- Леоненко И.И., Антонович В.П., Андрианов А.М. и др. Методы определения нефтепродуктов в водах и других объектах окружающей среды (обзор) // Методы и объекты химического анализа. – 2010. – Т.5, №2. – С. 58–72. /Leonenko I.I., Antonovich V.P., Andrianov A.M. i dr. Metody opredeleniya nefteproduktov v vodakh i drugikh obyektakh okruzhayushchey sredy (obzor) // Metody i obyekty himicheskogo analiza. – 2010. – T.5, no. 2. – S. 58–72./
- Обобщенный перечень предельно-допустимых концентраций и ориентировочно безопасных уровней вредных веществ для воды рыбохозяйственных водоемов. (утв. Главрыбводом Минрыбхоза СССР от 09.08.1990 г. № 12-04-11. /Generalized list of maximum permissible concentrations and approximately safe levels of harmful substances to water fishery reservoirs. (app. Glavrybvod of the USSR Ministry of fishery from 09.08.1990, No. 12-04-11/
- Унифицированные методы анализа вод / Под ред. Ю.Ю.Лурье. – М.: Химия, 1971. – 400с. /Unifitsirovannye metody analiza vod / Pod red. Yu.Yu.Lurye. – M.: Khimiya, 1971. – 400s./
- Chasovnikov V., Chjoo V., Ocherednik O., Maryasova E. Evaluation of the lever of technogenic pollution in the coastal zone of the Black Sea near Gelendzhik // Marine Chemistry. – 2016. – Vol.56, no. 1. – P. 76–80.
- Galkin M.B., Ivanytsia V.O., Ishkov Yu.V. et al. Characteristics of the *Pseudomonas aeruginosa* PA01 intercellular signaling pathway (quorum sensing) functioning in presence of porphyrins bismuth complexes // Pol. J. Microbiol. – 2015. – Vol.64 (2). – P. 101–106.
- Gudzenko T., Voliuvach O., Belyaeva T. et al. Oil oxidative activity of some strains of bacteria of *Pseudomonas* genus // Microbiology & Biotechnology. – 2013. – No. 4 (24). – P. 72–80.
- Gudzenko T., Voliuvach O., Belyaeva T. et al. Remove of hexadecylpyridinium bromide from aqueous solutions by bacteria of the genus *Pseudomonas* in their interaction with clay mineral and chitosan // Microbiology & Biotechnology. – 2014. – No. 1 (25). – P. 72–78.
- Koray Ozseker, Coskun Eruz, Sadi Ciliz Determination of coppel pollution and associated ecological risk in coastal sediments of southeastern Black Sea region, Turkey // Bull. Environ. Contam. Toxicol. – 2013. – Vol.91. – P. 661–666.
- Levent Altas, Hanife Buyukgungor Heavy metal pollution in the Black Sea shore and offshore of Turkey // Environ Geol. – 2007. – Vol.52. – P. 469–476.
- Min'kovskaya R. Contamination of the Black Sea surface water layer with oil hydrocarbons // Russian Meteorology and Hydrology. – 2014. – Vol.39, no. 10. – P. 705–712.

Представлено: О.М.Нікіпелова / Presented by: O.M.Nikipelova
Рецензент: Д.А.Шабанов / Reviewer: D.A.Shabanov
Подано до редакції / Received: 23.10.2017

... БІОХІМІЯ ... BIOCHEMISTRY ...

UDC [577.112.7+57.052]

***In silico* аналіз потенційних гем-зв'язувальних сайтів у протеїнових комплексах, що містять repulsive guidance molecule BMP co-receptor B (RGMB) людини** **Т.В.Баранник, В.В.Шуба**

Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна (Харків, Україна)
tbarannik@karazin.ua

BMP signalling і рівень гему задіяні у регуляції метаболізму заліза, розвитку оксидативного стресу і запалення. Накопичення вільного гему внаслідок деструкції гемопротеїнів веде до пошкоджень клітин та/або модуляції сигналіну. Передбачення потенційних гем-зв'язувальних сайтів у протеїнових комплексах, що містять repulsive guidance molecule BMP co-receptor B (RGMB), було проведено за допомогою онлайн програм PatchDock і HemeBIND з використанням даних щодо структури RGMB комплексів з неогеніном (PDB ID 4bq6) та/або BMP2 (PDB ID 4uhz і 4ui2). Молекулярний докінг виявив, що природний тетрамерний комплекс неогеніну та його корецептору RGMB надає декілька сайтів для зв'язування гему поруч з ділянками контакту ланцюгів, в той час як взаємодія гему з мономерними компонентами менш вірогідна. Тільки окремі передбачені сайти містили амінокислоти, здатні формувати стабільні зв'язки з гемом (His, Cys або Tyr), але неспецифічне приєднання гему до декількох ланцюгів комплексу одночасно могло б спричинити короточасний конформаційний ефект. Беручи до уваги прозапальну дію BMP сигналіну на ендотелій, зв'язування гему з BMP рецепторним комплексом може обговорюватись як неспецифічний механізм судинного патогенезу при накопиченні гему внаслідок стресу.

Ключові слова: зв'язування гему, метаболізм заліза, RGMB, неогенін, BMP2, молекулярний докінг.

***In silico* analysis of the potential heme binding sites in the protein complexes containing human repulsive guidance molecule BMP co-receptor B (RGMB)** **T.V.Barannik, V.V.Shuba**

Both BMP signalling and heme level are involved in the regulation of iron metabolism, development of oxidative stress and inflammation. Free heme accumulation due to hemoproteins destruction results in cells damage and/or signalling modulation. Prediction of potential heme-binding sites in protein receptor complexes containing repulsive guidance molecule BMP co-receptor B (RGMB) was performed by online tools PatchDock and HemeBIND using structural data on RGMB complexes with neogenin (PDB ID 4bq6) and/or BMP2 (PDB ID 4uhz and 4ui2). Molecular docking revealed that natural tetrameric complex of neogenin and its co-receptor RGMB provided several sites for heme binding near interchain contacting areas while heme interaction with monomeric components was less probable. Only few predicted sites contained amino acids capable to form stable bonds with heme (His, Cys or Tyr) but non-specific heme attachment to several chains of the protein complex simultaneously could have short-term conformational effect. Taking into account the proinflammatory action of BMP signalling on endothelium, heme binding to BMP receptor complex can be discussed as non-specific mechanism of vascular pathogenesis under stress-derived heme accumulation.

Key words: heme binding, iron metabolism, RGMB, neogenin, BMP2, molecular docking.

***In silico* анализ потенциальных гем-связывающих сайтов в белковых комплексах, содержащих repulsive guidance molecule BMP co-receptor B (RGMB) человека** **Т.В.Баранник, В.В.Шуба**

BMP signalling и уровень гема задействованы в регуляции метаболизма железа, развития оксидативного стресса и воспаления. Накопление свободного гема вследствие деструкции гемопротеинов ведет к повреждениям клеток и/или модуляции сигналинга. Предсказание потенциальных гем-связывающих сайтов в белковых комплексах, содержащих repulsive guidance molecule BMP co-receptor B (RGMB), было проведено с помощью онлайн программ PatchDock и HemeBIND с использованием данных о структуре RGMB комплексов с неогенином (PDB ID 4bq6) и/или

BMP2 (PDB ID 4uhz и 4ui2). Молекулярный докинг выявил, что природный тетрамерный комплекс неогенина и его корецептора RGMB предоставляет несколько сайтов для связывания гема возле участков контакта цепей, в то время как взаимодействие гема с мономерными компонентами менее вероятно. Только отдельные предсказанные сайты содержали аминокислоты, способные формировать стабильные связи с гемом (His, Cys или Tyr), но неспецифическое прикрепление гема к нескольким цепям комплекса одновременно могло бы оказать кратковременный конформационный эффект. Принимая во внимание провоспалительное действие BMP сигналинга на эндотелий, связывание гема с BMP рецепторным комплексом может обсуждаться как неспецифический механизм сосудистого патогенеза при накоплении гема вследствие стресса.

Ключевые слова: связывание гема, метаболизм железа, RGMB, неогенин, BMP2, молекулярный докинг.

Introduction

Iron balance maintains the normal rate of hemoproteins and iron-sulfur complexes biosynthesis essential for many vitally important functions. The main role in the regulation of iron metabolism in mammals belongs to the BMP/SMAD signalling pathway that adopts gene expression in response to iron levels (Frazer et al., 2012; Siebold et al., 2017). BMP signalling plays important role in regulating vascular oxidative stress and inflammation (Derwall et al., 2012) and is linked to the cardiovascular and muscles pathologies (Cai et al., 2012). So the correction of BMP signalling axis is one of prospective strategies for vascular diseases therapy (Liu et al., 2016). Membrane anchored members of the repulsive guidance molecule (RGM) family interact with neogenin (NEO1) as co-receptors potentiating the BMP pathway (Siebold et al., 2017). Repulsive guidance molecule BMP co-receptor B (RGMB) expression in various tissues suggests its wide functionality as the regulator with undetermined functions (Corradini et al., 2009).

Free heme accumulation under hemoproteins destruction can raise heme concentration in several orders (Chiabrando et al., 2014). Circulating erythrocytes are the main reservoir of heme in mammals so hemolysis-derived heme at intoxications or trauma may be indirectly involved in pathogenesis including cardiovascular disorders (Immenschuh et al., 2017). Non-specific heme binding can lead to damage of cell structures because of heme prooxidant and detergent-like properties (Rother et al., 2005) while heme attachment to sensor proteins is one of the signalling event and heme regulatory motifs (HRM), such as Cys-Pro, have been described in transcription factors, ion channels and enzymes (Mense, Zhang, 2006).

The sequences of RGMB protein and its partner NEO1 also have Cys-Pro motifs, but their heme-binding capacity has not been described yet, so the investigation of heme binding to BMP receptor complex acquires particular relevance. The objective of this study was *in silico* analysis of potential heme-binding sites in the complexes of RGMB with BMP2 protein and/or with neogenin.

Materials and methods

The amino acid (AA) sequences and protein annotations (Table 1) were downloaded from UniProt knowledgebase (<http://www.uniprot.org/>). GPI-anchored glycoprotein RGMB has two binary extracellular interactions: with BMP2 protein that is secreted homodimeric disulfide-linked glycoprotein and neogenin (NEO1) that is transmembrane 1-pass receptor for BMP2.

RGMB is active as homooligomer or as heterotetramer with NEO1 in 2:2 stoichiometry. The data on protein structures of RGMB complexes (Table 2) was downloaded from Protein Data Bank (PDB) knowledgebase (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). All PDB structures used in this study contained the proteins fragments with extracellular location, NEO1 fragments had no cysteines (Table 1). Free online tool HemeBIND (<http://mleg.cse.sc.edu/hemeBIND/>; Liu, Hu, 2011) was used for RGMB sequence and PDB-coordinates analysis for heme-binding propensity of potential HRM (Cys-Pro/ Pro-Cys motifs).

Docking of heme as a ligand to the protein fragments in PDB-structures was carried out by on-line tool PatchDock, Beta 1.3 Version (Schneidman-Duhovny, 2005; <http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/>) with clustering RMSD 1,5 Å as it was recommended for protein-ligand docking. First 20 docking solutions with the highest scores for each target PDB-structure were analyzed for amino acids arranged in close proximity to heme ring. The variants with highest scores and highest number of RGMB residues close to heme but not crossing the heme ring were selected. Among variants with close scores the solutions with heme bound to two or three chains simultaneously were preferred. Selected solution of the previous round was used for the next round of docking. Scoring was based on both geometric fit and atomic desolvation energy (Schneidman-Duhovny et al., 2005).

For analysis of single protein chain the PDB-file was edited for removal of the other components of the complex: RGMB (C/D chains) or NEO1 (A chain) were extracted from 4bq6.pdb; BMP2 (A chain) was taken from 4uhz.pdb. Structure PDB-file for heme molecule was downloaded from PubChem (<http://www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/pdbechem/chemicalCompound/show/HEM>).

Table 1.

Selected UniProt data for the proteins analyzed in the study

Protein name (gene symbol)	UniProt ID	Length	Number of Cys, CP/PC motifs, disulfide bonds, topology
RGMB domain family member B (RGMB)	Q6NW40	437 AA	Total – 17 cysteines; CP motifs: C26 in signal peptide and C316 in CPL motif; 2 disulfides: C139–C226 (PC139) and C163–C312. GPI-linked through asparagine 413.
Neogenin (NEO1)	Q92859	1461 AA, Isoform 1	Total – 13 cysteines: C20 in signal peptide, 4 disulfides in extracellular domain 34–1105: C74–C129, C173–C221, C270–C320 (motif PC with C270), C362–C410. Sequence region 411–1126 has no cysteines. Region 1106–1126 has transmembrane and 1127–1451 – cytosolic location.
Bone morphogenetic protein 2 (BMP2)	P12643	396 AA	Total – 7 cysteines; 6 in intrachain disulfide bonds: C296–C361; C325–C393; C329–C395; (CP motif with C329); C360 in the interchain disulfide. No cysteines in propeptide (24–282), C7 in signal peptide (1–23).

Table 2.

PDB data for the crystal structures of RGMB complexes analyzed in the study: 4bq6 (Bell et al., 2013); 4uhz and 4ui2 (Healey et al., 2015). Method for all three structures: X-ray diffraction

PDB ID (resolution)	Chain (Protein)	Sequence region	Mutations/ ligands
4BQ6 (2,3 Å)	A, B (NEO1)	883-1101 (fibronectin-type III domains 5 and 6)	Ligand: N-acetyl-D-glucosamine
	C, E (RGMB)	50-168 ectodomain	
	D, F (RGMB)	169-410 ectodomain	Mutation: E225G
4UHZ (2,85 Å)	A (BMP2)	283-396 (C-terminal signaling domain)	Ligand: sulfate ion
	B (RGMB)	52-137 (N-terminal domain)	
4UI2 (3,15 Å)	A (NEO1)	883-1101 (fibronectin-type III domains 5 and 6)	Ligands: N-acetyl-D-glucosamine; β -D-mannose
	B (BMP2)	283-396 (C-terminal signaling domain)	Ligands: S,R-mesotartaric acid, acetate ion
	C (RGMB)	50-168 ectodomain	
	D (RGMB)	169-240 ectodomain	Mutation: E225G

Visualization of PDB-structures was carried out by the help of PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3, Schrödinger, LLC); analysis of structures (including the selection of residues within certain distance to ligand or other protein chain) was carried out by SwissProtViewer 4.1.0 (<http://spdbv.vital-it.ch>).

Results and discussion

It was revealed that complex of RGMB and NEO1 fragments (4bq6.pdb) bound heme mostly in the cavities made by partner proteins so that heme contacted with at least two chains simultaneously (Table 3, Fig. 1B). In most variants heme tended to bind RGMB chain near glutamine Q284 in the region with hydrophobic (Val, Leu, Pro) and charged amino acids (Asp, Arg) (Table 3). Only when this site was occupied by other heme molecule the next one bound to NEO1 in polar region with serine S1012 in proximity to heme iron (chain B) or other RGMB chain (docking rounds 2 and 3, Table 3).

Polar AA prevailed in heme-binding sites predicted in RGMB-NEO1 complex (4bq6), but no cysteines were revealed among them (Table 3). More stable heme binding through iron ion is known to be provided by heterocyclic His or aromatic Tyr as well as by Cys residues in certain motifs (Li et al., 2011). But also hydrophobic interactions with porphyrin ring or electrostatic binding through propionate residues with positively charged AA groups are possible. Type of interaction revealed in our study could not provide stable bonds, but might be enough for short-term regulatory effect.

Table 3.
Representative results of heme docking to the fragments of RGMB complex with NEO1 (PDB ID 4bq6, PatchDock). Amino acids most close to heme iron are marked by bold font

Docking round (solution)	Total Score	Contact area	Number of AA in contact	Chain (protein)	Amino acids in heme neighborhood (predicted to be within 6 Å to heme iron)
1 st round (solution 4)	6614	767	14 AA	A (NEO1)	P931, T934, K935, K937
				B (NEO1)	N933
				F (RGMB)	V235, T236, D237, D238, L239, Q284 , V285, G286, R287
2 nd round (solution 5)	6532	836	14 AA	B (NEO1)	K952; S987; K990; P1011; S1012 ; E1013
				D (RGMB)	N214; V235; T236; D237; R287
				F (RGMB)	N233
3 rd round (solution 1)	7314	847	12 AA	B (NEO1)	T934, K935; Y936; K937
				D (RGMB)	D237; D238; L239; R283; Q284 ; V285; G286; R287

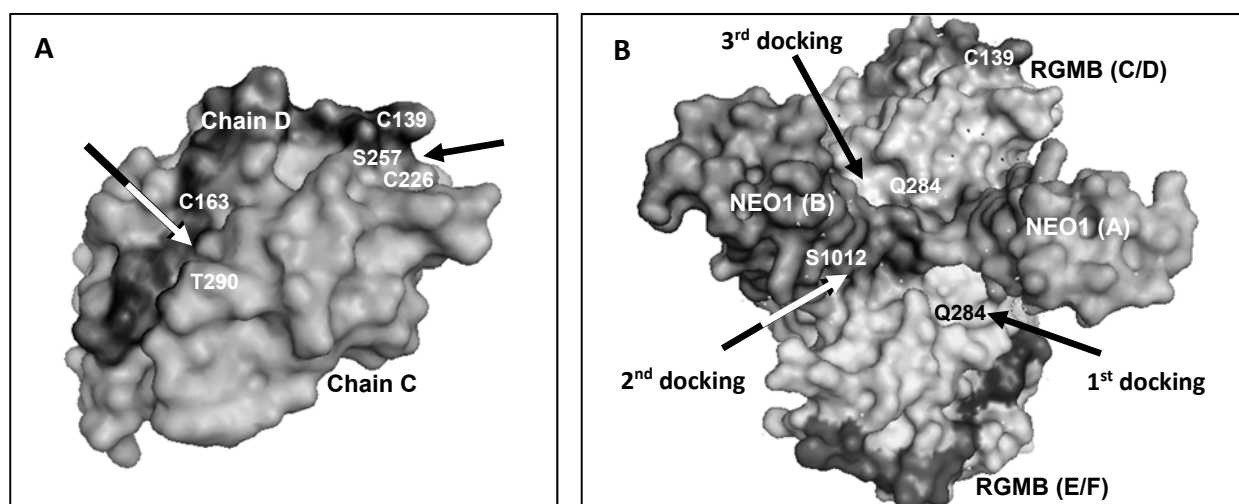


Fig. 1. Surface view (PyMol) of monomeric RGMB fragment (A) and the complex of RGMB with NEO1 (B) with predicted heme binding sites (PatchDock). Arrows show the location of heme docking variants. Chains C/D in the left and right parts of the figure are in the same projection but different scale. Protein chains are shown in parenthesis

The search of heme-binding sites in RGMB protein monomer was performed using the chains C and D (sequence regions 138–168 and 169–321) extracted from 4bq6.pdb (Fig. 1A). Two protein regions were predicted as putative heme-binding sites (Table 4): the first one was near to Tyr268 and disulfide bond between Cys163 and Cys312 with Thr290 or Leu291 most close to Fe ion (solutions N6, N15 and N18) and the second site was arranged near disulfide bond Cys226–Cys139 with Ser257 in the close proximity to Fe (solution N16).

To analyze heme-binding propensity of RGMB Cys-Pro motif HemeBind tool was also applied for protein sequence and structures of C and D chains. HemeBIND uses structural and sequence information

about binding interfaces based on the analysis of heme-protein complexes (Liu, Hu, 2011) while PatchDock algorithm is oriented on molecular shape complementarity (Schneidman-Duhovny et al., 2005). HemeBind predicted mostly hydrophobic (12 of 21 AA) residues as potential heme-binding sites. Chain C fragment with C163 was predicted as heme-binding region by both programs (Table 4). Binding sites predicted by two program tools in the chain D differed and didn't contain free cysteines.

Table 4.

Prediction of potential heme binding sites in RGMB fragment by two program tools.

PatchDock data on two representative sites of heme docking to C/D chains of 4bq6. Amino acids predicted by PatchDock as most close to heme iron are marked by bold font

Program	Amino acids in close proximity to heme
PatchDock	(chain C): P138; C139; N140; C163; L165; F166; (chain D): G225; C226; D254; A255; K256; S257 ; L258; Y268; F281; V282; R283; V285; T290 , L291; A292; I293
HemeBind	(chain C): Y160; F162; C163; L165; F166; G167; (chain D): H170; L171; F174; F178; C181; G185; W187; Q198; V199; V204; A210; T211; M295; L311; C312

In silico analysis of RGMB in the complexes with BMP2 protein (4uhz and 4uk2) revealed neogenin and BMP2 as probable heme targets in the first docking rounds (Table 5). BMP2 was predicted to surround heme molecule by polar environment with glutamic acid in close proximity to iron ion, several cysteines were at short distance of heme but all of them are inside disulfide bonds (Table 1). In dimeric complex (4uhz) RGMB protein was predicted to bind heme only if BMP2 sites were occupied.

Table 5.

Representative results of heme docking to the fragments of RGMB complexes with BMP2 and/or NEO1 (PatchDock)

Docking round (solution)	Total Score	Contact area	Number of AA in contact	Chain (protein)	Amino acids in heme neighborhood (predicted to be within 6 Å to heme iron)
PDB ID 4uhz (BMP2 and RGMB)					
1 st round (solution 4)	5690	776	11 AA	A (BMP2)	K293, S294, S295, C296, H326, G327, E328 , C329, K358, A359, C361
2 nd round (solution 2)	6094	810	7AA	B (RGMB)	A89; T92; Q93; S96; Y105 ; H106; V109
3 rd round (solution 1)	5542	808	11AA	B (RGMB)	R55, K58; C59, C91; T92; Q93; R94; T95 ; S96; K97, A98
PDB ID 4ui2 (BMP2, NEO1 and RGMB)					
1 st round (solution 2)	5740	727	12 AA	A (NEO1) D (RGMB)	P931; I930; K952; P953; T955; P1011; S1012 ; Q1013; A1014; N1015 Q233; V244
2 nd round (solution 6)	5796	748	10 AA	A (NEO1) B (BMP2)	W905; A906; D907, N908; L910, P911, K912, H913 , Q914 D307
3 rd round (solution 5)	5712	790	9 AA	A (NEO1) B (BMP2)	Q914; I916 Y302 ; V303; D304; P318; G319; Y320, H321

Analysis of docking to the tertiary complex (4ui2) revealed BMP2 and neogenin but not RGMB residues in heme iron proximity. Taking into account heme affinity to certain amino acids (Li et al., 2011), His913 of NEO1 or Tyr302 of BMP2 protein (Fig. 2) could provide more prolonged heme binding under accumulation of free heme. These residues are arranged near the contact area of protein chains (Fig. 3) so the oligomeric complex of studied proteins is more preferable heme target than monomeric RGMB. It is worth mentioning that RGMB fragment used for analysis had no big cavities and most AA predicted to contact with heme were not at the protein surface and were not involved in oligomerization.

Comparison of the scoring results for different structures used as heme targets in PatchDock revealed similar scores in the case of monomeric chains and RGMB complexes with BMP and NEO1 containing only one copy of RGMB fragment (Table 6). But RGMB–NEO1 complex with dimeric fragments revealed much higher scores in all three rounds of docking ($p < 0,05$).

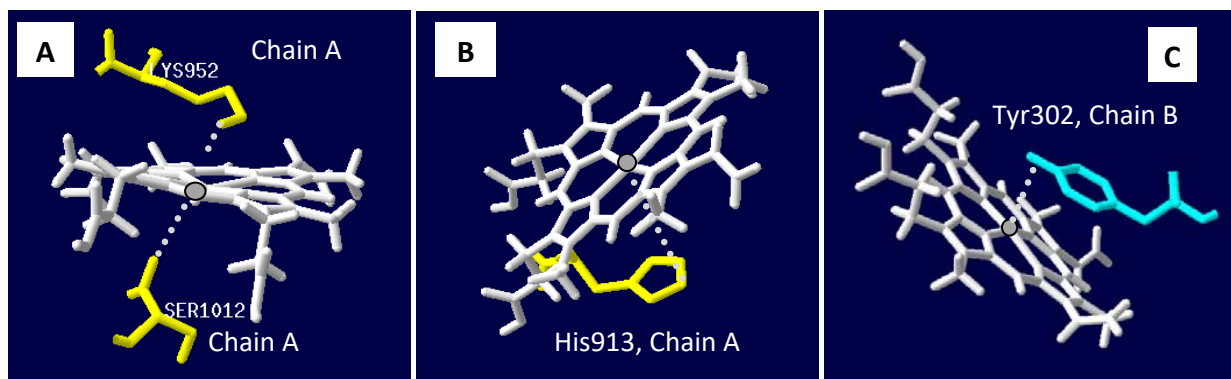


Fig. 2. Amino acids side chains arranged in proximity to heme iron according to 1st (A), 2nd (B) and 3rd (C) rounds of heme docking to 4ui2 (by PatchDock). Chain A – NEO1, chain B – BMP2. Visualization and analysis – SwissPDBViewer. Dots visualize distance between Fe and AA side chain

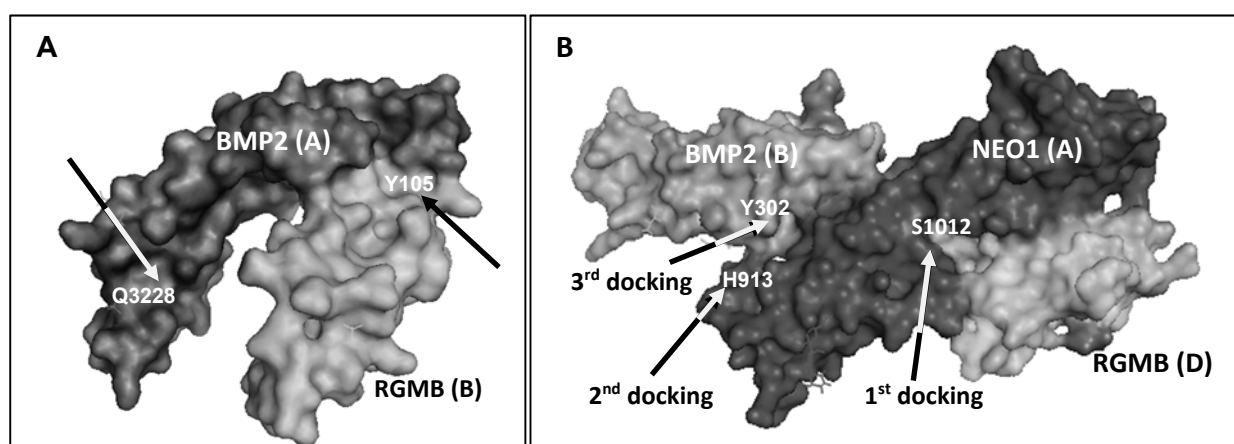


Fig. 3. Surface view in PyMol of (A) RGMB complex with BMP2 (4uhz) and (B) the complex of BMP2, RGMB and NEO1 (4ui2) with predicted heme binding sites (PatchDock). Arrows show the variants of heme docking. Protein chains are shown in parenthesis

Table 6.

Scoring results of heme docking to different target proteins. Mean and standard deviation were calculated by the data for the best 20 solutions for each docking round (PatchDock)

Target	Scores (1 st round)	Scores (2 nd round)	Scores (3 rd round)	Predicted heme targets (chains) with Cys, CP motifs, His or Tyr residues in docking areas
4bq6	6641±138	6534±112	6514±297	NEO1 (B): Y936
4uhz	5668±179	5568±193	5368±108	BMP2 (A): disulfide C296-C361, C329 (CP); H326; RGMB (B): C59, C91, Y105, H106
4ui2	5650±72	5636±68	5615±86	NEO1 (A): H913; BMP2 (B): Y302, Y320, H321
4bq6-CD	5092±124	4762±103	–	RGMB (C, D): C139-C226 (PC139), C163, Y268
4bq6-A	5281±126	–	–	NEO1 (A): Y957
4uhz-A	5274±156	–	–	BMP2 (A): C296-C361, C329 (CP); H326

So molecular docking revealed higher scores for heme binding to the tetrameric complex of neogenin and its co-receptor RGMB near interchain contact areas while heme interaction with monomeric components was less probable. Only few predicted sites contained amino acids capable to form stable bonds with heme (cysteine, histidine or tyrosine), major sites could provide only short-term interaction. Part of AA residues predicted to interact with heme in neogenin and RGMB monomers was found at the surfaces involved in oligomerization so complex formation might be affected under heme accumulation. Non-specific heme attachment simultaneously to several chains of the signalling protein complex also could have short-term conformational effect. Taking into account the proinflammatory action of BMP signalling on endothelial cells (Cai et al., 2012), heme binding to BMP receptor complex can be discussed as non-specific mechanism of vascular pathogenesis under stress-derived heme accumulation.

References

- Bell C.H., Healey E., van Erp S. et al. Structure of the repulsive guidance molecule (RGM)-neogenin signaling hub // *Science*. – 2013. – Vol.5, no. 341 (6141). – P. 77–80.
- Cai J., Pardali E., Sanchez-Duffhues G., ten Dijke P. BMP signaling in vascular diseases // *FEBS Lett.* – 2012. – Vol.586, no. 14. – P. 1993–2002.
- Chiabrando D., Vinchi F., Fiorito V. et al. Heme in pathophysiology: a matter of scavenging, metabolism and trafficking across cell membranes // *Front. Pharmacol.* – 2014. – Vol.5. – Article 61.
- Corradini E., Babitt J.L., Lin H.Y. The RGM/ DRAGON family of BMP co-receptors // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2009. – Vol.20, no. 5–6. – P. 389–398.
- Derwall M., Malhotra R., Lai C.S. et al. Inhibition of bone morphogenetic protein signaling reduces vascular calcification and atherosclerosis // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2012. – Vol.32, no. 3. – P. 613–622.
- Healey E.G., Bishop B., Elegheert J. et al. Repulsive guidance molecule is a structural bridge between neogenin and bone morphogenetic protein // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2015. – Vol.22, no. 6. – P. 458–465.
- Frazer D.M., Wilkins S.J., Darshan D. et al. Stimulated erythropoiesis with secondary iron loading leads to a decrease in hepcidin despite an increase in bone morphogenetic protein 6 expression // *Br. J. Haematol.* – 2012. – Vol.157, no. 5. – P. 615–626.
- Immenschuh S., Vijayan V., Janciauskiene S., Gueler F. Heme as a target for therapeutic interventions // *Front Pharmacol.* – 2017. – Vol.8. – Article 146.
- Li T., Bonkovsky H.L., Guo J.T. Structural analysis of heme proteins: implications for design and prediction // *BMC Struct Biol.* – 2011. – Vol.11. – P.13.
- Liu J., Sun B., Yin H., Liu S. Hepcidin: a promising therapeutic target for iron disorders: a systematic review // *Medicine (Baltimore)*. – 2016. – Vol.95, no. 14. – P.e3150.
- Liu R., Hu J. HemeBIND: a novel method for heme binding residue prediction by combining structural and sequence information // *BMC Bioinformatics*. – 2011. – Vol.12. – P.207.
- Mense S.M., Zhang L. Heme: a versatile signaling molecule controlling the activities of diverse regulators ranging from transcription factors to MAP kinases // *Cell Res.* – 2006. – Vol.16, no. 8. – P. 681–692.
- Rother R.P., Bell L., Hillmen P., Gladwin M.T. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease // *JAMA*. – 2005. – Vol.293, no. 13. – P. 1653–1662.
- Schneidman-Duhovny D., Inbar Y., Nussinov R., Wolfson H.J. PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking // *Nucl. Acids. Res.* – 2005. – Vol.33. – P. W363–W367.
- Siebold C., Yamashita T., Monnier P.P. et al. RGMs: structural insights, molecular regulation, and downstream signaling // *Trends Cell Biol.* – 2017. – Vol.27, no. 5. – P. 365–378.

Представлено: Н.І.Горбенко / Presented by: N.I.Gorbenko

Рецензент: І.В.Нікітченко / Reviewer: I.V.Nikitchenko

Подано до редакції / Received: 09.10.2017

УДК: 576:314:577.1:57.08

Рівень інтенсивності процесів переокиснення ліпідів і окиснювальної модифікації білків у мембранних фракціях клітин *Escherichia coli* як біомаркер тестування біосумісності наночастинок металів
М.Є.Романько

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»
(Харків, Україна)
marina_biochem@ukr.net

Метою нашої роботи було визначення інтенсивності переокисного окиснення ліпідів (ПОЛ) за рівнем утворення його продуктів – дієнових кон'югатів і малонового діальдегіду та окиснювальної модифікації білків (ОМБ) – за рівнем утворення карбоксильних похідних нейтрального і основного характеру у ізольованих мембранних фракціях клітин *Escherichia coli* виробничих штамів за умов преінкубації з наночастинами Ауруму та Аргентуму (NPAu та NPAg) в розмірному діапазоні. Встановлено, що дослідні зразки NPAu і NPAg середнього розміру ~30 нм за дії на мембранні фракції клітин *E. coli* усіх дослідних штамів (за винятком штаму 57) сприяють уповільненню та/або утриманню на фізіологічному рівні інтенсивність процесів окиснення ліпідів та окисної деструкції білків, що супроводжується втручанням реакцій антиокиснювальної системи (АОС) за підвищенням рівня показника загальної антиокиснювальної активності (АОА) та змінами активності каталази ($p \leq 0,05$) та дозволяє стверджувати про мембранотропні властивості таких NPMe; використання їх надає можливість створити новий засіб управління структурно-функціональним станом бактеріальних клітин. У випадку контактної взаємодії NPAu середнього розміру ~20 і ~45 нм та NPAg середнього розміру ~30 нм з сумарними мембранними фракціями клітин штаму 57 реєстрували посилення інтенсивності процесів ПОЛ і ОМБ, а за взаємодії NPAu розміру ~20 нм з клітинами штаму 20 – лише процесів ОМБ відповідно, що вказує на прооксидантну і мембранотоксичну дію таких NPMe саме у цих розмірах. Тобто, у випадку активації ліпопероксидації за дії NPAu окисний стрес може мати сигнальний характер, а у випадку інтенсифікації процесів ОМБ на фоні фізіологічного рівня активності ПОЛ за дії NPAg – руйнівний характер відповідно. Слід зазначити також, що важливим аспектом з'ясування впливу наночастинок металів на систему АОС є встановлення залежності її реакції від вихідного редокс-статусу саме клітини. Таким чином, потенційна небезпечність дослідних NPMe носить залежний від їх дискретного розміру характер та є індивідуальною для різних штамів у межах одного таксономічного виду мікроорганізмів, з іншого боку – конкретні механізми біосумісності або цитотоксичної дії NPMe виокремити складно, бо вони можуть сильно відрізнятися навіть у межах одного класу наноматеріалів, тому це питання поки ще має дискусійний характер.

Ключові слова: наночастинки металів, бактеріальна клітина, сумарні мембранні фракції, переокисне окиснення ліпідів, окиснювальна модифікація білків, антиокиснювальна система.

Level of intensity of lipid peroxidation and oxidizing modification of proteins process in membranic fractions of *Escherichia coli* cells as a biomarker of metals nanoparticles biocompatibility testing
M.Ye.Roman'ko

The purpose of our work was to determine the intensity of lipid peroxidation (LPO) by the level of formation of its products – diene conjugates and malonic dialdehyde and oxidation modification of proteins (OMB) – by the level of formation of neutral and basic carboxylic derivatives in isolated total membrane fraction (TMF) of *Escherichia coli* cells of production strains under preincubation conditions with nanoparticles of Aurum and Argentum (NPAu and NPAg) in the size range. It has been determined that experimental samples of NPAu and NPAg of an average size of ~30 nm can be considered as the most biocompatible for the restoration and/or normalization of the intensity of the LPO and OMB processes in the membrane fractions of *E. coli* cells of production strains indicating their membranotropic properties; the use of them provides the opportunity to create a new means of managing the structural and functional state of bacterial cells. In the case of contact interaction of NPAu of an average size of ~20 and ~45 nm and NPAg of an average size of ~30 nm with TMF of cells of strain 57 an increase was recorded in the intensity of the LPO and OMB processes, and at interaction of NPAu of a size of ~20 nm with cells of the strain 20 – OMB processes, respectively, indicating the prooxidant and membranotoxic effects of such NPMs of these sizes. That is, in the case of the lipoperoxidation activation at the action of NPAu oxidative stress can be signaling and in the case of

intensification of OMB processes at the physiological level of LPO activity and at NPAg action – destructive. It should also be noted that an important aspect of clarifying the influence of nanoparticles of metals on antioxidant system (AOS) is to determine the dependence of its reaction on the original redox status of the cell itself. That is, the potential danger of experimental NPMs is dependent on their discrete sizes and is individual for different strains within a single taxonomic type of microorganism; on the other hand, the specific mechanisms of biocompatibility or cytotoxic action of NPMs are difficult to distinguish because they can vary greatly even within the same class of nanomaterials, so this question is still debatable.

Key words: *nanoparticles of metals, bacterial cell, total membrane fractions, lipid peroxidation, oxidation modification of proteins, antioxidant system.*

Уровень интенсивности процессов переокисления липидов и окислительной модификации белков в мембранных фракциях клеток *Escherichia coli* как биомаркер тестирования биосовместимости наночастиц металлов
М.Е.Романько

Целью нашей работы было определение интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) по уровню образования его продуктов – диеновых конъюгатов и малонового диальдегида и окислительной модификации белков (ОМБ) – по урону образования карбоксильных производных нейтрального и основного характера в изолированных мембранных фракциях клеток *Escherichia coli* производственных штаммов в условиях преинкубации с наночастицами Аурума и Аргентума (NPAu и NPAg) в размерном диапазоне. Установлено, что опытные образцы NPAu и NPAg среднего размера ~30 нм при воздействии на мембранные фракции клеток *E. coli* всех штаммов (за исключением штамма 57) способствуют снижению и/или удержанию на физиологическом уровне интенсивности процессов ПОЛ и ОМБ, что сопровождается участием реакций антиокислительной системы (АОС) – увеличением уровня показателя общей антиокислительной активности (АОА) и изменением активности каталазы ($p \leq 0,05$), и позволяет утверждать о мембранотропных свойствах таких NPMе; использование их предоставит возможность создания нового способа управления структурно-функциональным состоянием бактериальных клеток. В случае контактного взаимодействия NPAu среднего размера ~20 и ~45 нм и NPAg размера ~30 нм с суммарными мембранными фракциями клеток штамма 57 регистрировали усиление интенсивности процессов ПОЛ и ОМБ, а при взаимодействии NPAu размером ~20 нм с клетками штамма 20 – только процессов ОМБ соответственно, что указывает на проокислительное и мембранотоксическое действие таких NPMе именно этих размеров. Поэтому в случае активации липопероксидации при воздействии NPAu окислительный стресс может носить сигнальный характер, а в случае интенсификации процессов ОМБ на фоне физиологического уровня активности ПОЛ при воздействии NPAg – разрушительный характер соответственно. Следует отметить также, что важным аспектом изучения влияния наночастиц металлов на систему АОС может быть определение зависимости ее реакций от исходного редокс-статуса клетки. Таким образом, потенциальная небезопасность опытных NPMе носит зависимый от их дискретного размера характер и индивидуальна для различных штаммов в пределах одного таксономического вида микроорганизмов, с другой стороны – конкретные механизмы биосовместимости или цитотоксического действия NPMе установить сложно, так как они могут значительно отличаться в пределах даже одного класса наноматериалов, поэтому эти вопросы пока носят дискуссионный характер.

Ключевые слова: *наночастицы металлов, бактериальная клетка, суммарные мембранные фракции, перекисное окисление липидов, окислительная модификация белков, антиокислительная система.*

Вступ

Стрімкий розвиток сучасних технологій синтезу наноматеріалів різноманітної природи дозволив значно розширити межі їх застосування у різних галузях промисловості та медицини (West, Halas, 2000; Sahoo et al., 2007; Chen et al., 2008; Wawa, 2008; Абрамов и др., 2011; Стойка, 2017), створилися умови для більш тісного контакту продуктів нанобіотехнологій з живим організмом та зовнішнім середовищем. Проте доволі активне використання наноматеріалів у різних галузях господарювання, на жаль, не супроводжується системними ґрунтовними дослідженнями їх побічної (небажаної, ушкоджуючої, токсичної) дії. Питання біологічної безпеки наноматеріалів неоднозначне, багатогранне та вимагає комплексного науково-обґрунтованого підходу (Oberdorster et al., 2005; Чекман та ін., 2009, 2012). Політика Європейського Союзу (ISO/TC 229

«Нанотехнологія») в цієї галузі може бути сконцентрована у формулу: «Комплексний, безпечний та відповідальний підхід», тобто впровадженню продуктів нанобіотехнологій та масованим рекламним компаніям стосовно їх ефективності повинні передувати наукові дослідження з метою оцінки можливих медико-санітарних чи екологічних ризиків при їх застосуванні, а науковий супровід у цьому напрямку безперечно необхідний.

Відомі наукові роботи присвячені уявленню цитотоксичної дії наночастинок взагалі на рівні культур клітин або стосовно інших видів – карбонових нанотрубок, фулеренів, модифікованих наноалмазів (Shvedova et al., 2004; Oberdorster et al., 2005; Weyermann et al., 2005; Chen et al., 2006; Garçon et al., 2006; Powers, Brown, 2006; Lynch et al., 2007), її залежності від концентрації, розміру, шляхів і тривалості введення (Ершов, 2001; Чекман та ін., 2009, 2012).

Наночастинки металів (NPMe) посідають основне місце серед наноматеріалів та мають високий комерційний потенціал з перспективами широкомасштабного застосування. У експериментах *in vivo* та *in vitro* доведено, що цитотоксичність NPMe зумовлена гено- і мутагенними ефектами (Shvedova et al., 2004; Jia et al., 2005; Brunner et al., 2006), але не зовсім переконливо розмежований та інтерпретований характер токсичних ефектів і біосумісність NPMe, не вистачає ґрунтовного вивчення біохімічних механізмів з'ясування їх природи.

Одним із визначальних біохімічних механізмів дії факторів ризику агресивних агентів докілья є порушення рівноваги між інтенсивністю процесів окиснення структурних компонентів клітинних мембран – ліпідів і білків та їх антиоксидантною регуляцією (Beker et al., 1985; Феофилова, 1993; Sherman et al., 1995; Харчук, 2005), з іншого боку, ціла низка авторів вважає (Li et al., 2003; Yamakoshi et al., 2003; Garçon et al., 2006), що механізми цитотоксичних ефектів наноматеріалів різного походження пов'язані з формуванням окиснювального стресу та накопиченням токсичних продуктів ліпопероксидації.

Відомо, що цитоплазматична мембрана будь-якої клітини ушкоджується у першу чергу, так як вона слугує бар'єром між поза- та внутрішньоклітинним оточенням, що забезпечує селективний транспорт речовин (Іваница, Рахімова, 2002; Беленічев та ін., 2002; Харчук, 2005; Oberdorster et al., 2005). Активні метаболіти кисню (АМК), утворені у клітині, у великих концентраціях можуть модифікувати макромолекули та приводить до її деструктивних змін, а в низьких – їм властиво виконувати сигнальні функції. Тому, навіть відносно невеликі кількості АМК будуть стартовим чинником запуску механізмів окиснення білків і ліпідів, впливати на експресію генів та репараційні, метаболічні і біосинтетичні процеси (Дубинина, 2001; Зенков и др., 2001; Турпаев, 2002).

З'ясування механізмів взаємодії NPMe з клітинними мембранами дозволить розширити фундаментальні знання стосовно їх потенційної цитотоксичної дії або біосумісності для клітин різного рівня організації, а також прикладні аспекти, пов'язані з їх використанням у сучасних біотехнологіях. Прокаріотичні клітини, завдяки унікальним структурним властивостям та обміну речовин здатні активно контактувати з металами та можуть бути модельною системою для вивчення взаємовідносин між клітиною і NPMe.

У зв'язку з вищесказаним, метою нашої роботи було визначення інтенсивності перекисного окиснення ліпідів та окиснювальної модифікації білків у ізольованих мембранних фракціях клітин *Escherichia coli* виробничих штамів за умов преінкубації з наночастинами Ауруму та Арґентуму в розмірному діапазоні.

Об'єкти та методи дослідження

В роботі використовували періодичні культури клітин *Escherichia coli* виробничих штамів 57, 25, 24 і 20, які підтримуються та зберігаються у ліофілізованому вигляді в Депозитарії Національного центру штамів мікроорганізмів Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (Київ, Україна).

Біомасу культур клітин *E. coli* дослідних штамів накопичували на стандартних поживних середовищах (МПА, МПБ) за температури $37\pm 1^\circ\text{C}$ впродовж 24 год. з подальшим концентруванням до $20,0\text{--}30,0$ млрд мк.кл./см³, змиванням клітин стерильним фізіологічним розчином NaCl (рН 7,0–7,2) та виділенням препаратів сумарних мембранних фракцій (СМФ) відповідно.

Колоїдні дисперсії NPMe синтезували за оригінальним протоколом в Інституті біологічної хімії ім. Ф.Д.Овчаренка НАН України за методом хімічної конденсації шляхом відновлення відповідних солей металів у водному середовищі (Перцов, 1976), який дозволяє отримувати стійкі водні дисперсії наночастинок певного розміру.

Середній розмір NPMе обчислювали за використання методу лазерно-кореляційної спектроскопії (ЛКС) («Zetasizer-3»; «Malvern Instruments Ltd», Великобританія) (Rawle, 1993). Візуалізацію зображень NPMе проводили за методом трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ) («JEM-1230», «JEOL», Японія).

В роботі було використано наночастинки Ауруму (NPAu) із середнім розміром ~20 нм, ~30 нм і ~45 нм та наночастинки Аргентуму (NPAg) із розміром ~30 нм з вихідною концентрацією в колоїдній дисперсії золю 38,6 мкг/см³ та 86,4 мкг/см³ за металом відповідно.

Препарати сумарних мембранних фракцій бактеріальних клітин одержували методом диференційного центрифугування (Трахтенберг та ін., 2013): клітини змивали з поверхні чашок середовищем А наступного складу: 0,25 М сахароза, 25 мМ Трис-НСІ, 2 мМ ЕДТА (рН 7,4). Ресуспендування клітин проводили у середовищі А, суспензію обробляли ультразвуком із охолодженням впродовж 3 хв (6•30 сек) (дезінтегратор УЗДН-1, 22 кГц, сила анодного струму 0,4–0,7 А, резонансні умови); осаджування СМФ проводили шляхом центрифугування при 10000 об/хв. протягом 15 хв. з подальшим ресуспендуванням осаду (СМФ) в середовищі зберігання Б наступного складу: 20 мМ Трис-НСІ, 3 мМ MgCl₂ (рН 7,4).

Препарати СМФ характеризували за вмістом білка методом О.Н. Lowry et al. (Miller, 1959) та зберігали за температури мінус 20,0±1,0°C; повторного заморожування не допускали. Як стандартний білок для побудови калібрувальної кривої використовували бичачий сироватковий альбумін (BSA).

Дослідження рівня біохімічних показників проводили у СМФ бактеріальних клітин (у кінцевій кількості білка 150–200 мкг/см³) за умов преінкубації з дослідними зразками NPAu і NPAg (у кінцевій концентрації 1,16 і 2,59 мкг/см³ за металом відповідно) впродовж 3 хв. за температури 37±1°C у порівнянні з їх рівнем у інтактних клітин («контроль»).

У «контрольну» пробу замість NPMе додавали 20 мМ Трис-НСІ буфер.

У ізольованих СМФ бактеріальних клітин досліджували інтенсивність процесів ПОЛ за визначенням концентрації його продуктів: первинних – дієнових кон'югатів (ДК) і кінцевих – малонового діальдегіду (МДА) – у гептан-ізопропанольних екстрактах (1:1), як описано в роботі (Гаврилов, Мишкорудная, 1985). Спектр поглинання кон'югованих дієнових структур і малонового діальдегіду реєстрували спектрофотометрично («SHIMADZU UV – 1800», Японія) за довжини хвиль 233 нм і 247 нм відповідно. Розрахунок вмісту ДК проводили, приймаючи молярний коефіцієнт Е рівним 2,2•10⁵ мкмоль, та виражали у мкмоль/дм³. Значення рівня МДА виражали у одиницях питомого поглинання у 1,0 см³.

Інтенсивність ОМБ у СМФ бактеріальних клітин оцінювали за визначенням рівня утворення карбоксильних похідних нейтрального (НХ) і основного характеру (ОХ) за методикою (Арчаков, Михосоев, 1998), яка ґрунтується на здатності радикальних залишків аліфатичних амінокислот утворювати альдегідні й кетонні групи та 2,4-динітрофенілгідрозони. Карбонільні похідні НХ і ОХ мають спектр поглинання за довжини хвиль 370 нм та 430 нм відповідно. Розрахунок проводили, приймаючи значення молярного коефіцієнту Е фенілгідрозонів рівним 2,1•10⁴ М⁻¹см⁻¹, та виражали у ммоль/г білка за 1 год.

Стан показників АОС оцінювали за активністю каталази (КФ 1.11.1.6) за методом з використанням Н₂О₂ (Королук, 1988), який здатний утворювати з амонію молібдатом стійкий забарвлений комплекс у середовищі, яке містить 0,04412 N розчин Н₂О₂, 0,01 N розчин КН₂РО₄, 0,1 М Трис-НСІ буфер (рН 7,4), 4,5% розчин амонію молібденовокислого, за температури 37,0±1,0°C, та який має спектр поглинання за довжини хвилі 410 нм. Розрахунок активності каталази проводили, приймаючи коефіцієнт оптичної густини Н₂О₂ рівним 22,2•10⁶, та виражали у мкмоль Н₂О₂/дм³ за 1 хв.

Рівень показника загальної АOA ліпідів, екстрагованих із СМФ бактеріальних клітин визначали, як описано в роботі (Клебанов и др., 1988), за ступенем їх здатності гальмувати накопичення ТБК-активних продуктів пероксидації з використанням модельної системи суспензії жовткових ліпопротеїдів, яка є стабільною у фосфатному буфері (рН 7,45) впродовж 14 діб за температури мінус 20,0±1,0°C та піддається швидкому окисненню за умов індукції 25 мМ розчином заліза сірчаноокислого у 0,002 N розчині НСІ. Комплекс ТБК-активних продуктів має спектр поглинання за довжини хвилі 535 нм. Рівень показника загальної АOA виражали у % інгібіції накопичення ТБК-активних продуктів пероксидації.

Статистичний аналіз результатів проводили за допомогою пакета прикладних програм

Microsoft Excel 2003 (for Windows XP) з використанням t-критерію Стюдента ($p < 0,05$). Для одержання статистично вірогідних результатів під час виконання досліджень на ізолюваних СМФ бактеріальних клітин визначення зазначених параметрів проводили у 5-кратній повторності з 3 паралельними пробами зразків.

Результати та обговорення

З метою оцінювання впливу NPMе на ізолювані СМФ клітин *E. coli* було синтезовано зразки NPAu середнього розміру ~ 20 нм, ~ 30 нм і ~ 45 нм та і NPAg розміром ~ 30 нм.

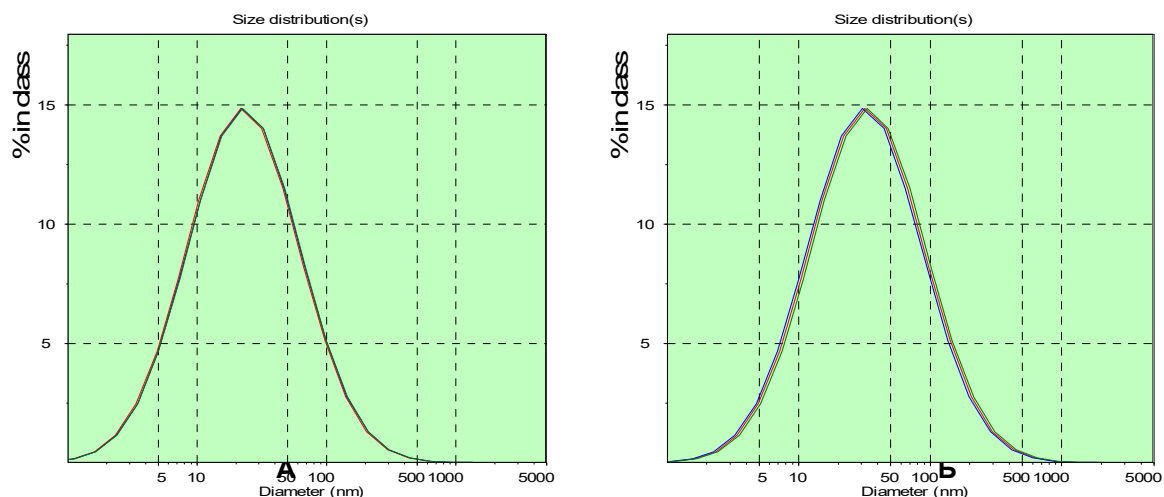


Рис. 1. Розподіл NPAu середнього розміру ~ 20 нм ($21,80 \pm 0,23$) нм (А) і ~ 30 нм ($32,80 \pm 1,30$) нм (Б) за гідродинамічним діаметром (дані ЛКС; «Malvern Instruments Ltd», Великобританія)

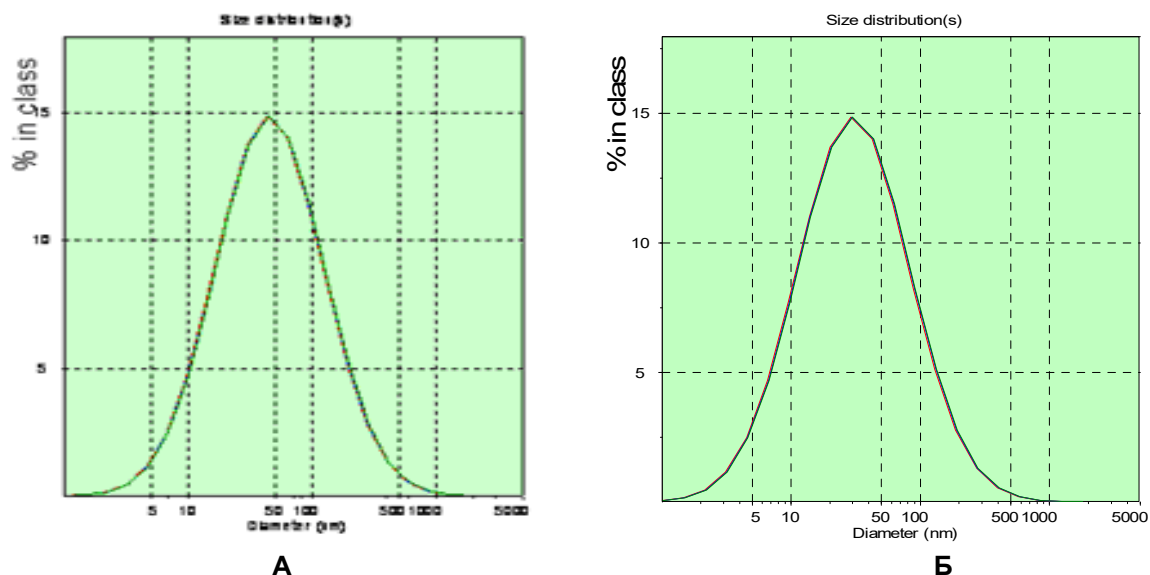


Рис. 2. Розподіл NPAu середнього розміру ~ 45 нм ($45,20 \pm 0,40$) нм (А) і NPAg розміру ~ 30 нм ($30,40 \pm 0,50$) нм (Б) за гідродинамічним діаметром (дані ЛКС; «Malvern Instruments Ltd», Великобританія)

На рис. 1 і 2 наведено типові зображення розподілу дослідних NPAu і NPAg відповідно певного розміру за їх гідродинамічним діаметром. У випадку монодисперсних систем метод ЛКС дозволяє з високою точністю визначити константи швидкості дифузії частинок, а також обчислити їх гідродинамічний діаметр, виходячи з припущення щодо сферичної геометрії цих частинок (Rawle, 1993).

Розмір та геометрію отриманих препаратів NPMe також встановлювали за використання методу трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ). На рис. 3 наведено типові електронно-мікроскопічні зображення дослідних зразків NPAu і NPAg.

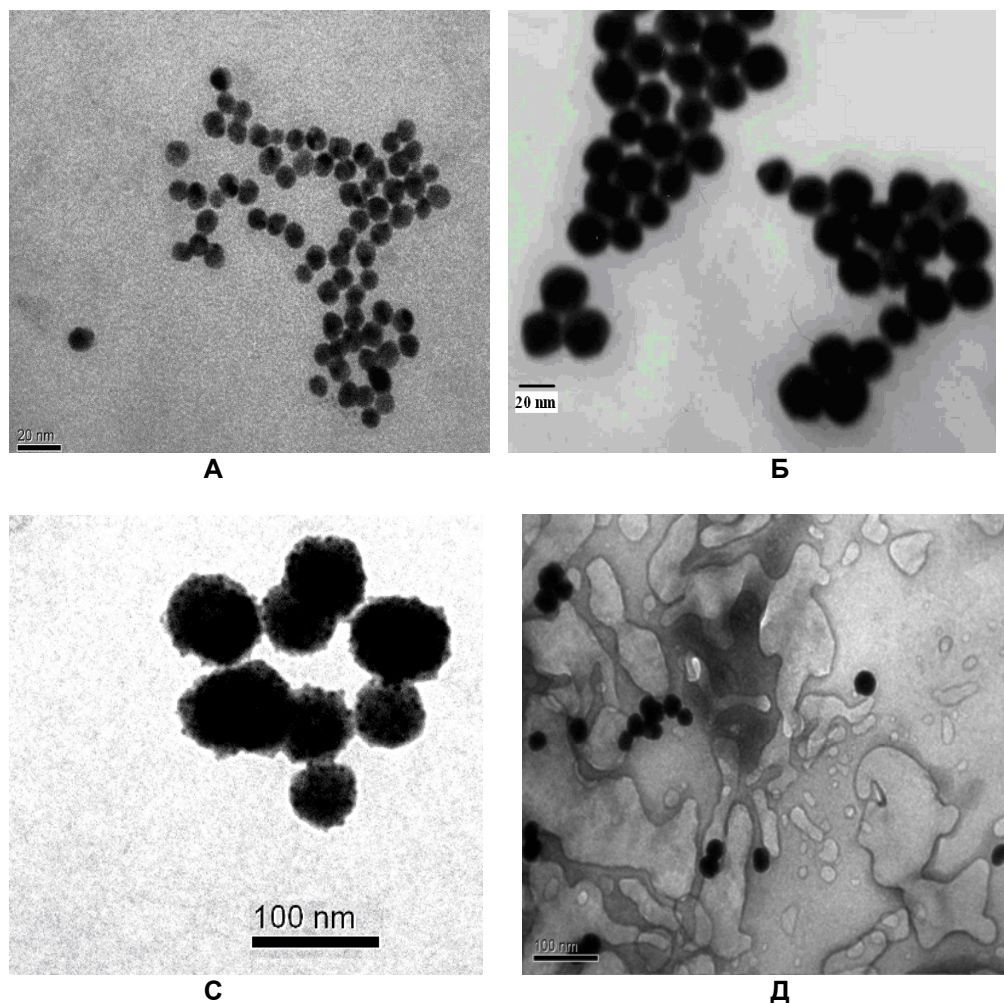


Рис. 3. Дослідні зразки NPAu середнього розміру ~20 нм (А), ~30 нм (Б) і ~45 нм (С) та NPAg розміру ~30 нм (Д) (дані TEM; JEM-1230, «JEOL», Японія; величина збільшення $\times 14\,000$)

Таким чином, використані методи ЛКС і TEM дозволили надати характеристику дискретного розміру та сферичної геометрії дослідних зразків NPMe, які були нами використані у подальших дослідженнях по контактній взаємодії з ізолюваними препаратами СМФ клітин *E. coli* різних штамів.

Дослідження рівня інтенсивності окиснювальних процесів у ізолюваних СМФ клітин *E. coli* дослідних штамів свідчать, що за рівнем утворення продуктів ліпопероксидації – ДК і МДА – більш інтенсивнішою активністю ПОЛ відрізняються мембрани клітин штаму 25 (табл. 1), а за рівнем карбоксильних похідних НХ і ОХ – більш виражені процеси ОМБ у мембранах клітин штамів 25 і 20 відповідно (табл. 2).

Таблиця 1.
Інтенсивність процесів ПОЛ у інтактних СМФ клітин *E. coli* дослідних штамів («контроль») та за умов преінкубації з NPAu і NPAg у розмірному діапазоні ($M \pm m$; $n=5$)

Вміст продуктів ПОЛ у СМФ клітин	Умови інкубації				
	Інтактні СМФ («контроль»)	За умов взаємодії з NPMe, середній розмір			
		NPAu, ~20 нм	NPAu ~30 нм	NPAu ~45 нм	NPAg ~30 нм
<i>E. coli</i> штаму 57					
ДК, мкмоль/дм ³	31,00±0,50	34,22±0,90*	33,20±1,90	79,80±2,50*	61,80±4,05*
МДА, ΔD	4,80±0,20	6,40±0,30*	4,96±0,35	10,20±1,00*	9,12±0,45*
<i>E. coli</i> штаму 25					
ДК, мкмоль/дм ³	54,40±1,45	20,80±2,03*	10,80±0,9*	13,00±1,41*	20,80±3,00*
МДА, ΔD	7,20±0,52	2,00±0,12*	0,60±0,02*	1,44±0,10*	1,66±0,25*
<i>E. coli</i> штаму 24					
ДК, мкмоль/дм ³	23,60±2,70	24,60±1,20	26,60±2,00	24,60±0,90	26,60±2,50
МДА, ΔD	3,20±0,09	3,40±0,20	3,60±0,48	3,40±0,08	3,60±0,08
<i>E. coli</i> штаму 20					
ДК, мкмоль/дм ³	30,80±2,05	31,21±3,03	26,40±1,21*	29,80±1,50	26,43±1,22*
МДА, ΔD	4,40±0,25	4,40±0,30	3,60±0,30*	4,00±0,32	3,80±0,06*

Примітка. У цієї та наступних табл.: * – різниця значень показника вірогідна при $p \leq 0,05$ відносно значень такого показника у інтактних СМФ клітин *E. coli* відповідних штамів («контроль»).

Таблиця 2.
Інтенсивність процесів ОМБ у інтактних СМФ клітин *E. coli* дослідних штамів («контроль») та за умов преінкубації з NPAu і NPAg у розмірному діапазоні ($M \pm m$; $n=5$)

Вміст карбоксильних похідних у СМФ клітин	Умови інкубації				
	Інтактні СМФ («контроль»)	За умов взаємодії з NPMe, середній розмір			
		NPAu ~20 нм	NPAu ~30 нм	NPAu ~45 нм	NPAg ~30 нм
<i>E. coli</i> штаму 57					
НХ, ммоль/г білка/год.	2,12±0,05	2,61±0,07*	1,93±0,01	2,81±0,05*	1,44±0,01*
ОХ, ммоль/г білка/год.	1,06±0,02	1,52±0,03*	0,92±0,01*	1,48±0,03*	0,98±0,01
<i>E. coli</i> штаму 25					
НХ, ммоль/г білка/год.	4,17±0,20	3,04±0,05*	4,12±0,50	4,40±0,41	1,38±0,01*
ОХ, ммоль/г білка/год.	2,98±0,12	1,94±0,11*	2,82±0,52	2,10±0,15*	0,92±0,01*
<i>E. coli</i> штаму 24					
НХ, ммоль/г білка/год.	1,30±0,18	0,86±0,04*	0,91±0,06*	0,37±0,01*	0,60±0,02*
ОХ, ммоль/г білка/год.	0,80±0,01	0,44±0,02*	0,61±0,03*	0,30±0,01*	0,36±0,01*
<i>E. coli</i> штаму 20					
НХ, ммоль/г білка/год.	3,20±0,08	3,88±0,15*	1,19±0,02*	1,06±0,04*	1,37±0,09*
ОХ, ммоль/г білка/год.	1,43±0,04	1,65±0,07*	0,55±0,01*	0,53±0,01*	0,71±0,04*

Аналіз характеру впливу NPAu і NPAg на інтенсивність процесів ПОЛ за умов преінкубації з ізольованими СМФ клітин *E. coli* дослідних штамів дозволив виявити певні дискретні значення розмірів дослідних зразків NPMe (табл. 1).

Так, встановлено, що за преінкубації NPAu середнього розміру ~20 нм і ~45нм та NPAg ~30 нм з СМФ клітин *E. coli* штаму 57 встановлено підвищення рівня ДК і МДА, що у середньому

складало 10,3 і 33,3%, 157,4 і 112,5% та 99,4 і 90,0% ($p \leq 0,05$) відносно значень показників для інтактних СМФ клітин («контроль»).

У препаратах ізольованих СМФ клітин *E. coli* штамів 25 і 20, навпаки, визначали уповільнення утворення продуктів ПОЛ під впливом дослідних зразків NPMе.

Так, зниження вмісту ДК і МДА реєстрували в СМФ клітин штаму 25 за преінкубації з наночастинками обох металів у всьому вивченому розмірному діапазоні, що складало в середньому 3,6 і 6,3 рази ($p \leq 0,05$) відповідно відносно значень таких показників для інтактних СМФ клітин («контроль»). Зниження вмісту ДК і МДА визначали в СМФ *E. coli* штаму 20 лише за умов контактної взаємодії з NPAu та NPAg середнього розміру ~30 нм, відсоток якого складав у середньому 14,3% і 18,2% та 14,2% і 13,6% відповідно ($p \leq 0,05$), відносно значень цих показників у «контрольній» пробі.

Встановлено, що за умов преінкубації зразків наночастинок металів обох видів з СМФ клітин *E. coli* штаму 24 у вивченому розмірному діапазоні не встановлювали статистичних змін рівня показників ДК і МДА відносно таких у «контрольній» пробі.

Результати визначення інтенсивності процесів ОМБ у ізольованих СМФ клітин *E. coli* дослідних штамів за умов преінкубації з дослідними зразками NPMе в розмірному діапазоні наведені у табл. 2. З отриманих даних виявляється, що рівень утворення карбоксильних похідних нейтрального і основного характеру залежить від дискретного розміру дослідних зразків NPMе.

Так, за преінкубації NPAu середнього розміру ~20 нм та ~45 нм з СМФ клітин штаму 57 встановлено збільшення рівня НХ і ОХ у середньому на 23,1% і 43,4% та на 32,6% і 39,6% ($p \leq 0,05$), а за впливу NPAu та NPAg розміром ~30 нм, навпаки, зниження їх рівня на 9,0% і 13,2% ($p \leq 0,05$) та на 32,1% ($p \leq 0,05$) і 7,5% відповідно відносно значень показників карбоксильних похідних у інтактних СМФ клітин цього штаму («контроль»).

У СМФ клітин штамів 25, 24 і 20 за умов контактної взаємодії з NPMе обох видів у цілому визначено гальмування інтенсивності процесів ОМБ за зниженням рівня значень їх похідних. Так, за впливу NPAu і NPAg зниження рівня похідних НХ у СМФ клітин цих штамів варіювало в межах 1,37–3,01 і 2,20–3,02 рази, а ОХ – у межах 1,30–2,70 і 2,01–3,24 рази ($p \leq 0,05$) відповідно.

Виняток складає відсутність вірогідних змін рівня утворення карбоксильних похідних у СМФ клітин штаму 25 за взаємодії з NPAu середнього розміру ~30 нм і ~45 нм, тобто процеси ОМБ за інтенсивністю наближались до таких у інтактних СМФ клітин цього штаму («контроль»).

Встановлено, що за умов контактної взаємодії NPAu середнього розміру ~20 нм з СМФ клітин штаму 57 і 20 реєстрували підвищення вмісту похідних НХ та ОХ у середньому на 23,1% і 21,3% та на 43,4% і 15,4% ($p \leq 0,05$) відносно значень показників у «контрольних» пробах. Також за умов впливу NPAu середнього розміру ~45 нм у СМФ клітин штаму 57 реєстрували накопичення вмісту НХ і ОХ, збільшення значень яких дорівнювало в середньому 32,5% і 39,6% відповідно відносно «контрольних» значень показників.

На рис. 4 наведені результати визначення показників, що характеризують стан АОС захисту мембран клітин *E. coli* дослідних штамів 57 (А), 25 (Б), 24 (С) і 20 (Д) за умов впливу NPMе у розмірному діапазоні.

Встановлено, що у СМФ клітин штаму 25 (рис. 4, Б) рівень активності каталази за умов преінкубації з NPAu у всьому розмірному діапазоні вірогідно знижувався в межах 1,3–8,6 рази, а у клітин штаму 20 (рис. 4, Д), навпаки, підвищувався – у межах 1,3–1,9 рази відносно контрольних значень ензиму.

У СМФ штамів 57 і 24 (рис. 4, А і С) за умов преінкубації з NPAu середнього розміру ~30 нм і ~45 нм активність каталази знижувалась у середньому в 1,6 і 2,9 рази ($p \leq 0,05$), а для клітин штаму 20 (рис. 4, Д) за дії таких NPMе у всьому діапазоні розмірів – збільшувалась в межах 1,3–1,9 рази ($p \leq 0,05$) відносно її «контрольних» значень.

Встановлено тенденцію щодо збільшення активності каталази на 6,7% у СМФ клітин штаму 57 (рис. 4, А, 1) у випадку взаємодії NPAu середнього розміру ~20 нм, що для СМФ клітин штаму 24 (рис. 4, С, 1) було вірогідним і складало в середньому 18,1% ($p \leq 0,05$) відносно «контрольного» рівня ензиму.

Рівень активності каталази за умов преінкубації NPAg середнього розміру ~30 нм з СМФ клітин штаму 25 (рис. 4, Б, 4) суттєво знижувався за значенням у середньому в 4,9 рази ($p \leq 0,05$), а штамів 57, 24 і 20 (рис. 4, А, С і Д) – підвищувався в 1,1, 1,5 і 2,2 рази ($p \leq 0,05$) відповідно відносно ферментативної активності у «контрольній» пробі.

Рівень показника загальної АОА ліпідів СМФ бактеріальних клітин за взаємодії з NPAu та NPAg у всьому розмірному діапазоні збільшувався для штамів 25, 24 і 20 (рис. 4, Б, С і Д), кратність чого складала у середньому 3,0, 1,8 і 1,3 раза та 3,0, 2,0 і 1,7 раза ($p \leq 0,05$) відповідно відносно «контрольних» значень показника.

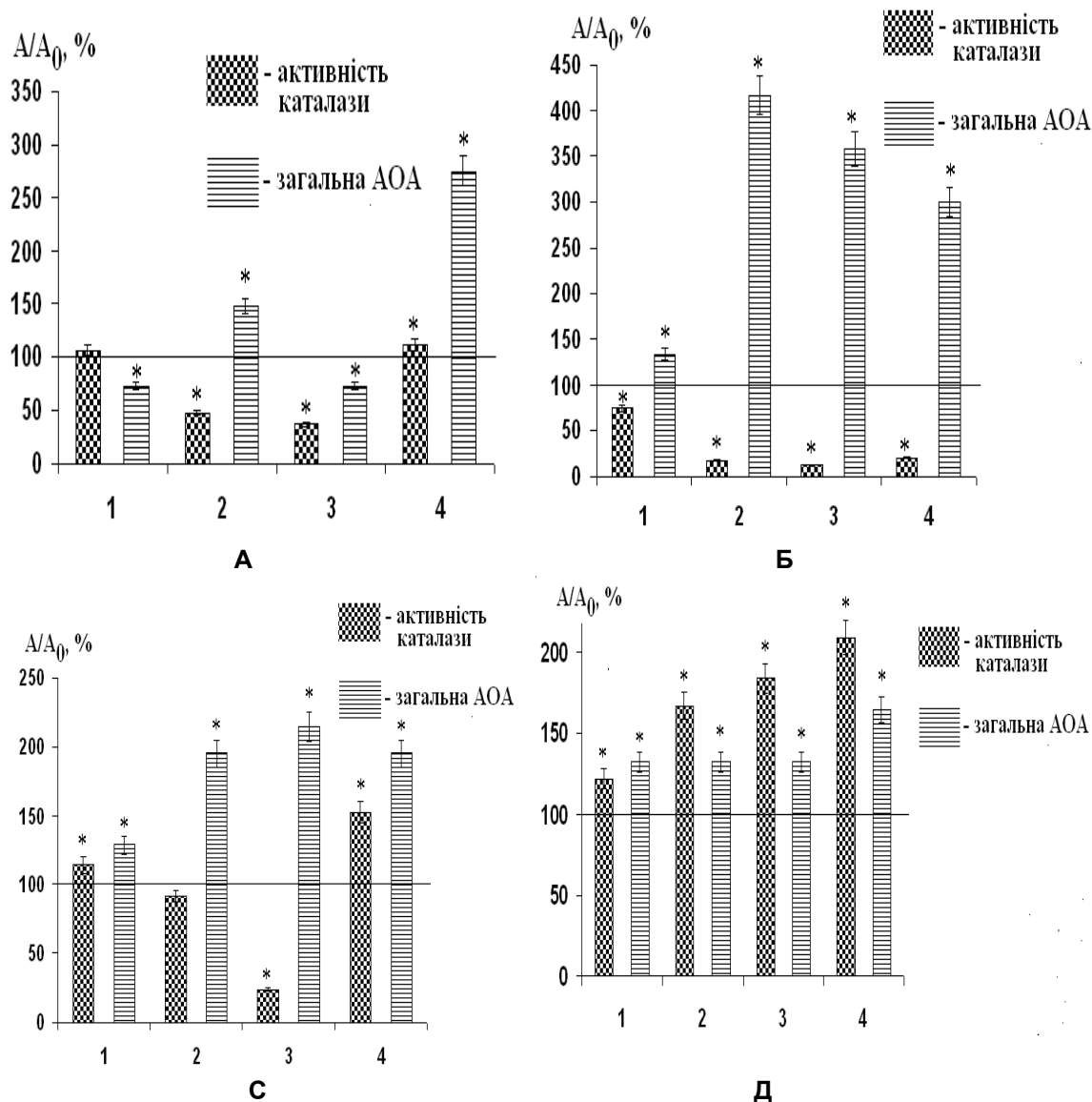


Рис. 4. Рівень показників АОС (активність каталази та загальна АОА ліпідів) у СМФ клітин *E. coli* штамів 57 (А), 25 (Б), 24 (С) і 20 (Д) за умов преінкубації з NPAu і NPAg в розмірному діапазоні ($n=5$)

Примітка. NPAu середнього розміру ~ 20 нм (1), ~ 30 нм (2) і ~ 45 нм (3) у концентрації $1,16$ мкг/см³ за металом та NPAg середнього розміру ~ 30 нм (4) у концентрації $2,59$ мкг/см³ за металом; за 100% прийняте значення показників АОС у інтактних СМФ клітин *E. coli* відповідного штаму за відсутності впливу NPMe («контроль»); * – різниця значень показника вірогідна при $p \leq 0,05$ відносно значень такого показника у інтактних СМФ клітин *E. coli* відповідних штамів («контроль»).

Збільшення значень показника загальної АOA в ізольованих СМФ клітин штаму 57 реєстрували лише за впливу NPAu і NPAg середнього розміру ~30 нм (рис. 4, А, 3, 4), кратність якого дорівнювала у середньому 1,5 і 2,8 рази ($p \leq 0,05$) відповідно відносно рівня даного показника в «контрольній» пробі.

Так, виражені зміни інтенсивності процесів ліпопероксидації та процесів окисної модифікації білків у мембранних фракціях клітин *E. coli* дослідних штамів за умов контактної взаємодії з NPAu і NPAg супроводжувались втручанням реакцій загальної АOC за підвищення рівня загальної АOA та змінами активності каталази ($p \leq 0,05$), що, очевидно, призводило до гальмування утворення токсичних продуктів ПОЛ (*E. coli* штамів 20 і 25) та утримання їх на рівні «контрольних» значень (*E. coli* штамів 20 і 24), а також до зниження вмісту карбоксильних похідних ОМБ (*E. coli* штамів 57, 25, 24 і 20) відповідно.

Відомо, що наночастинки різного хімічного походження, у тому числі – наночастинки металів, можуть виступати як в ролі про-, так і антиоксидантів (Prylutska et al., 2008; Jia et al., 2009; Injac et al., 2009; Johnston et al., 2010; Cornejo-Garrido et al., 2011; Фальфушинська та ін., 2013).

Дійсно, біологічна дія NPMe пов'язана з регуляторним впливом на систему антиокиснювального захисту мембран бактеріальних клітин. Але визначене нами збільшення рівня загальної АOA на фоні зниження або посилення каталази, що належить до ферментативної ланки АOC, можна розглядати як індукцію структурних ендогенних антиоксидантів (аскорбат, SH-групи, GSH, церулоплазмін, цитохром, металотіонеїни тощо). При цьому витрачання потужності АО-ферментів може частково компенсуватися пулом неферментативної ланки АOC. Відомо, що через високий вміст сульфгідрильних нуклеофільних груп металотіонеїни здатні реагувати з електрофільними субстанціями, такими як іони металів і вільні радикали (Stoliar, Falfushynska, 2012; Sutherland et al., 2012; Scheringer, 2008; Tedesco et al., 2010; Фальфушинська та ін., 2013). Можна припустити, що в результаті зв'язування з функціональними групами металотіонеїнів іонів металів, які в процесі біотрансформації вивільнилися із міцели колоїдної наночастинки, гіпотетично токсичність цих металів зменшується, тоді як незв'язані – можуть вступати в інші взаємодії та акумулюватися клітинами та їх структурами, які визначають їх біосумісність (у даному випадку – антиоксидантні властивості) або токсичність (прооксидантні властивості).

Визначений фізіологічний рівень або уповільнення інтенсивності процесів окиснення ліпідів та окисної деструкції білків у СМФ клітин *E. coli* усіх дослідних штамів за взаємодії з NPAu та з NPAg (за винятком штаму 57) середнього розміру ~30 нм може вказувати на значну біосумісність таких наночастинок саме у цьому розмірі через їх антиоксидантний вплив. У роботах (Карамушка и др., 1990, Karamushka et al., 1991; Ульберг та ін., 2005, 2008; Pan et al., 2012) доведено здатність деяких інтактних мікроорганізмів селективно концентрувати NPAu розміром 20–30 нм на поверхні клітин, яка дозволяє здійснювати ресуспендування останніх у розчин, при цьому зі збільшенням часу контакту наночастинок і клітини фізична адгезія на поверхні клітин переходить у хімічну взаємодію за участі функціональних груп на поверхні клітинної мембрани, зокрема карбоксильних COOH^- та тиолових SH $^-$. Поряд із можливим зв'язуванням з функціональними групами металотіонеїнів іонів металів, які в процесі біотрансформації вивільнилися із міцели колоїдної наночастинки, інші автори (Данилович та ін., 2004, 2007) зазначають, що при дослідженні особливостей взаємодії NPAu з металофільними клітинами *Bacillus* spp. в їх оболонках був виділений глікопротеїд з $M. m.$ 50 кДа, який характеризувався здатністю активно зв'язувати NPMe завдяки наявності в своїй структурі позитивно заряджених аміногруп NH_2^+ . Такі структурні компоненти виступають як своєрідні клітинні рецептори, що сприяють процесу специфічної взаємодії клітини з наночастинами Ауруму.

Як опосередковано, так й напряму через процеси нормалізації вільнорадикального окиснення ліпідів активно блокується цитолітичний синдром (Sahoo et al., 2007; Chen et al., 2008; Bawa, 2008; Johnston et al., 2010). У цьому випадку NPAu і NPAg виступають як антиоксиданти – «пастки» радикалів та їх можна вважати біосумісними і мембранотропними.

Природу цих властивостей можна пояснити тим, що міцела колоїдної наночастинки металу, яка має потенціалутворюючу оболонку з розвиненою питомою поверхнею, має слабо негативний заряд, що дозволяє наночастинкам проявляти високу адсорбційну і каталітичну активність до різного роду токсичних метаболітів навколо і усередині клітинної мембрани, ґрунтується на механізмах рецептор-опосередкованого ендоцитозу та фізико-хімічного зв'язування NPMe

функціональними групами компонентів клітинної мембрани (Ульберг, 2005; Ульберг та ін., 2008; Dukhin et al., 2010; Науменко та ін., 2016; Стойка та ін., 2017).

Феномен тропності NPMe до біологічних молекул різної молекулярної маси, шляхи їх трансмембранного переносу всередину клітини, біотрансформації та біодеградації мають геометрично- та розмірно-залежний характер (Oberdorster et al., 2005; Cornejo-Garrido et al., 2011), що визначає варіабельність характеру їх біологічної дії – від токсичності до біосумісності. Цей феномен значною мірою залежить від розміру та форми наночастинок, що пов'язано з площею поверхні та квантумними ефектами. Так, зменшення розміру наночастинок призводить до того, що, порівняно із внутрішнім вмістом, значно більша частина атомів – складових наночастинок знаходиться на поверхні. Низкою авторів доведено, що зі зміною розміру колоїдних NPMe з невеликим кроком, особливо тих, які мають сферичну геометрію, площа їх питомої поверхні збільшується в геометричній прогресії (на порядки разів) через зростання співвідношення площі поверхні до маси частинки, що пояснює обернено пропорційну залежність прояву токсичності наночастинок від її розміру – чим менше за розміром частинка, тим більше агресивна (біодоступна) (Dukhin et al., 2010; Shukla et al., 2005). Але більшим за розміром наночастинкам властиво утворювати токсичні (агресивні) конгломерати як між собою, так і з гідрофільним ліпідним бішаром та аміногрупами білкових молекул мембрани і плазмалеми, в результаті чого на їх поверхні збільшується кількість гідрофобних залишків, утворюються міжмолекулярні ковалентні зшивки, які вбудовуються у внутрішній гідрофобний прошарок, підвищуючи його специфічну провідність і ємність та додатково штучно ініціюючи каскад ланцюгових реакцій за вільнорадикальним типом (Colon et al., 2009; Шекунова и др., 2013; Dubertret et al., 2002; Lowry et al., 2012).

Так, дійсно, у випадку контактної взаємодії NPАu середнього розміру ~20 і ~45 нм та NPАg середнього розміру ~30 нм з СМФ клітин штаму 57 реєстрували посилення інтенсивності процесів ПОЛ і ОМБ, а за взаємодії NPАu розміру ~20 нм з клітинами штаму 20 – процесів ОМБ відповідно. Отримані ефекти свідчать про прооксидантну і мембранотоксичну дію NPАu і NPАg у саме цих розмірах. Очевидно, потенціал власних АО-ресурсів у клітинних мембранах таких штамів виявився недостатнім, тому беззаперечним є факт індивідуального характеру впливу NPMe на функціональний стан бактеріальних клітин в межах одного таксономічного виду. Отже, прооксидантний вплив NPАu меншого (~20 нм) і більшого (~45 нм) розміру ілюструє очевидну мембранотоксичну дію наночастинок певного розміру. Так доведено, що NPАu розміру 1,4 і 5,0 нм викликали значно сильніший оксидний стрес, ніж частинки металу більшого діаметра (Pan et al., 2009; Dubertret et al., 2002). Так, у двостулкового морського молюска *Scrobicularia plana* за інкубації з NPАu розміром ~5, ~15 і ~40 нм спостерігалась акумуляція Ауруму в тканинах, яка поєднувалась з активацією ензимів АОЗ – каталази (~15 і ~40 нм), супероксиддисмутази (~40 нм) та глутатіон-S-трансферази (~5, ~15 і ~40 нм).

За дії NPАg розміром ~30 нм на СМФ *E. coli* штаму 57 у випадку активації процесів ліпопероксидації на фоні відсутності ознак оксидного ураження протеїнів стрес має швидше сигнальний характер, а за дії NPАu розміром ~20 нм на СМФ *E. coli* штаму 20 визначена активація ОМБ на фоні фізіологічного рівня процесів ПОЛ – руйнівний характер (Jia et al., 2009). Так, деградовані протеїни можуть знаходитися в клітинах годинами і навіть днями, а продукти ПОЛ піддаються детоксикації вже через декілька хвилин (Кенія, 1991). Одержані дані дозволяють розглядати окиснювання білків як відносно стабільний показник окиснювального стресу, що має величезне значення для дослідницької практики. Слід зазначити також, що важливим аспектом з'ясування впливу наночастинок металів на системи АОС є встановлення залежності її реакції від вихідного редокс-статусу саме клітини.

Підсумовуючи вищесказане, слід зауважити, що потенційна небезпечність дослідних NPMe носить залежний від їх дискретного розміру характер та є індивідуальною для різних штамів у межах одного таксономічного виду мікроорганізмів, з іншого боку – конкретні механізми біосумісності або цитотоксичної дії NPMe виокремити складно, бо вони можуть сильно відрізнитись навіть у межах одного класу наноматеріалів, тому це питання поки ще має дискусійний характер.

Висновки

1. Встановлено, що дослідні зразки NPАu і NPАg середнього розміру ~30 нм за дії на мембранні фракції клітин *E. coli* усіх дослідних штамів (за винятком штаму 57) сприяють уповільненню та/або утриманню на фізіологічному рівні інтенсивності процесів окиснення ліпідів та

окисної деструкції білків, що супроводжується втручанням реакцій загальної АОС за підвищенням рівня загальної АОА та змінами активності каталази ($p \leq 0,05$) та дозволяє стверджувати про мембранотропні властивості таких NРМе; використання їх надає можливість створити новий засіб управління структурно-функціональним станом бактеріальних клітин.

2. У випадку контактної взаємодії NРАu середнього розміру ~ 20 і ~ 45 нм та NРАg середнього розміру ~ 30 нм з СМФ клітин штаму 57 реєстрували посилення інтенсивності процесів ПОЛ і ОМБ, а за взаємодії NРАu розміру ~ 20 нм з клітинами штаму 20 – процесів ОМБ відповідно, що вказує на прооксидантну і мембранотоксичну дію NРАu і NРАg саме у цих розмірах.

3. Отже, потенційна небезпечність та біосумісність NРМе носить залежний від їх дискретного розміру характер та є індивідуальною для різних штамів у межах одного таксономічного виду мікроорганізмів.

Автор висловлює подяку к.б.н. Т.Г.Грузиній та к.б.н. Л.С.Резніченко (Інститут біологічної хімії ім. Ф.Д.Овчаренка НАН України) за допомогу у синтезі наночастинок металів.

Список літератури

- Абрамов Н.В., Багацкая А.Н., Барвинченко В.Н. и др. Наноматериалы и нанокompозиты в медицине, биологии и экологии. – Киев: Наук. думка, 2011. – 444с. /Abramov N.V., Bagatskaya A.N., Barvinchenko V.N. i dr. Nanomaterialy i nanokompозity v meditsine, biologii i ekologii. – Kiev: Nauk. dumka, 2011. – 444s./
- Арчаков А.И., Михосоев И.М. Модификация белков активным кислородом и их распад // Биохимия – 1998. – Т.54, №2. – С. 179–186. /Archakov A.I., Mikhosoyev I.M. Modifikatsiya belkov aktivnym kislородом i ikh raspad // Biokhimiya. – 1998. – Т.54, no. 2. – S. 179–186./
- Беленічев І.Ф., Левицький Є.Л., Губський Ю.І. та ін. Антиоксидантна система захисту організму (огляд) // Современные проблемы токсикологии. – 2002. – №3. – С. 24–31. /Belenichev I.F., Levyts'kyi Ye.L., Gubs'kyi Yu.I. ta in. Antyoksydantna systema zakhystu organizmu (oglyad) // Sovremennyye problemy toksikologii. – 2002. – No. 3. – S. 24–31./
- Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови // Лаб. дело. – 1985. – №3. – С. 33–35. /Gavrilov V.B., Mischkorudnaya M.I. Spektrofotometricheskoye opredeleniye soderzhaniya gidroperekisey lipidov v plazme krovi // Lab. delo. – 1985. – No. 3. – S. 33–35./
- Данилович Г.В., Грузина Т.Г., Ульберг З.Р., Костерин С.О. Вплив іонного та колоїдного золота на АТР-гідролазні ферментні системи в мембрані мікроорганізмів *Bacillus* sp. B4253 та *Bacillus* sp. B4851 // Укр. біохім. журн. – 2007. – Т.79, №4. – С. 46–51. /Danylovykh G.V., Gruzina T.G., Ul'berg Z.R., Kosteryn S.O. Vplyv ionnogo ta koloidnogo zolota na ATR-gidrolazni fermentni systemy v membrani mikroorganizmiv Bacillus sp. B4253 ta Bacillus sp. B4851 // Ukr. biokhim. zhurn. – 2007. – T.79, no. 4. – S. 46–51./
- Данилович Г.В., Грузина Т.Г., Ульберг З.Р., Костерин С.О. Ідентифікація та каталітичні властивості Mg^{2+} -залежної АТР-гідролазі плазматичних мембран *Bacillus* sp. B4253, здатних до накопичення золота // Укр. біохім. журн. – 2004. – Т.76, №5. – С. 45–51. /Danylovykh G.V., Gruzina T.G., Ul'berg Z.R., Kosteryn S.O. Identyfikatsiya ta katalitychni vlastyvoli Mg^{2+} -zaleznoi ATR-gidrolazy plazmatychnykh membran Bacillus sp. B4253, zdatnykh do nakopychennya zolota // Ukr. biokhim. zhurn. – 2004. – T.76, no. 5. – S. 45–51./
- Дубинина Е.Е. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме ткани при состояниях окислительного стресса // Вопр. мед. химии. – 2001. – Т.47, №6. – С. 561–581. /Dubinina Ye.Ye. Rol' aktivnykh form kislорода v kachestve signal'nykh molekul v metabolizme tkani pri sostoyaniyakh oksilitel'nogo stressa // Vopr. med. khimii. – 2001. – T.47, no. 6. – S. 561–581./
- Ершов Б.Г. Наночастицы металлов в водных растворах: электронные, оптические и каталитические свойства // Рос. хим. журн. – 2001. – Т. XIV, №3. – С. 20–30. /Yershov B.G. Nanochastitsy metallov v vodnykh rastvorakh: elektronnyye, opticheskiye i kataliticheskiye svoystva // Ros. khim. zhurn. – 2001. – T. XIV, no. 3. – S. 20–30./
- Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньшикова Е.Б. Окислительный стресс: биохимический и патофизиологический аспект. – М.: Маик, 2001. – 343с. /Zenkov N.K., Lankin V.Z., Men'shikova Ye.B. Oksilitel'nyy stress: biokhimicheskiy i patofiziologicheskiy aspekt. – M.: Maik, 2001. – 343s./
- Иваница В.И., Рахимова Е.Л. Жизнеспособность лиофилизированных клеток *Mucosoccus xanthus* UCM 10041 и *Polyangium cellulosum* UCM 10043 в присутствии различных антиоксидантов // Микробиол. журнал – 2002. – Т.64, №5. – С. 3–9. /Ivanitsa V.I., Rakhimova Ye.L. Zhiznesposobnost' liofilizirovannykh kletok *Mucosoccus xanthus* UCM 10041 i *Polyangium cellulosum* UCM 10043 v prisutstvii razlichnykh antioxydantov // Microbiol. zhurnal – 2002. – T.64, no. 5. – S. 3–9./
- Карамушка В.И., Ульберг З.Р., Грузина Т.Г. Роль мембранных процессов в накоплении Au (III) и Au (0) бактериями // Укр. біохім. журн. – 1990. – Т.62, №1. – С. 76–82. /Karamuschka V.I., Ul'berg Z.R., Gruzina T.G. Rol' membrannykh protsessov v nakoplenii Au (III) i Au (0) bakteriyami // Ukr. biokhim. zhurn. – 1990. – T. 62, no. 1. – S. 76–82./

- Кения М.В. Динамика свободнорадикальных процессов и продуктов азотистого катаболизма в тканях системы крови при гипероксии. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук / 03.00.04 – биохимия. – Ростов-на-Дону, 1991. – 19с. /Kenya M.V. Dinamika svobodnoradikal'nykh protsessov i produktov azotistogo katabolizma v tkanyakh sistemy krovi pri giperoksii. Avtoref. diss. ...cand. biol. nauk / 03.00.04 – biokhimiya. – Rostov-na-Donu, 1991. – 19s./
- Клебанов Г.И., Бабенкова И.В., Теселкин Ю.О. и др. Оценка антиокислительной активности плазмы крови с применением желточных липопротеидов // Лаб. дело. – 1988. – №5. – С. 59–62. /Klebanov G.I., Babenkova I.V., Teselkin Yu.O. i dr. Otsenka antiokislitel'noy aktivnosti plasmy krovi s primeneniyyem zheltochnykh lipoproteidov // Lab. delo. – 1988. – No. 5. – S. 59–62./
- Королюк М.А. Определение активности каталаз // Лаб. дело. – 1988. – №1. – С. 16–18. /Korolyuk M.A. Opredeleniye aktivnosti katalaz // Lab. delo. – 1988. – No. 1. – S. 16–18./
- Методические разработки к практикуму по коллоидной химии / Под ред. А.В.Перцова. – М.: Изд-во МГУ им. М.В.Ломоносова, 1976. – С. 126–130. /Metodicheskiye razrabotki k praktikumu po kolloidnoy khimii / Pod red. A.V.Pertsova. – M.: Izd. MGU im. M.V.Lomonosova, 1976. – S. 126–130./
- Науменко А.М., Нипирко О.Ю., Цимбалюк О.В. та ін. Молекулярний докінг нанорозмірного матеріалу діоксину титану із зовнішньоклітинною частиною ГАМКБ-рецептора // Біол. студії. – 2016. – Т.10 (3). – С. 5–16. /Naumenko A.M., Nipirko O.Yu., Tsimbalyuk O.V. ta in. Molekulyarnyy doking nanorozmirnogo materialu dioksynu tytanu iz zovnishn'oklitynnoyu chastynoyu GAMKB-retseptora // Studia Biologica. – 2016. – T.10 (3). – S. 5–16./
- Стойка Р.С. Багатофункціональні наноматеріали для біології і медицини: молекулярний дизайн, синтез і застосування. – К.: «Наукова думка», 2017. – 361с. /Stoyka R.S. Bagatofunktsional'ni nanomaterialy dlya biologii i medytyny: molekulyarnyy dizayn, syntezi i zastosuvannya. – K.: «Naukova dumka», 2017. – 361s./
- Трахтенберг І.М., Ульберг З.Р., Чекман І.С. та ін. Методичні рекомендації: Оцінка безпеки лікарських нанопрепаратів. – Київ, 2013. – 108с. /Trakhtenberg I.M., Ul'berg Z.R., Chekman I.S. ta in. Metodychni rekomendatsii: Otsinka bezpeky likars'kykh nanopreparativ. – Kyiv, 2013. – 108s./
- Турпаяев К.Т. Активные формы кислорода и экспрессия генов // Биохимия. – 2002. – Т.67, вып.3. – С. 339–352. /Turpayev K.T. Aktivnyye formy kisloroda i ekspressiya genov // Biokhimiya. – 2002. – T.67, vyp.3. – S. 339–352./
- Ульберг З.Р. Коллоидно-химические свойства биологических наносистем. Биомембраны. В: Коллоидно-химические основы нанонауки. – Киев: Академперіодика, 2005. – С. 199–237. /Ul'berg Z.R. Kolloidno-khimicheskiye svoystva biologicheskikh nanosistem. Biomembrany. V: Kolloidno-khimicheskiye osnovy nanonauki. – Kiev: Akadempriodika, 2005. – P. 199–237./
- Ульберг З., Грузина Т., Карпов О. Нанотехнології в медицині: роль колоїднохімічних процесів // Вісн. Нац. акад. наук України. – 2008. – №8. – С. 28–41. /Ul'berg Z., Gruzina T., Karpov O. Nanotekhnologii v medytyni: rol' koloidnokhimichnykh protsesiv // Visn. Nats. akad. nauk Ukrainy. – 2008. – No. 8. – S. 28–41./
- Фальфушинська Г.І., Гнатишина Л.Л., Турта О.О. та ін. Функції металотіонеїнів на системі антиоксидантного захисту за дії кобальт- та цинкмісних наноконкомпозитів на карася сріблястого *Carassius auratus gibelio* // Укр. біохім. журн. – 2013. – Т.85. – С. 52–61. /Fal'fushyn'ska G.I., Gnatyshyna L.L., Turta O.O. ta in. Funktsii metalotioneiniv na systemy antioksidantnogo zakhystu za dii kobal't- ta tsinkvmisnykh nanokompozytiv na karasya sriblyastogo *Carassius auratus gibelio* // Ukr. biokhim. zhurn. – 2013. – T.85. – S. 52–61./
- Феофилова Е.П. Изменения в углеводном и липидном составе мицелия *Cunninghamella japonica* во время длительного высокотемпературного стресса // Микробиология. – 1993. – Т.62, №1. – С. 62–69. /Feofilova Ye.P. Izmeneniya v uglevodnom i lipidnom sostave mitseliya *Cunninghamella japonica* vo vremya dlitel'nogo vysokotemperaturnogo stressa // Microbiologiya. – 1993. – T.62, no. 1. – S. 62–69./
- Харчук І.А. Анабіоз: основні поняття і супроводжуючі його процеси (обзор) // Екологія моря. – 2005. – Вып.70. – С. 62–78. /Kharchuk I.A. Anabioz: osnovnyye ponyatiya i soprovozhdayushhiye protsessy (obzor) // Ekologiya morya. – 2005. – T.70. – S. 62–78./
- Чекман І.С., Ульберг З.Р., Маланчук О.В. та ін. Нанонаука, нанобіологія, нанофармація. – Київ: Поліграф плюс, 2012. – 327с. /Chekman I.S., Ul'berg Z.R., Malanchuk O.V. ta in. Nanonauka, nanobiologiya, nanofarmatsiya. – Kyiv: Poligraf plyus, 2012. – 327s./
- Чекман І.С., Сердюк А.М., Кундієв Ю.І. та ін. Нанотоксикологія: напрямки досліджень (огляд) // Довкілля та здоров'я. – 2009. – Т.48, №1. – С. 3–7. /Chekman I.S., Serdyuk A.M., Kundiyev Yu.I. ta in. Nanotoksikologiya: napryamky doslidzhen' (oglyad) // Dovkillya ta zdorov'ya. – 2009. – T.48, no. 1. – S. 3–7./
- Шекунова Т.О., Гиль Д.О., Иванова О.С. и др. Синтез, биологическая и фотокаталитическая активность зольей диоксида церия, стабилизированных цитрат-ионом // Наносистемы: физика, химия. Математика. – 2013. – Т.4, no. 2. – С. 83–89. /Shekunova T.O., Gil' D.O., Ivanova O.S. i dr. Sintez, biologicheskaya i fotokataliticheskaya aktivnost' zoley dioksida tseriya, stabilizirovannykh tsitrat-ionom // Nanosistemy: fizika, khimiya. Matematika. – 2013. – T.4, no. 2. – S. 83–89./
- Bawa R. Nanoparticle-based therapeutics in humans: a survey // Nanotechnology Law & Business. – 2008. – Vol.5, no. 2. – P.135–155.

- Beker M.J., Rapoport A.J., Zikmanis P.B., Damberg B.E. Dehydration as a yeast metabolism regulating factor // *Environmental regulation of microbial metabolism* / Ed. By I.S.Kulaev et al. – London etc.: Acad. Press, 1985. – P. 105–111.
- Brunner Tobias J., Wick P., Mauser P. *In vitro* cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility // *Environ. Sci. And Technol.* – 2006. – Vol.40, no. 14. – P. 4374–4381.
- Chen Po.C., Mwakwari S.C., Oyelere A.K. Gold nanoparticles: from nanomedicine to nanosensing // *Nanotechnology, Science and Application.* – 2008. – No. 1. – P. 45–66.
- Chen Z., Meng H., Hing G. Acute toxicological affects of copper nanoparticles *in vivo* // *The Journal of Physical Chemistry. Toxicology Letters.* – 2006. – Vol.163. – P. 109–120.
- Colon J., Herrera L., Smith J. Protection from radiation induced pneumonitis using cerium oxide nanoparticles // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.* – 2009. – Vol.5. – P. 225–231.
- Cornejo-Garrido H., Kibanova D., Nieto-Camacho A. et al. Oxidative stress, cytotoxicity, and cell mortality induced by nano-sized lead in aqueous suspensions // *Chemosphere.* – 2011. – Vol.84. – P. 1329–1335.
- Dubertret B., Skourides P., Norris D.J. et al. *In vivo* imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles // *Science.* – 2002. – Vol. 298. – P. 1759–1762.
- Dukhin A.S., Ulberg Z.R., Karamushka V.I., Gruzina T.G. Peculiarities of live cells' interaction with micro- and nanoparticles // *Advances in Colloid and Interface Science.* – 2010. – Vol.159. – P. 60–71.
- Garçon G., Dagher Z., Zerimech F. et al. Dunkerque City air pollution particulate matter-induced cytotoxicity, oxidative stress and inflammation in human epithelial lung cells (L132) in culture // *Toxicology in Vitro.* – 2006. – Vol.20 (4). – P. 519–528.
- Injac R., Radic N., Govedarica B. et al. Acute doxorubicin pulmototoxicity in rats with malignant neoplasm is effectively treated with fullereneol C₆₀(OH)₂₄ through inhibition of oxidative stress // *Pharm. Reports.* – 2009. – Vol.61. – P. 335–342.
- Jia G., Wang H., Yan L. Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, and fullerene // *Environ. Sci. Technol.* – 2005. – Vol.39. – P. 1378–1380.
- Jia H.Y., Liu Y., Zhang X.J. et al. Potencial oxidative stress of gold nanoparticles by induced-NO releasing in serum // *J. of the Am. Ch. Society.* – 2009. – Vol.131. – P. 40–41.
- Johnston H.J., Hutchison G., Christensen F.M. et al. A review of the *in vivo* and *in vitro* toxicity of silver and gold particulates: Particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity // *Critical Reviews in Toxicology.* – 2010. – Vol.40. – P. 328–346.
- Karamushka V.I., Ullberg Z.R., Grusina T.G., Dukhin A.S. ATP-dependent gold accumulation by living *Chlorella* cells // *Acta Biotechnol.* – 1991. – Vol.11, no. 3. – P. 197–203.
- Li N., Sioutas C., Cho A., Schmitz D. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage // *Environ. Health Perspec.* – 2003. – Vol.111. – P. 455–459.
- Lowry G.V., Gregory K.B., Apte S.C., Lead J.R. Transformations of nanomaterials in the environment // *Environmental Science Technology.* – 2012. – Vol. 46. – P. 6893–6899.
- Lynch I., Cedervall T., Lundqvist M. The nanoparticle-protein complex as a biological entity; a complex fluids surface science challenge for the 21st century // *Adv Colloid Interface Sci.* – 2007. – Vol.31. – P. 167–174.
- Miller G.L. Protein determination for large numbers of samples // *Anal. Chem.* – 1959. – Vol.31, no. 5. – P. 964–966.
- Oberdorster G., Oberdorster E., Oberdorster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles // *Environmental Health Perspectives.* – 2005. – No. 7 (113). – P. 823–839.
- Pan Y.F., Buffet P.E., Poirier L. et al. Size dependent bioaccumulation and ecotoxicity of gold nanoparticles in an endobenthic invertebrate: the Tellinid clam *Scrobicularia plana* // *Environmental Pollution.* – 2012. – Vol.168. – P. 37–43.
- Pan Y., Leifert A., Ruau D. et al. Gold nanoparticles of diameter 1.4 μm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage // *Small.* – 2009. – Vol.5. – P. 2067–2076.
- Powers Kevin W., Brown Scott C. Characterization of nanoscale particles for toxicological evaluation // *Toxicol. Science.* – 2006. – Vol.90, no. 2. – P. 296–303.
- Prylutska S.V., Grynyuk I.I., Matyshevska O.P. et al. Anti-oxidant properties of C₆₀ fullerenes *in vitro* // *Fullerene, Nanotubes and Carbon Nanostructures.* – 2008. – Vol.16. – P. 698–705.
- Rawle A. Basic principles of particle size analysis. Malvern Instruments Limited. (www.malvern.co.uk)

- Sahoo S.K., Parveen S., Panda J.J. The present and future of nanotechnology in human health care // *Nanomedicine*. – 2007. – No. 3. – P. 20–31.
- Scheringer M. Nanoecotoxicology: Environmental risks of nanomaterials // *Nature Nanotechnology*. – 2008. – Vol.3. – P.322.
- Sherman D.R., Sabo P.J., Hickey M.J. et al. Disparate responses to oxidative stress in saprophytic and pathogenic micobacteria // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. – 1995. – Vol.92. – P. 6625–6629.
- Shukla R., Bansal V., Chaudhary M. Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview // *Langmuir*. – 2005. – Vol.21, no. 23. – P. 10644–10654.
- Shvedova A.A., Kisin E., Murray A.R. Exposure of human bronchial cells to carbon nanotubes caused oxidative stress cytotoxicity // *Proceedings of the Society for free radical research meeting. European Section*. – 2004. – P. 91–103.
- Stoliar O.B., Falfushynska H.I. Metallothionein of aquatic animals as a biomarker: coverage of vulnerability // *Global J. Env. Science Technology*. – 2012. – Vol.2, no. 5. – P.115.
- Sutherland D.E., Summers K.L., Stillman M.J. Noncooperative metalation of metalothionein Ia and its isolated domains // *Biochemistry*. – 2012. – Vol.51. – P. 6690–6700.
- Tedesco S., Doyle H., Blasco J. et al. Oxidative stress and toxicity of gold nanoparticles in *Mytilus edulis* // *Aquatic Toxocology*. – 2010. – Vol.100. – P. 178–186.
- West J.L., Halas N.J. Application of nanotechnology to biotechnology // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2000. – Vol.11. – P. 215–217.
- Weyermann J., Lochmann D., Zimmer A. A practical note on the use of cytotoxicity assays // *Int. J. Pharm.* – 2005. – No. 288. – P. 369–376.
- Yamakoshi Y., Umezawa N., Ryu A. et al. Active oxygen species generated from hotoexcited fullerene (C₆₀) as potential medicines: O₂ – versus O₂ // *J. Am. Chem. Soc.* – 2003. – Vol.125. – P. 12803–12809.

Представлено: В.М.Войціцький, Н.С.Кавок / Presented by: V.M.Voytsitskiy, N.S.Kavok

Рецензент: Є.Е.Перський / Reviewer: Ye.E.Persky

Подано до редакції / Received: 30.10.2017

••• ГЕНЕТИКА ••• GENETICS •••

УДК: 575.17

Взаємодія *Wolbachia pipientis* з мобільними елементами геному дрозофіли: короткий огляд можливих випадків і припущень
І.Д.Городнянський*Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна (Харків, Україна)*
horodnianskyi@karazin.ua

Wolbachia pipientis – ендосимбіотична бактерія, широко поширена у популяціях багатьох видів артропод. Одна з її найбільш цікавих особливостей – те, що вона є так званим репродуктивним паразитом – мікроорганізмом, здатним впливати на розмноження організму-господаря. Вольбахія широко поширена всередині популяцій різних видів плодових мушок роду *Drosophila*. За оцінками вчених, на сьогодні інфікованими є близько 80% природних популяцій. Серед ліній *Drosophila melanogaster*, що утримуються у лабораторіях, інфіковані понад 60%, внаслідок чого вчені, які проводять досліди на дрозофілі, мимоволі експериментують і з вольбахією. Незважаючи на хорошу вивченість *Wolbachia pipientis* як репродуктивного паразита, інші аспекти її впливу на організм господаря ще не повністю зрозумілі і становлять значний інтерес. Доведено, що вольбахія може бути симбіонтом організму-господаря, підвищуючи його стійкість до впливу деяких стресуючих факторів, вірусних та бактеріальних інфекцій. Незрозумілими залишаються механізми взаємодії вольбахії з геномом організму-господаря. Основною метою даної роботи був огляд можливої взаємодії вольбахії з мобільними елементами геному дрозофіли та ймовірних її механізмів. Розглядається припущення про взаємозв'язок вольбахії і мобільних елементів геному організму-господаря в якості компонентів єдиної регуляторної системи.

Ключові слова: *Wolbachia pipientis*, *Drosophila melanogaster*, *Drosophila simulans*, репродуктивний паразитизм, цитоплазматична несумісність, мобільні елементи геному, гібридний дисгенез.

Interaction of *Wolbachia pipientis* with mobile elements of the *Drosophila* genome: a brief overview of possible cases and assumptions
I.D.Gorodnyansky

Wolbachia pipientis is an endosymbiotic bacterium widely distributed within populations of many arthropod species. One of its most interesting features is its being so-called reproductive parasite – a microorganism, which influences reproduction of the host organism. *Wolbachia* is widely distributed within populations of different species of fruit flies of the genus *Drosophila*. According to scientists' estimates, about 80% of natural populations are infected. Among laboratory *Drosophila melanogaster* stocks, more than 60% are infected, so that scientists who conduct experiments with the fruit fly are unwittingly experimenting with *Wolbachia*. Despite the good knowledge of *Wolbachia pipientis* as a reproductive parasite, other aspects of its effect on the host organism are not fully understood yet. It is proved that *Wolbachia* can be a symbiont of the host organism, increasing its resistance to the influence of certain stressors, viral and bacterial infections. The mechanisms of interaction of *Wolbachia* with the genome of the host organism remains unclear. The main purpose of this work is to review the possible interaction of *Wolbachia* with mobile elements of the *Drosophila* genome and its proposed mechanisms. The assumption about interrelation of *Wolbachia* and mobile elements of the genome of the host organism as components of a single regulatory system is considered.

Key words: *Wolbachia pipientis*, *Drosophila melanogaster*, *Drosophila simulans*, reproductive parasitism, cytoplasmic incompatibility, mobile genetic elements, hybrid dysgenesis.

Взаимодействие *Wolbachia pipientis* с мобильными элементами генома дрозофилы: краткий обзор возможных случаев и предположений
И.Д.Городнянский

Wolbachia pipientis – ендосимбиотическая бактерия, широко распространённая внутри популяций многих видов артропод. Одной из её наиболее интересных особенностей считается то, что она является так называемым репродуктивным паразитом – микроорганизмом, способным влиять на размножение организма-хозяина. Вольбахия широко распространена внутри популяций различных видов плодовых мушек рода *Drosophila*. По оценкам учёных, на сегодня инфицированными являются около 80% природных популяций. Среди содержащихся в лабораториях линий *Drosophila melanogaster*

инфицированы более 60%, вследствие чего учёные, проводящие опыты на дрозофиле, невольно экспериментируют и с вольбахией. Несмотря на хорошую изученность *Wolbachia pipientis* в качестве репродуктивного паразита, другие аспекты её воздействия на организм хозяина еще не полностью ясны и представляют значительный интерес. Доказано, что вольбахия может являться симбионтом организма-хозяина, повышая его устойчивость к воздействию некоторых стрессирующих факторов, вирусным и бактериальным инфекциям. Неясными остаются механизмы взаимодействия вольбахии с геномом организма-хозяина. Основной целью данной работы являлся обзор возможного взаимодействия вольбахии с мобильными элементами генома дрозофилы и предполагаемых его механизмов. Рассматривается предположение о взаимосвязи вольбахии и мобильных элементов генома организма-хозяина в качестве компонентов единой регуляторной системы.

Ключевые слова: *Wolbachia pipientis*, *Drosophila melanogaster*, *Drosophila simulans*, репродуктивный паразитизм, цитоплазматическая несовместимость, мобильные элементы генома, гибридный дисгенез.

Wolbachia pipientis относится к группе альфа-протеобактерий и наиболее близка риккетсия-подобным бактериям *Cowdria* и *Anaplasma* – патогенам млекопитающих, переносимым членистоногими. Об этой внутриклеточной бактерии впервые сообщили в 1924 г. Хертиг и Вольбах как о новой риккетсии, найденной в яичниках комаров *Culex pipiens*. В 1936 г. Хертиг назвал риккетсию *Wolbachia* в честь своего коллеги Вольбаха. Цитоплазматическая несовместимость была впервые описана в 1951 г. Лавеном у комаров *Culex pipiens*. Лавен, изучая межпопуляционные скрещивания комаров из южной и северной Германии, показал, что при скрещивании самок линии *Ogglehausen* с самцами линии *Hamburg* личинки выходят лишь из 0,17% отложенных самками оплодотворённых яиц. Развившиеся из таких личинок взрослые особи являются самками (вследствие редкого партеногенеза), тогда как при реципрокных скрещиваниях этих же линий вылупляется до 87% личинок, а соотношение полов потомства оказывается близким 1 : 1. Во внутрилинейных скрещиваниях из оплодотворённых яиц вылупляется до 90% личинок, а соотношение полов потомства, как и в предыдущем случае, также оказывается близким 1 : 1 (Werren, 1997).

Для выяснения генетической природы односторонней несовместимости Лавен на протяжении более 50 поколений проводил возвратные скрещивания, результаты которых доказали цитоплазматический, а не хромосомный механизм этого явления. Соответственно, явление односторонней несовместимости было названо «цитоплазматической несовместимостью». В 1971 г. Йенсен и Барр обнаружили, что вольбахия вызывает несовместимость в скрещиваниях между инфицированными самцами и неинфицированными самками *Culex pipiens*. Ими же было предложено современное видовое название микроорганизма – *Wolbachia pipientis*. Интерес к бактерии возрос, когда стало понятно, что её эффекты не ограничены несовместимостью, как единственной модификацией репродукции, и комарами, как единственными хозяевами. Вольбахия была найдена у членистоногих и паразитических нематод (Werren, 1997; Clark et al., 2005).

Вольбахия – грамтрицательная неподвижная бактерия. Клетки вольбахии диморфны: либо очень мелкие (0,25–0,5 мкм), либо крупные (1–1,8 мкм) коккоидные, либо неправильной палочковидной формы (длина 0,5–1,3 мкм). В клетке она находится в цитоплазматических пузырьках и, подобно митохондриям, окружена двойной мембраной, внутренней слой которой представляет собой цитоплазматическую мембрану бактерии с остатками редуцированной клеточной оболочки, а внешний синтезируется клеткой хозяина. Способность синтезировать характерную для большинства свободноживущих грамтрицательных бактерий полноценную трёхслойную клеточную оболочку вольбахия утратила в процессе эволюции, став облигатным внутриклеточным паразитом. Вольбахия в основном присутствует в цитоплазме клеток репродуктивных органов, мальпигиевых сосудов, мышечных, нервных тканей и гемоцитов артропод (Stouthamer et al., 1999). Особенно велика численность бактерий в яичниках и семенниках. В яичниках наиболее инфицированными оказываются питающие клетки, в которых происходит размножение вольбахии. Содержимое питающих клеток используется для развития яиц, в которые бактерия попадает через цитоплазматические мостики (Clark, Karr, 2002). В яйце *Wolbachia pipientis* связана с микротрубочками. Предположительно, механизм цитоплазматической несовместимости, равно как и другие эффекты присутствия вольбахии, могут являться следствием изменений именно в этих структурах клетки (Pressgraves, 2000; Poinot et al., 2003; Werren et al., 2008).

На сьогоднішній день встановлено, що проявлення цитоплазматическої несовместимости является следствием частичного нарушения образования веретена деления в первом митотическом делении оплодотворённой зиготы (Tram, Sullivan, 2002). Отцовский набор хромосом не участвует в образовании метафазной пластинки и впоследствии элиминируется, в дальнейших делениях участвует только материнский набор хромосом. Образовавшийся зародыш оказывается гаплоидным либо анеуплоидным и чаще всего погибает (Werren et al., 2008).

Геном вольбахии невелик по размеру (у штамма *wMel* 1,267,782 пар оснований), что вообще характерно для бактерий – облигатных внутриклеточных паразитов, переложивших значительную часть задач собственного жизнеобеспечения на хозяина. Однако, в нём обнаружено необычайно большое количество мобильных генетических элементов (МГЭ) и повторяющихся последовательностей, что отличает вольбахию от всех остальных внутриклеточных бактерий. Это представляет собой парадокс, потому как в ходе упрощения генома мобильные генетические элементы, предположительно, должны элиминироваться в первую очередь, как вовсе не обязательные для выживания в столь стабильной среде, как цитоплазма клеток хозяина (Wu et al., 2004). Однако в литературе встречаются упоминания о возможном обмене участками генома вольбахии с X-хромосомой хозяина в процессе образования половых клеток (хотя многие авторы утверждают, что не нашли практического подтверждения таким данным). На основании этого можно сделать предположение о возможности периодического инфицирования вольбахии некоторыми мобильными элементами хозяев и, как следствие, совместного их распространения. Значительное количество повторяющихся последовательностей в геноме, в таком случае, может рассматриваться как защитное приспособление для компенсации действия таких занесённых извне МГЭ (Wu et al., 2004). Информация о возможности родства некоторых МГЭ вольбахии с мобильными элементами генома различных видов артропод, являющихся её хозяевами, в литературе на сегодняшний день почти отсутствует – доказанных упоминаний об исследованиях данного вопроса обнаружено не было. Кроме того, некоторые авторы (Wu et al., 2004) считают, что большое количество активных мобильных элементов в геноме вольбахии позволяет поддерживать генетическое разнообразие популяции бактерии и темп эволюции, сравнимый с таковым для организма-хозяина, в стабильной внутриклеточной среде. Предположение о том, что вольбахия могла обмениваться мобильными генетическими элементами с организмом-хозяином и осуществлять таким образом их горизонтальный перенос между различными популяциями внутри вида, уже появлялось в литературе (Марков, Захаров, 2004). Однако авторы, сомневаясь в возможности прямого обмена участками генома между вольбахией и организмом-хозяином, уделили этому вопросу мало внимания. Стоит отметить, что все работы по данной тематике посвящались изучению возможности подобного переноса отдельных конкретных участков генома хозяина. Примером может служить статья С.В.Серги с соавторами (Серга и др., 2010). Данная работа посвящалась исследованию влияния инфицирования *Drosophila melanogaster* вольбахией на частоту кроссинговера на определённом участке X-хромосомы. Исследовался участок хромосомы между генами *white* (*w*: 1–1,5) и *cut* (*ct*: 1–20,0). Результаты не показали статистически значимой связи между инфицированием вольбахией и частотой кроссинговера на данном участке. Однако самими авторами отмечено, что информация о сайт-специфичности встраивания генома вольбахии в геном организма-хозяина на данный момент отсутствует. Возможно, это происходит на каких-то определённых участках генома организма-хозяина. С другой стороны, в статье Natsuko Kondo и др. "Genome fragment of *Wolbachia* endosymbiont transferred to X chromosome of host insect" доказан факт обмена участками генома между вольбахией и хозяином на примере штамма *wBruAus Callosbruchus chinensis* (Kondo et al., 2002). Более того, в этой работе рассматривается генетическое сходство найденного в геноме хозяина участка генома штамма *wBruAus* с участками генома штамма *wMel*, инфицирующего *D. melanogaster*, а также идентичность некоторых мобильных элементов их генома. Дополнительно упоминается сходство одного из мобильных элементов генома исследуемого штамма вольбахии с мобильным генетическим элементом *I* генома *D. melanogaster*, что, однако, пока не может считаться доказательством их родства. Также встраивание участков генома *Wolbachia pipientis*, а в некоторых случаях и практически полноразмерного генома вольбахии, было доказано в более поздней статье "Widespread lateral gene transfer from intracellular bacteria to multicellular eukaryotes" (Hotopp et al., 2007). Авторы экспериментально показали встраивание участка генома вольбахии штамма *wAna* в генотип *Drosophila ananassae* штамма *Hawaii* и участка генома штамма вольбахии *wBm* в геном *Dirofilaria*

immitis. Вдобавок використовуваний в дослідженні участок генома вольбахії, обнаружений в генотипі *D. ananassae*, містив в собі два ретротранспозони, що показує можливість передачі мобільних генетических елементів вольбахії організму-хазяїну. Також на основі матеріала генетических банків було показано наявність «слідів» генома вольбахії в геномах багатьох інших організмів-хазяїв: *Brugia malayi*, *Culex pipiens*, *Ixodes scapularis*, багатьох видів ос і плодовых мушек (включаючи досліджувану ими *D. ananassae*).

Таким чином, припущення про ролі *Wolbachia pipiensis* в внутривидовому і міжвидовому розповсюдженні мобільних елементів генома як носія має під собою визначені основи і потребує в подальшому розгляді і дослідженні. Більше того: варто розглянути можливість більш тісної функціональної взаємодії вольбахії з мобільними елементами генома організму-хазяїна.

Історически і вольбахія, і мобільні генетическі елементи спочатку вважалися паразитами, не несущими ніякої користі для організму-хазяїна. В випадку мобільних елементів генома наука давно відійшла від концепції «еґоїстичної ДНК» (Pimpinelli et al., 1995). Було доведено, що мобільні генетическі елементи є важливим компонентом відповіді організму-хазяїна на вплив стресуючих факторів (наприклад, на тепловий або холодний шок) і інструментом довготривалого пристосування до несприятливим умовам оточуючої середовища (Ратнер, Васильєва, 1993, 2000; Васильєва і др., 2011). Вольбахія на даний момент теж перестає вважатися тільки паразитом (Weeks et al., 2002; Borhershtein et al., 2006; Charlat et al., 2006). Крім негативного впливу на хазяїна (проявлення цитоплазматическої несумісності, фемінізація самців, андродид, утворення партеногенетических популяцій виду-хазяїна) їй приписують і корисні для хазяїна властивості. Такі, наприклад, як підвищення стійкості хазяїна до вірусним (Hedges, Brownlie, 2008) і бактеріальним інфекціям, підвищення його життєспроможності і плодючості (Fry et al., 2004). Однак подібні аспекти інфікування вольбахією до сих пор залишаються малопонятними і недостатньо дослідженими, незважаючи на інтерес до даної теми (Weeks et al., 2007). В частині можливих взаємодій вольбахії з мобільними елементами організму-хазяїна абсолютно не досліджені, хоча деякі автори передбачають подібне (Белоусов, Козерецька, 2011). Наприклад, як можливого аспекта взаємодії можна згадати явище гібридного дисгенезу у *Drosophila melanogaster*. Важливою властивістю деяких мобільних генетических елементів є їх здатність індукувати гібридний дисгенез. Гібридним дисгенезом прийнято називати комплекс генетических аномалій, виникаючих внаслідок транспозицій МГЕ в статевих клітинах, таких як хромосомні аберації, нерасходження хромосом, діяльність різних MR-факторів (male recombination factors), до яких відносяться деякі МГЕ (Іванніков, 1995), суттєве підвищення частоти деяких мутацій і тому подібне. Крім усього перерахованого, одним з проявів гібридного дисгенезу є повна або частинна редукція гонад дисгенесних особин (Юрченко і др., 2011).

Не всі з множини мобільних елементів генома *Drosophila melanogaster* спроможні викликати гібридний дисгенез. На даний момент таке властивість доведено тільки для *P*, *hobo*, *I* і *Stalker* елементів. Найповніше досліджені системи дисгенесних схрещувань для перших трьох МГЕ. В лінійках з стабільним паттерном якого-небудь з наведених мобільних елементів завжди відзначається близько 5% дисгенесних особин, однак значиме підвищення гібридного дисгенезу проявляється тільки в потомстві визначених схрещувань. Для *P* елемента таким буде схрещування самки цитотипу *M* (maternal, т. є. не маючої в геномі копій *P* елемента) з самцем цитотипу *P* (paternal, несущого в геномі повнорозмірні і функціонально активні копії елемента *P*). При взаємному ж схрещуванні значимого рівня гібридного дисгенезу в потомстві не спостерігається. Дане явище було названо *P-M* системою гібридного дисгенезу (Bingham et al., 1982). *I-R* система гібридного дисгенезу в цілому ідентична *P-M* системі *P* елемента. *H-E* система МГЕ *hobo*, навпаки, характеризується появою значимої частини дисгенесних особин в потомстві кожного з взаємних схрещувань особи цитотипу *H* (маючої в геномі функціонально активні копії МГЕ *hobo*) з особою цитотипу *E* (данного мобільного елемента в геномі не маючої). Крім того, гібридний дисгенез може проявлятися і в потомстві від схрещування особин різних ліній *H* цитотипу (Юрченко і др., 2011). Механізм регуляції транспозицій мобільних елементів геному в системі дисгенесних схрещувань до сих пор не з'ясовано, і існують декілька припущень про його сутність, ні одне з яких повністю не описує

наблюдаемое явление (Мариловцева, Омелянчук, 2011). Основная сложность заключается в том, что в регуляции системы гибридного дисгенеза участвуют, очевидно, не только внутригеномные факторы. Взаимодействие мобильных элементов генома и *Wolbachia pipientis* вполне может быть одним из «недостающих звеньев» для понимания системы регуляции проявления гибридного дисгенеза (Белоусов, Козерецкая, 2011). К примеру, есть данные о взаимосвязи определённых штаммов вольбахии с цитотипом *Drosophila melanogaster* в P-M системе гибридного дисгенеза.

В статье М.Тюрелли и А.Хоффмана (1999) рассматривается предположение, что одной из функций вызываемой вольбахией цитоплазматической несовместимости может служить распространение в популяции организма-хозяина определённого специфического паттерна мобильных генетических элементов, связанного с данным штаммом вольбахии. Авторы описывают разработанную ими математическую модель распространения мобильного элемента генома в инфицированной вольбахией популяции организма-хозяина с учетом поддержания стабильного внутривидового уровня цитоплазматической несовместимости (Turelli, Hoffman, 1999). Экспериментальным примером служит популяция *Drosophila simulans*, поражённая вольбахией штамма *wRi*. В статье высказывается предположение, что паттерн мобильных генетических элементов *D. simulans*, ассоциированный со штаммом вольбахии *wRi*, может защищать организм-хозяин от проявления цитоплазматической несовместимости. В таком случае вольбахия и ассоциированные с ней мобильные элементы генома *Drosophila simulans* будут распространяться внутри популяции комплексно, как единая система. Также подобная система может служить для распространения и поддержания в популяции и определённого генотипа *D. simulans*, устойчивого к проявлениям цитоплазматической несовместимости, вызываемой данным штаммом вольбахии.

Как описание одного из возможных случаев взаимодействия вольбахии с мобильными элементами генома организма-хозяина можно привести и статью Ф.А.Урусова, Л.Н.Нефедовой и А.И.Ким, посвященную анализу ткане- и стадийспецифичности транскрипции ретротранспозонов *Drosophila melanogaster* группы *gypsy*. В результате исследования выяснили, что один из исследуемых мобильных генетических элементов – *Tirant* – транскрибируется крайне тканеспецифично: исключительно в яичниках взрослых самок дрозофилы (Урусов и др., 2011). Авторы выдвинули предположение о существовании каких-либо особых механизмов регуляции транспозиций данного мобильного генетического элемента. Учитывая тканевую локализацию транспозиций, исследование взаимосвязи мобильных элементов генома организма-хозяина с вольбахией на примере мобильного генетического элемента *Tirant* может оказаться весьма перспективным.

Можно сделать еще несколько предположений о том, в каких случаях вольбахия может взаимодействовать с мобильными элементами генома организма-хозяина как часть единой системы ответа организма на действие каких-либо внешних факторов. Стоит рассмотреть влияние вольбахии на организм хозяина в некоторых из них. Примерами таковых может служить, в первую очередь, влияние на организм теплового шока. В статье “Offsetting effects of *Wolbachia* infection and heat shock on sperm production in *Drosophila simulans*...” было описано отличие плодовитости инфицированных вольбахией самцов *D. simulans* в сравнении с неинфицированными (Snook et al., 2000). Авторы, исследуя влияния теплового шока на инфицированные вольбахией линии дрозофилы, пришли к интересным выводам. При тепловом шоке общая плодовитость инфицированной линии *D. simulans* и выработка самцами спермы значительно повышается вдобавок к снижению уровня цитоплазматической несовместимости, однако жизнеспособность самцов в некоторых случаях значительно снижалась. Кроме того, интенсивность выработки спермы у инфицированных самцов отличалась: в первые пять-десять дней жизни они продуцировали значительно меньше спермы, чем неинфицированные.

Следует отметить, что в литературе встречались также упоминания о возможном преимуществе сперматозоидов инфицированных вольбахией самцов над сперматозоидами самцов из неинфицированных популяций, однако механизм возникновения такого явления остается неясным (Серга, Козерецкая, 2013). В более ранних исследованиях также отмечалось повышение плодовитости в инфицированных вольбахией популяциях *Drosophila simulans* в качестве одного из компонентов ответа организма на воздействие теплового шока. В 1999 г. М.Е.Feder с соавторами опубликовали результаты исследования зависимости плодовитости *Drosophila simulans*, инфицированной вольбахией, от температуры обитания личинок. Полученные

данные также свидетельствовали о способности вольбахии значительно повышать плодовитость особей *Drosophila simulans*, снижая при этом их жизнеспособность (Feder et al., 1999).

Выводы

Доказано, что взаимодействие паразита и хозяина в процессе эволюции очень часто переходит в мутуализм или симбиоз. Чем сильнее влияния паразита на организм хозяина, тем быстрее должен проходить подобный эволюционный процесс. И *Wolbachia pipientis*, и мобильные генетические элементы представляют собой наглядный пример подобного перехода от паразитизма к мутуализму и симбиозу, становясь важными компонентами регуляторных систем хозяина. Однако вопрос их взаимодействия при влиянии обоих на организм хозяина на клеточном и геномном уровнях до сих пор остаётся практически неизученным, хотя представляет немалый интерес и потенциал для исследования.

Список литературы

- Белюсов А.О., Козерецкая И.А. Симбиотические бактерии, модифицирующие процессы репродукции у *Drosophila melanogaster* // Микробиологичний журнал. – 2011. – Т.73, №2. – С. 43–52. /Belousov A.O., Kozeretskaya I.A. Simbioticheskiye bakterii, modifitsiryuyushchiye protsessy reproduksii u *Drosophila melanogaster* // Mikrobiologichnyy zhurnal. – 2011. – T.73, no. 2. – S. 43–52./
- Васильева Л.А., Антоненко О.В., Захаров И.К. Роль мобильных генетических элементов в геноме *Drosophila melanogaster* // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2011. – Т.15, №2. – С. 225–260. /Vasil'yeva L.A., Antonenko O.V., Zakharov I.K. Rol' mobil'nykh geneticheskikh elementov v genome *Drosophila melanogaster* // Vavilovskiy zhurnal genetiki i seleksii. – 2011. – T.15, no. 2. – S. 225–260./
- Иванников А.В. Мутаторы класса MR и динамика аллелофонда природных популяций *Drosophila melanogaster*. Дисс... канд. биол. наук. – Институт генетики и цитологии СО РАН, 1995. – 96с. /Ivannikov A.V. Mutatory klassa MR i dinamika allelofonda prirodnykh populyatsiy *Drosophila melanogaster*. Diss... kand. biol. nauk. – Institut genetiki i tsitologii SO RAN, 1995. – 96s./
- Мариловцева Е.В., Омелянчук Л.В. P-элемент как инструмент анализа генома и протеома *Drosophila melanogaster* // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2011. – Т.15, №2. – С. 412–422. /Marilovtseva Ye.V., Omel'yanchuk L.V. P-element kak instrument analiza genoma i proteoma *Drosophila melanogaster* // Vavilovskiy zhurnal genetiki i seleksii. – 2011. – T.15, no. 2. – S. 412–422./
- Марков А.В., Захаров-Гезехус И.А. Геном вольбахии и молекулярные механизмы ее воздействия на хозяев. Специальное дополнение №1 к обзору «Бактерия вольбахия – повелитель мух». (<http://macroevolution.narod.ru/wolbachia.htm>, 2004) /Markov A.V., Zakharov-Gezekhus I.A. Genom vol'bakhii i molekulyarnye mekhanizmy yeye vozdeystviya na khozyayev. Spetsial'noye dopolneniye №1 k obzoru «Bakteriya vol'bakhiiya – povelitel' mukh»./
- Ратнер В.А., Васильева Л.А. Индукция транспозиций мобильных генетических элементов стрессовыми воздействиями // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – Т.6, №6. – С. 14–20. /Ratner V.A., Vasil'yeva L.A. Induktsiya transpozitsiy mobil'nykh geneticheskikh elementov stressovymi vozdeystviyami // Sorosovskiy obrazovatel'nyy zhurnal. – 2000. – T.6, no. 6. – S. 14–20./
- Ратнер В.А., Васильева Л.А. Мобильные генетические элементы (МГЭ) и эволюция геномов // Современные проблемы теории эволюции. – М.: Наука, 1993. – С. 43–59. /Ratner V.A., Vasil'yeva L.A. Mobil'nyye geneticheskiye elementy (MGE) i evolyutsiya genomov // Sovremennyye problemy teorii evolyutsii. – M.: Nauka, 1993. – S. 43–59./
- Серга С.В., Демидов С.В., Козерецкая И.А. Инфицирование *Wolbachia* не влияет на частоту кроссинговера у *Drosophila melanogaster* // Цитология и генетика. – 2010. – №42. – С. 55–60. /Serga S.V., Demidov S.V., Kozeretskaya I.A. Infitsirovaniye *Wolbachia* ne vliyayet na chastotu krossingovera u *Drosophila melanogaster* // Tsitologiya i genetika. – 2010. – No. 42. – S. 55–60./
- Серга С.В., Козерецкая И.А. Загадка распространения *Wolbachia* в природных популяциях *Drosophila melanogaster* // Журнал общей биологии. – 2013. – Т.74, №2. – С. 99–111. /Serga S.V., Kozeretskaya I.A. Zagadka rasprostraneniya *Wolbachia* v prirodnykh populyatsiyakh *Drosophila melanogaster* // Zhurnal obshhey biologii. – 2013. – T.74, no. 2. – S. 99–111./
- Урусов Ф.А., Нefeldова Л.Н., Ким А.И. Анализ ткане- и стадийспецифичности транскрипции ретротранспозонов *Drosophila melanogaster* группы *gypsy* // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2011. – Т.15, №2. – С. 283–288. /Urusov F.A., Nefedova L.N., Kim A.I. Analiz tkane- i stadiyespetsifichnosti transkripsii retrotranspozonov *Drosophila melanogaster* gruppy *gypsy* // Vavilovskiy zhurnal genetiki i seleksii. – 2011. – T.15, no. 2. – S. 283–288./
- Юрченко Н.Н., Коваленко Л.В., Захаров И.К. Мобильные генетические элементы: нестабильность генов и геномов // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2011. – Т.15, №2. – С. 261–270.

- /Yurchenko N.N., Kovalenko L.V., Zakharov I.K. Mobil'nyye geneticheskiye elementy: nestabil'nost' genov i genomov // Vavilovskiy zhurnal genetiki i selektsii. – 2011. – Т.15, no. 2. – S. 261–270./
- Bingham P.M., Kidwell M.G., Rubin G.M. The molecular basis of P-M hybrid dysgenesis: the role of P element, a P-strain-specific transposon family // *Cell*. – 1982. – Vol.29. – P. 995–1004.
- Borhershtein S.R., Marshall M.R., Fry A.J. et al. The tripartite association between bacteriophage, *Wolbachia* and Arthropods // *PLoS Pathogens*. – 2006. – Vol.2, iss.5. – P. 384–393.
- Charlat S., Hirst G.D.D., Mercot H. Evolutionary consequences of *Wolbachia* infections // *TRENDS in Genetics*. – 2006. – Vol.19, no. 4. – P. 217–223.
- Clark M.E., Karr T.L. Distribution of *Wolbachia* within *Drosophila* reproductive tissue: implications for the expression of cytoplasmic incompatibility // *Integrative and Comparative Biology*. – 2002. – Vol.42. – P. 332–339.
- Clark M.E., Anderson C.L., Cande J. Karr T.L. Widespread prevalence of *Wolbachia* in laboratory stocks and implications for *Drosophila* research // *Genetics*. – 2005. – Vol.170. – P. 1667–1775.
- Feder M.E., Karr T.L., Yang W. et al. Interaction of *Drosophila* and its endosymbiont *Wolbachia*: natural heat shock and the overcoming of sexual incompatibility // *American Zoology*. – 1999. – Vol.39. – P. 363–373.
- Fry A.J., Palmer M.R., Rand D.M. Variable fitness effects of *Wolbachia* infection in *Drosophila melanogaster* // *Heredity*. – 2004. – P. 1–11.
- Hedges L.M., Brownlie J.C., O'Neil S.L., Johnson K.N. *Wolbachia* and virus protection in insects // *Science*. – 2008. – Vol.322. – P.702.
- Hotopp J.C.D., Clark M.E., Oliveira D.C.S.G. et al. Widespread lateral gene transfer from intracellular bacteria to multicellular eukaryotes // *Science*. – 2007. – Vol.317. – P. 1753–1756.
- Kondo N., Nikoh N., Ijichi N. et al. Genome fragment of *Wolbachia* endosymbiont transferred to X chromosome of host insect // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 2002. – Vol.99, no. 22. – P. 14280–14285.
- Pimpinelli S., Berloco M., Fanti L. et al. Transposable elements are stable structural components of *Drosophila melanogaster* heterochromatin // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 1995. – Vol.92. – P. 3804–3808.
- Poinsot D., Charlat S., Mercot H. On the mechanism of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility: confronting the models with the facts // *BioEssays*. – 2003. – Vol.25. – P. 259–265.
- Pressgraves D.C. A genetic test of the mechanism of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility in *Drosophila* // *Genetics*. – 2000. – Vol.154. – P. 771–776.
- Snook R.R., Cleland S.Y., Wolfner M.F., Karr T.L. Offsetting effects of *Wolbachia* infection and heat shock on sperm production in *Drosophila simulans*: analyses of fecundity, fertility and accessory gland proteins // *Genetics*. – 2000. – Vol.155. – P. 167–178.
- Stouthamer R., Breeuver J.A.J., Hurst J.D.D. *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction // *Annual Reviews Microbiology*. – 1999. – Vol.296. – P. 1124–1126.
- Tram U., Sullivan Y. Role of delayed nuclear envelope breakdown and mitosis in *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility // *Science*. – 2002. – Vol.53. – P. 71–102.
- Turelli M., Hoffmann A.A. Microbe-induced cytoplasmic incompatibility as a mechanism for introducing transgenes into arthropod populations // *Insect Molecular Biology*. – 1999. – Vol.8 (2). – P. 243–255.
- Weeks A.R., Turelli M., Harcombe W.R. et al. From parasite to mutualist: rapid evolution of *Wolbachia* in natural popylations of *Drosophila* // *PLoS Biology*. – 2007. – Vol.5, iss.7. – P. 997–1005.
- Weeks A.R., Reynolds K.T., Hoffmann A.A. *Wolbachia* dynamics and host effects: what has (and has not) been demonstrated? // *TRENDS in Ecology&Evolution*. – 2002. – Vol.17, no. 6. – P. 257–262.
- Werren J.H. Biology of *Wolbachia* // *Annual Reviews Entomology*. – 1997. – Vol.42. – P. 587–609.
- Werren J.H., Baldo L., Clark M.E. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology // *Nature reviews Microbiology*. – 2008. – Vol.6. – P. 741–751.
- Wu M., Sun L.V., Vamathevan J. et al. Phylogenomics of the reproductive parasite *Wolbachia pipientis* wMel: a streamlined genome overrun by mobile genetic elements // *PLoS Biology*. – 2004. – Vol.2, iss.3. – P. 0327-0341.

Представлено: О.В.Філіпцова / Presented by: O.V.Filipitsova
 Рецензент: Л.О.Атраментова / Reviewer: L.A.Atramentova
 Подано до редакції / Received: 10.10.2017

UDC: 576.316.352: 595.773.4:539.1.047

Особливості гомологічної кон'югації політенних хромосом за впливу мікрохвиль і статичного магнітного поля у *Drosophila melanogaster* Meig.
Л.Д.Дика, Л.О.Шакина, В.Ю.Страшнюк

Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна (Харків, Україна)
lilya_dikaya@ukr.net, LubovZ2003@gmail.com, volodymyr.strashnyuk@gmail.com

Метою роботи було вивчити вплив мікрохвильового випромінювання, статичного магнітного поля та їх сумісної дії на порушення гомологічного спарювання політенних хромосом у *Drosophila melanogaster* Meig. Матеріалом для дослідження була інbredна лінія *Canton-S*. Застосовували мікрохвилі з частотою 36,64 ГГц і щільністю потужності 1 Вт/м² протягом 30 секунд і статичне магнітне поле напруженістю 25 мТл протягом 5 хв. Вплив електромагнітних полів здійснювали на стадії яйця після 2-годинної яйцекладки. Політенні хромосоми досліджували на давлених препаратах слинних залоз, забарвлених ацетоорсеїном. Для приготування препаратів використовували самок на стадії 0-годинної передлялечки. Мікрохвилі зменшували частоту асинапсису гомологічних хромосом на 18,1%. Статичне магнітне поле не мало значущого впливу. Комбінована дія цих чинників зменшувала частоту асинапсису в гігантських хромосомах дрозофіли на 37,1%. Отримані результати свідчать про вплив електромагнітних чинників на гомологічну кон'югацію хромосом в ядрах соматичних клітин. Таким чином, показана можливість їх впливу на транс-взаємодії локусів гомологічних хромосом.

Ключові слова: гігантські хромосоми, дрозофіла, гомологічна кон'югація, мікрохвилі, статичне магнітне поле, транс-взаємодії.

Peculiarities of homologous conjugation of polytene chromosomes after exposure to microwaves and static magnetic field in *Drosophila melanogaster* Meig.

L.D.Dyka, L.A.Shakina, V.Yu.Strashnyuk

The purpose of this investigation was to study the effect of microwave irradiation, static magnetic field and their combined action on the violation of homologous pairing of polytene chromosomes in *Drosophila melanogaster* Meig. Inbred line *Canton-S* was used as an experimental object. Microwaves with frequency 36.64 GHz and power density 1 W/m² for 30 sec and static magnetic field of 25 mT intensity for 5 min were used. Exposure to electromagnetic fields was applied at the egg stage after 2-hour oviposition. Polytene chromosomes were examined in squashed salivary glands preparations stained with acetoorcein. For preparations, females at the 0-hour prepupa stage were used. Microwaves decreased the asynapsis frequency of homologous chromosomes by 18.1%. The constant magnetic field had no significant effect. Combined action of these factors decreased the asynapsis frequency in *Drosophila* giant chromosomes by 37.1%. Obtained results testify to the influence of electromagnetic factors on the homologous pairing of chromosomes in the nuclei of somatic cells. Thus, the possibility of their effect on the trans-interactions of the loci of homologous chromosomes is shown.

Key words: giant chromosomes, *Drosophila*, homologous conjugation, microwaves, static magnetic field, trans-interactions.

Особенности гомологичной конъюгации политенных хромосом при действии микроволн и постоянного магнитного поля у *Drosophila melanogaster* Meig.

Л.Д.Дикая, Л.А.Шакина, В.Ю.Страшнюк

Целью работы было изучить влияние микроволнового излучения, постоянного магнитного поля и их сочетанного действия на нарушение гомологичного спаривания политенных хромосом у *Drosophila melanogaster* Meig. Материалом для исследования служила инbredная линия *Canton-S*. Применяли микроволны с частотой 36,64 ГГц и плотностью мощности 1 Вт/м² в течение 30 секунд и постоянное магнитное поле напряжённостью 25 мТл в течение 5 мин. Воздействие электромагнитных полей производили на стадии яйца после 2-часовой яйцекладки. Политенные хромосома исследовали на давлених препаратах слюнных желёз, окрашенных ацетоорсеином. Для приготовления препаратов

использовали самок на стадии 0-часовой предкуколки. Микроволны уменьшали частоту асинопсиса гомологичных хромосом на 18,1%. Постоянное магнитное поле не имело значимого эффекта. Комбинированное действие этих факторов уменьшало частоту асинопсиса в гигантских хромосомах дрозофилы на 37,1%. Полученные результаты свидетельствуют о влиянии электромагнитных факторов на гомологичную конъюгацию хромосом в ядрах соматических клеток. Таким образом, показана возможность их влияния на транс-взаимодействия локусов гомологичных хромосом.

Ключевые слова: гигантские хромосомы, дрозофила, гомологичная конъюгация, микроволны, постоянное магнитное поле, транс-взаимодействия.

Introduction

In recent decades a new important environmental factor has emerged and developed – electromagnetic fields (EMFs) of anthropogenic origin (Shckorbatov, 2014). Technological equipments for various purposes using microwave radiation are widely introduced. These are variable and pulsed magnetic fields, medical therapeutic and diagnostic facilities, visual information displays on cathode ray tubes (monitors, computers, televisions, etc.), industrial equipment with power supply, household appliances, personal communications (mobile phones) and the like. For today, we can state an increase in the effect of electromagnetic radiation on living organisms. The World Health Organization has included this issue in the list of the most pressing for humanity (WHO, 1997). International Agency for Research on Cancer (IARC) considers radiofrequency EMFs as potentially carcinogenic to humans (WHO/IARC, 2011).

The biological effects of EMFs are intensively studied at various objects and at different levels of the organization. In view of genetics, research on the chromosome level is of particular interest. A convenient object for this is the giant chromosomes of Diptera, which represent a modification of the actively functioning interphase chromosomes.

The capacity for homologous pairing is a fundamental property of eukaryotic chromosomes. Homologous and non-homologous (ectopic) chromosome associations play an important role in the spatial organization of the cell nucleus, providing functional connections of the different elements of genome. This issue is being considered currently in the light of the epigenetic control of gene expression (Duncan, 2002; Stegnyy, 2006; Schneider, Grosschedl, 2007).

In most cases, homologous chromosomes in *Drosophila* polytene nuclei tightly conjugated to each other. But often the conjugation is broken, there is an asynapsis phenomenon.

Asynapsis was investigated in homo- and heterozygous organisms. The interline differences in the frequency of violations of homologous chromosomes pairing were shown. The increase of spontaneous asynapsis was observed due to hybridization in the study of heterosis phenomenon (Lapta, Shakhbazov, 1976; Shakina et al., 2005; Taglina, 2006), as well as in interspecific hybrids of *Drosophila* (Evgen'ev, Polianskaya, 1976).

There are too few works, dealing with violations of conjugation of polytene chromosomes due to exogenous influences (Navrotskaya, 2006; Vasserlauf et al., 2008). Researches in this direction are very promising, given the association of terminal points of asynapsis with heterochromatic regions (Lapta, 1977), which are known to have a high polymorphism and dynamic structure (Grewal, Jia, 2007).

It should be also noted a lack of researches on the effects of EMFs on the chromosomal level (Tonomura et al., 1990, 1992; Goodman, Blank, 1998). In our previous works, we studied the effect of microwaves irradiation and a constant magnetic field on the puffing activity (Shakina et al., 2011) and endoreduplication (Dyka et al., 2016) in polytene chromosomes. An additional reason for our study were modifications of trans-inactivation effect under the influence of microwave irradiation, depending on the presence or absence of synapsis of homologous chromosomes, found in experiments on *Drosophila* (Shckorbatov et al., 2004).

The purpose of this investigation was to study the effects of microwave radiation, a constant magnetic field and their combined action on violations of the homologous pairing of polytene chromosomes in *Drosophila melanogaster* Meig.

Objects and methods of research

Studies were carried out on inbred strain *Canton-S*. This strain was obtained from *Drosophila* collection of the Department of Genetics and Cytology of the Kharkiv National University through inbred breeding by mating siblings. The degree of inbreeding before experiments was 77 generations.

Flies were grown on standard sugar-yeast medium at $24.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$. *Drosophila* culture developed in vials of 60 ml. The volume of culture medium in each vial was 10 ml.

EMF exposures were done by using an microwave emitter, which generates linearly polarized EMF with a frequency of 36.64 ± 0.05 GHz. This semi-conductor device was designed and constructed at the Department of Theoretical Radiophysics of V.N.Karazin Kharkiv National University based Gunn diode (the author is V.N.Bykov). Microwaves of this frequency refer to the Ka band (27–40 GHz). Such radiation is used in various radar systems (Richards, 2014). The power density in our experiments was 1 W/m^2 , exposure time – 30 sec. The distance between the emitting antenna horn edge and the eggs was 15 cm. The SAR (Specific Absorption Rate) was 4 W/kg . In the literature, the level of microwave radiation below 100 W/m^2 assumed as not thermal (Michaelson, 1980).

In addition, exposure to static magnetic field with 25 mT intensity for 5 min was applied. We studied separately the effects of a single exposure to microwaves or magnetic field as well as the sequential action of microwaves and magnetic fields.

Exposure to EMFs was applied in early embryogenesis. We used newly-laid *Drosophila* eggs obtained from the five-day-old flies after a short 2-hour lay. Eggs were laid on the fresh culture medium surface and then were exposed. Examinations of the effects of EMFs were performed at the 0-hour prepupa stage. It is known that asynapsis pattern is formed in the early stages of development and doesn't vary in larvae of different age (Lapta, Shakhbazov, 1976). In the control experiments *Drosophila* "sham eggs" were not exposed to microwave irradiation and magnetic field.

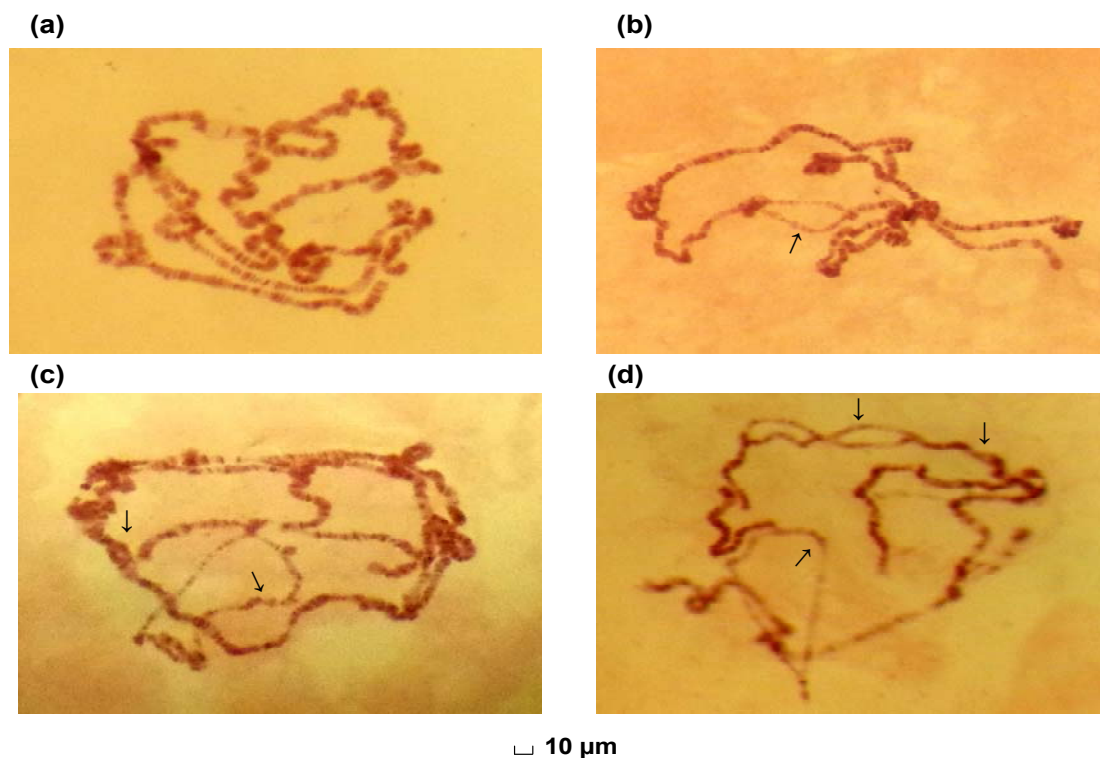


Fig. 1. Giant chromosomes of *Drosophila melanogaster* stained by acetoorcein with different number of asynapsis regions: (a) asynapsis is absent; (b) a single asynapsis; (c) two asynapsis segments; (d) three asynapsis segments

Polytene chromosomes were examined on squashed salivary glands preparations, stained with acetoorcein: 2% orcein (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) solution in 45% acetic acid (Reahimtrans, Kyiv, Ukraine). For preparations, females at the 0 hours prepupae stage were used. The preparations were analyzed by light microscopy (MBI-6 microscope, "LOMO", St. Petersburg, Russia) at magnification $\times 200$. We assessed the percentage of nuclei with different number of asynapsis regions in the preparations: no asynapsis; a single asynapsis segment; two asynapsis segments; three and more

asynapsis segments (Fig. 1). The asynapsis frequency was defined as the ratio of non-conjugating chromosomal segments to the total number of investigated nuclei.

Experimental data were statistically analysed. Data are presented as the mean \pm standart error. For each experiment 10 larvae were used. The asynapsis regions were determined in 25–50 nuclei per preparation. We examined from 297 to 392 nuclei in each variant of experiment.

The significance of differences between the study groups was assessed using Student's *t*-test with the Bonferroni amendment for multiple comparisons. Results considered valid when $p < 0.017$.

Results

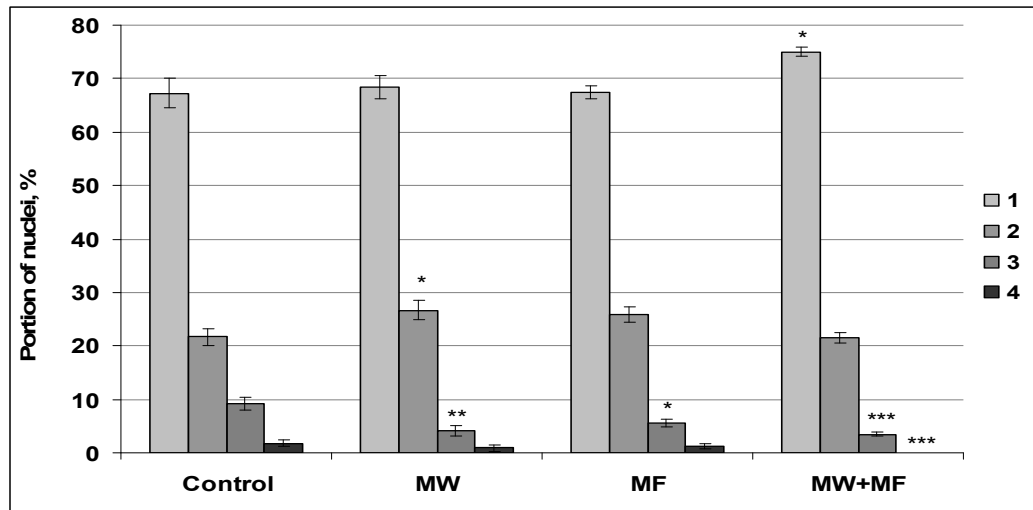
The percentage of nuclei with different number of asynapsis segments in *Drosophila melanogaster* in the control and after exposure to electromagnetic factors are presented in Fig. 2.

In the control group violations of conjugation of homologous chromosomes weren't found in 67.3% of the examined nuclei. The single asynapsis was revealed in 21.7% of the nuclei, 9.2% of nuclei had two violations of conjugation, in 1.8% cases three or more asynapsis segments were found.

After the exposure to microwave radiation, as well as after the action of a constant magnetic field, the percentage of nuclei without asynapsis didn't differ from control values. After the microwave irradiation the portion of nuclei with a single asynapsis section increased by 22.6%, the number of nuclei with two violations of synapsis decreased by 55.4%, while the percentage of nuclei with three or more asynapsis segments didn't differ from the control.

After the action of a constant magnetic field the content of nuclei with a single, as well as three or more violations of synapsis was the same as in the control, the proportion of nuclei with two asynapsis decreased by 39.1%.

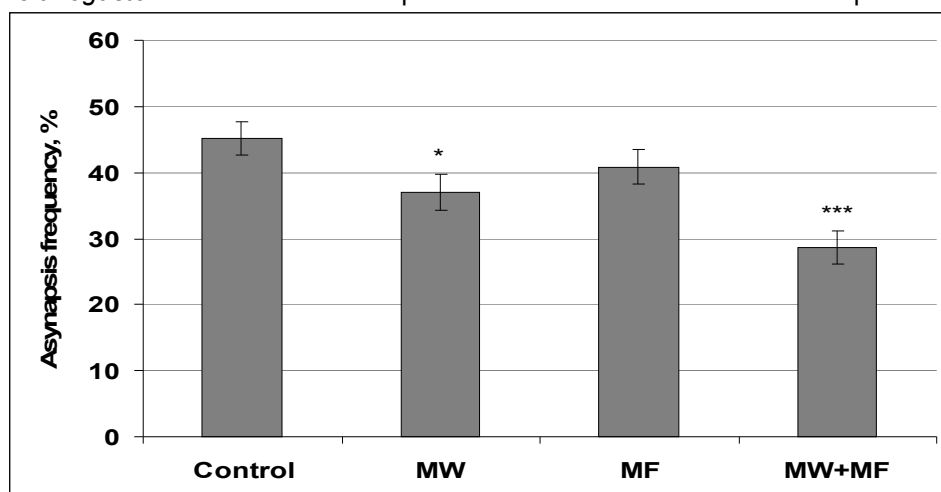
The most significant changes were found after the combined effects of microwaves and static magnetic field. The portion of nuclei without violations of chromosomes' pairing increased by 11.4%. The number of nuclei with a single asynapsis segment wasn't changed, the portion of nuclei with two asynapsis regions decreased by 62.0%, while the nuclei with three or more violations of synapsis weren't found.



* – $p < 0,017$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,00$: versus to control group

Fig. 2. The ratio of nuclei with different numbers of asynapsis segments in polytene chromosomes after microwave irradiation, the action of a constant magnetic field and their combined influence in *Drosophila melanogaster*: 1 – asynapsis is absent; 2 – a single asynapsis; 3 – two asynapsis segments; 4 – three asynapsis segments

The data on the portion of nuclei with different numbers of asynapsis segments were used for calculation of average frequency of violations of homologous conjugation in giant chromosomes in *Drosophila melanogaster* in norm and after experimental influences. The results are presented in Fig. 3.



* – $p < 0,017$; *** – $p < 0,001$: versus to control group

Fig. 3. The frequency of violations of homologous conjugation in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster* after the microwave irradiation, the action of a constant magnetic field and their combined effect

The average frequency of asynapsis in the control group was 45.2%. After the microwave irradiation decrease of the asynapsis frequency by 18.1% was observed. The influence of constant magnetic field wasn't statistically significant. The largest effect occurred when combined action of microwave radiation and magnetic field was applied: frequency of asynapsis decreased by 37.4% compared with the control. This index was also lower than after exposure to microwaves – by 23.5%, or a constant magnetic field – by 30.6%.

Thus, the 36.64 GHz microwave irradiation on the stage of embryogenesis with power density 1 W/m² and 30 sec of exposure led to reduction in of the homologous chromosomes asynapsis frequency in the salivary glands cells in *Drosophila melanogaster*. The constant magnetic field with 25 mT intensity for 5 min hadn't significant effect on the asynapsis frequency of itself, but significantly increased the effect of microwave radiation.

Discussion

The violations of conjugation of homologous chromosomes are of two types: specific and non-specific, or spontaneous. The first type is a regular asynapsis and associated with various pattern of chromosomal discs. This occurs, for example, as a result of interspecific hybridization (Evgen'ev, Polianskaya, 1976). The second type occurs when the picture of disks is identical and its nature is not fully understood (Lapta, 1977; Taglina, 2006).

There is ample evidence, which indicates that the principles of somatic and meiotic conjugation are the same (Martinez-Perez et al., 2001). In the literature, the synapsis of homologous chromosomes is explained by preferential attraction of certain chromosomal regions, which localization usually correlates with position of heterochromatin (Tiang, Pawlowski, 2012). It has been also shown that zones of violation of conjugation begin or end in the centromeric, telomeric and intercalary heterochromatin (Lapta, 1977).

The character of homologes interaction affects in a certain way on gene expression. There are examples of puffs heterozygosity in sites of asynapsis in interlinear hybrids of *Drosophila*: sizes of puffs derived from different parental lines differ in the asinapsys segments of homologous chromosomes (Ashburner, 1970; Strashnyuk et al., 2009). Such examples are also characteristic for interspecific hybrids in which the regularly asynapsis occurs apart from the spontaneous one (Ashburner, 1969).

Ashburner (1970) showed the influence of presence or absence of physical contact of homologous chromosomes on gene expression. In his view, synapsis may correct damages leading to restoration of gene activity that affects the puff morphology.

At present, it has been proven possible to restore a normal phenotype by interaction of differently damaged genes that are located in homologous chromosomes when they physically contact. This phenomenon is called transvection. Broadly, the transvection is such cis-trans interactions, which may be accompanied by either activation or inactivation of genes (Henikoff et al., 1995; Kennison, Southworth, 2002; Csink et al., 2002). This phenomenon is associated with subtle mechanisms of genes activity regulation observed in eukaryotic organisms of different taxa: fungi, higher plants, insects, mammals (Duncan, 2002).

An example is the effect of trans-inactivation (Kennison, Southworth, 2002; Csink et al., 2002). To study this effect, in particular, *Drosophila* line, comprising a mutation *brown*^{Dominant} (*bw^D*), is used. *bw^D* gene is able to inhibit the expression of the gene *bw⁺* and shows the effect of dominance in the case, if the conjugation of chromosomes occurs in the area in which *bw^D* and *bw⁺* genes are localized (Henikoff et al., 1995). Thus, by examining the expression of these genes, it is possible to judge on the changes in the subtle processes of chromosome interaction inside the cell nucleus.

Earlier in the line containing the mutation *bw^D*, the effect of microwave radiation on the manifestation of trans-inactivation effect in *Drosophila* was studied (Shckorbatov et al., 2004). The linearly polarized and the left polarized radiation with $\lambda=8$ mm, $E=0.2$ mW/cm² caused increased trans-inactivation effect, manifested in the reduction of pigment in the eyes of the flies. This indicated an increase in homologous chromosomes conjugation degree in the cell nucleus. Right polarized radiation, on the contrary, caused an increase in pigment content, i.e. trans-inactivation effect decreased. Thus, it was shown the effect of electromagnetic waves on gene expression, which is associated with the state of conjugation of chromosomes in the nucleus.

The data of this study are consistent with the effect of microwaves on the manifestation of trans-inactivation effect. In our study, we applied linearly polarized EMF. The frequency of violations of homologous chromosomes pairing reduced as in the study of trans-inactivation effect. In the case of trans-inactivation authors judged about homologous chromosomes interaction indirectly, based on the data on mutant trait expressivity changes. The study of polytene chromosomes allows us to evaluate it directly by visual observation.

The effect of electromagnetic fields on the interaction of homologous chromosomes can be explained by taking into account the data about their impact on chromatin structure. Earlier in the human cells, it has been shown an increase of heterochromatin granules content in the nuclei under the influence of microwaves (Shckorbatov et al., 2009). Given that heterochromatic regions are the sites of synapsis initiation, the data on the increase of genome heterochromatinization degree under the influence of electromagnetic fields is consistent with homologous chromosomes asynapsis decrease. The dependence of asynapsis frequency on the amount of heterochromatin was demonstrated earlier (Belyaeva, 1973; Lapta, 1977).

Heterochromatinization apparently is a manifestation of a more general cell response on the stress, as DNA in a tightly packed chromatin is better protected against damaging influences. The signal for the conformational changes in the chromatin may be due to the change of ionic composition in cytoplasm and karyoplasm associated with the changes in membrane permeability, which takes place under microwave irradiation of the cell (Skamrova et al., 2013).

The magnetic fields also can induce the stress response in Diptera (Goodman, Blank, 1998). Exposure to low frequency magnetic field induced transcription in specific regions of giant chromosomes in *Drosophila melanogaster* and *Sciara coprophila*. The activation of heat shock transcriptional factor (HSF1), increase in the synthesis of stress protein hsp 70, and 3–4-fold increase of heat shock element binding activity were shown.

Conclusions

In the present study, exposure to microwave radiation (frequency – 36.64 GHz, power density – 1 W/m², exposure time – 30 sec) on the stage of embryogenesis decreased the asynapsis frequency of homologous chromosomes in the salivary glands cells of *Drosophila melanogaster* by 18.1%. The constant magnetic field (intensity 25 mT, exposure time – 5 min) had no significant effect. Combined action of microwaves and static magnetic field decreased the asynapsis frequency in *Drosophila* polytene

chromosomes by 37.1%. Obtained results testify to the influence of electromagnetic factors on the homologous pairing of chromosomes in the nuclei of somatic cells. Thus, the possibility of their effect on the trans-interactions of the loci of homologous chromosomes is shown.

Acknowledgements

The authors are grateful to Professor L.A.Atramentova, the Head of Department of Genetics and Cytology, V.N.Karazin Kharkiv National University, for helpful advice on statistical methods.

References

- Ashburner M. Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of *Drosophila*. III. A comparison of the autosomal puffing patterns of the sibling species of *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans* // *Chromosoma*. – 1969. – Vol.27. – P. 64–85.
- Ashburner M. The genetic analysis of puffing in polytene chromosomes of *Drosophila* // *Proc. Roy. Soc. Lond.* – 1970. – B176. – P. 319–327.
- Belyaeva E.S. Asynapsis of homologues in *Drosophila melanogaster* salivary chromosomes // *Dros. Inf. Serv.* – 1973. – Vol.50. – P.40.
- Csink A.K., Bounoutas A., Michelle L. et al. Differential gene silencing by *trans*-heterochromatin in *Drosophila melanogaster* // *Genetics*. – 2002. – Vol.160. – P. 257–269.
- Duncan I.W. Transvection effects in *Drosophila* // *Annu. Rev. Genet.* – 2002. – Vol. 36. – P. 521–556.
- Dyka L.D., Shakina L.A., Strashnyuk V.Yu., Shckorbatov Yu.G. Effects of 36,6 GHz and static magnetic field on degree of endoreduplication in *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2016. – Vol.92 (4). – P. 222–227.
- Evgen'ev M.B., Polianskaya G.G. The pattern of polytene chromosome synapsis in *Drosophila* species and interspecific hybrids // *Chromosoma*. – 1976. – Vol.57. – P. 285–295.
- Goodman R., Blank M. Magnetic field stress induces expression of hsp 70 // *Cell Stress Chaperon*. – 1998. – Vol.3 (20). – P. 79–88.
- Grewal S.I.S., Jia S. Heterochromatin revisited // *Nat. Rev. Genet.* – 2007. – Vol.8. – P. 35–46.
- Henikoff S., Jackson J.M., Talbert P.B. Distance and pairing effects on the brown Dominant heterochromatic element in *Drosophila* // *Genetics*. – 1995. – Vol.140. – P. 1007–1017.
- Kennison J.A., Southworth J.W. Transvection in *Drosophila* // *Adv. Genet.* – 2002. – Vol.46. – P. 399–420.
- Lapta G.E. Localization of asynaptic segments for 2R and 3L chromosomes with a failure of pairing of polytene chromosomes in *Drosophila melanogaster* // *Genetics (USSR)*. – 1977. – Vol.13 (6). – P. 1064–1072. (in Russian)
- Lapta G.E., Shakhbazov V.G. The pattern of asynapsis of polytene chromosomes in inbred lines of *Drosophila melanogaster* and in the F₁ derived from reciprocal crosses between them // *Genetics (USSR)*. – 1976. – Vol.12 (2). – P. 121–126. (in Russian)
- Martinez-Perez E., Shaw P., Moore G. The Ph1 locus is needed to ensure specific somatic and meiotic centromere association // *Nature*. – 2001. – Vol.411. – P. 204–207.
- Michaelson S.M. Microwave biological effects: an overview // *Proc. IEEE*. – 1980. – Vol.68 (1). – P. 40–49.
- Navrotskaya V.V. Manifestation of quantitative traits in intrasrain crosses depending on parent generation keeping conditions in *Drosophila melanogaster* Meig. and *Bombyx mori* L. Thesis for Candidate of Biological Sciences degree / 03.00.15 – genetics. – V.N.Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, 2006. – 20p.
- Richards M.A. Fundamentals of radar signal processing. 2nd ed. – McGraw-Hill Education, 2014. – 656p.
- Shakina L.A., Pasiuga V.N., Dumin O.M., Shckorbatov Yu.G. Effects of microwaves on the puffing pattern of *D. melanogaster* // *Cent. Eur. J. Biol.* – 2011. – Vol.6 (4). – P. 524–530.
- Shakina L.A., Strashnyuk V.Yu., Shakhbazov V.G. Peculiarities of homologous and non-homologous pairing of polytene chromosomes in the inbred lines and hybrids of *Drosophila* // *The Journal of V.N.Karazin National University. Series "Biology"*. – 2005. – Issue 709 (1–2). – P. 105–110. (in Russian)
- Shckorbatov Y. The main approaches of studying the mechanisms of action of artificial electromagnetic fields on cell // *J. Electr. Electron. Syst.* – 2014. – Vol.3 (2). – P.123.

- Shckorbatov Y.G., Evseeva M.V., Shakhbazov V.G. et al. The influence of the microwave radiation of different polarization on transactivation effect and viability of *Drosophila* // Bulletin of Problems Biology and Medicine. – 2004. – Vol.4. – P. 36–41. (in Russian)
- Shckorbatov Yu.G., Pasiuga V.N., Kolchigin N.N. et al. The influence of differently polarised microwave radiation on chromatin in human cells // Int. J. Radiat. Biol. – 2009. – Vol.85 (4). – P. 322–329.
- Skamrova G.B., Lantushenko A.O., Shckorbatov Yu.G., Evstigneev M.P. Influence of mobile phone radiation on membrane permeability and chromatin state of human buccal epithelium cells // Biochemistry and Biophysics. – 2013. – Vol.1 (2). – P. 22–28.
- Schneider R., Grosschedl R. Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression // Gene. Dev. – 2007. – Vol. 21. – P. 3027–3043.
- Stegniy V.N. Evolutionary significance of chromosome architecture for epigenetic control of eukaryote development and phylogeny // Russ. J. Genet. – 2006. – Vol.42 (9). – P. 1215–1224. (in Russian)
- Strashnyuk V.Yu., Taglina O.V., Gorenskaya O.V., Shakina L.A. Some peculiarities of structural and functional organization of polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster* in relation to heterosis // Factors in experimental evolution of organisms. – Kyiv: Logos, 2009. – Vol.6. – P. 187–191. (in Russian)
- Taglina O.V. Investigation of spontaneous asynapsis of salivary gland polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster* in highly inbred lines and their hybrids // The Journal of V.N.Karazin National University. Series "Biology". – 2006. – Issue 729 (3). – P. 136–140. (in Russian)
- Tiang Ch.-L., Pawlowski W.P. Role of telomeres and centromeres in meiotic chromosome pairing // In: Access Science, ©McGraw-Hill Education, 2012. (<http://www.accessscience.com>)
- Tomomura Y., Shima T., Suzuki K., Kishi M. Effects of microwaves and magnetic fields on *Drosophila* // Sci. Rep. Tokyo Woman's Christ. Univ. – 1990. – Vol.40. – P. 1031–1049.
- Tomomura Y., Shima T., Kimura K. Effects of microwaves on *Drosophila*. Part 2 // Rep Tokyo Woman's Christ Univ. – 1992. – Vol.42. – P. 1159–1175.
- Vasserlauf I.E., Shelkovnikova T.A., Mitrenina E.Y., Stegnyy V.N. The effect inbreeding and low temperature on the pattern of chromosome synapsis in the ovarian nurse nuclei of *Drosophila melanogaster* strains // Russ. J. Genet. – 2008. – Vol.44 (8). – P. 1066–1074. (in Russian)
- WHO/International Agency for Research on Cancer (IARC). 2011. Press Release No 208, 31 May.
- WHO International EMF Project. 1997.

Представлено: Н.О.Мазник / Presented by: N.A.Maznyk
Рецензент: Ю.Г.Шкорбатов / Reviewer: Y.G.Shckorbatov
Подано до редакції / Received: 16.10.2017

UDC: 57.044: 57.055: 57.017.3+5

**Зміни репродуктивних показників *Drosophila melanogaster* при дії
низьких концентрацій неонікотиноїдів та ніацину на личинковій стадії**
В.А.Ковач, Н.С.Філіпоненко, Н.В.Колот, Н.Є.Волкова

Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна (Харків, Україна)
natalia.volkova@karazin.ua

З моменту відкриття неонікотиноїди вважалися найбільш перспективними сполуками з інсектицидною активністю в силу специфічної дії на нікотинові ацетилхолінові рецептори саме комах і низьку токсичність для ссавців у використовуваних діапазонах концентрацій, а також у зв'язку з відсутністю формування стійкості до них у комах. Уведення неонікотиноїдів у сільськогосподарську практику дозволило істотно підвищити врожайність різних культур. Однак при активному повсюдному використанні даного класу інсектицидів було виявлено цілу низку негативних наслідків, зокрема для комах-запилювачів. Виявлення даних ефектів призвело до суттєвого обмеження або до заборони використання даних сполук у сільськогосподарській практиці ряду країн. Україна до переліку цих країн не входить. Виходячи з того, що препарати даного класу вільно продаються і безконтрольно використовуються, відповідні діючі речовини постійно присутні в агроценозах, та їх залишкові (не летальні) концентрації можуть впливати на життєдіяльність і репродукцію комах, причому як шкідників, так і корисних або нейтральних. Дане дослідження є експериментальним порівняльним аналізом впливу залишкових концентрацій інсектицидів неонікотиноїдного ряду і нікотинової кислоти на особливості розмноження дрозофіли. Результати експерименту показали, що нікотинова кислота чинить подібний за напрямком (пригнічення), але менш сильний (у порівнянні з використаними інсектицидами) вплив на плодючість і життєздатність генетично різних ліній дрозофіли. Виявлено генотип-залежні ефекти досліджених домішок на смертність на стадії лялечки. Встановлено також, що серед нащадків особин, які пережили вплив, частка таких, які доживають до личинкової стадії, збільшується у порівнянні з контрольною групою. Іншими словами, залежно від генотипу тривалий (в онтогенезі) вплив неонікотиноїдів і нікотинової кислоти в низьких концентраціях може зсувати добір у потомстві особин, які пережили вплив, з ранньої ембріональної стадії у бік батьківських особин (тобто впливати на гаметогенез і життєздатність гамет).

Ключові слова: дрозофіла, інсектициди, неонікотиноїди, нікотинова кислота, залишкові концентрації, плодючість, життєздатність, смертність на стадії лялечки, ембріональна смертність, добір.

**Larval exposure to low concentrations of neonicotinoids and niacin affects
Drosophila melanogaster indices of reproductive success**
V.A.Kovach, N.S.Filiponenko, N.V.Kolot, N.Ye.Volkova

Since the discovery, neonicotinoids have been considered as the most promising compounds with insecticidal activity due to the specific effect on nicotinic acetylcholine receptors of insects and low toxicity for mammals in the applied concentration ranges, and also because of the lack of resistance formation to them in insects. Neonicotinoids introduction into agricultural practice has resulted in significant increase of different crops yields. However, with the active widespread use of this class of insecticides, a number of negative consequences have been identified, in particular for pollinating insects. The detection of these effects led to a significant restriction or ban on these compounds use in agricultural practices in a number of countries. Ukraine is not among them. Considering that insecticides of this class are freely sold and their use is uncontrolled, the corresponding active substances are constantly present in agroecosystems, and their residual (non-lethal) concentrations can affect the viability and reproduction of insects, both harmful and useful or neutral. This study is an experimental comparative analysis of the effect of residual concentrations of neonicotinoid insecticides and nicotinic acid on *Drosophila* reproduction. The results of the study have shown that nicotinic acid has a similar (inhibition), but less strong (in comparison with the insecticides used) effect on the fertility and viability of genetically different *Drosophila* stocks. The genotype-dependent effects of the studied compounds on the lethality at pupa stage have been revealed. It has also been established that among the offspring of individuals who survived under the effect of neonicotinoids and niacin, the proportion of those who survive to the larval stage increases in comparison with the control group. Therefore, depending on the genotype, the long-term (in ontogenesis) effects of neonicotinoids and nicotinic acid at low concentrations may shift the selection in the offspring of exposed individuals from the early embryonic stage towards the parents (i.e., affect gametogenesis and viability of gametes).

Key words: *drosophila*, insecticides, neonicotinoids, nicotinic acid, residual concentrations, fertility, viability, lethality at pupa stage, embryonic lethality, selection.

**Изменения репродуктивных показателей *Drosophila melanogaster* при
воздействии низких концентраций неоникотиноидов и ниацина на
личиночной стадии****В.А.Ковач, Н.С.Филипоненко, Н.В.Колот, Н.Е.Волкова**

С момента открытия неоникотиноиды считались наиболее перспективными соединениями с инсектицидной активностью в силу специфического действия на никотиновые ацетилхолиновые рецепторы именно насекомых и низкой токсичности для млекопитающих в используемых диапазонах концентраций, а также в связи с отсутствием формирования устойчивости к ним у насекомых. Введение неоникотиноидов в сельскохозяйственную практику позволило существенно повысить урожайность различных культур. Однако при активном повсеместном использовании данного класса инсектицидов был выявлен целый ряд негативных последствий, в частности для насекомых-опылителей. Обнаружение данных эффектов привело к существенному ограничению или к запрету использования данных соединений в сельскохозяйственной практике ряда стран. Украина в число этих стран не входит. Исходя из того, что препараты данного класса свободно продаются и бесконтрольно используются, соответствующие действующие вещества постоянно присутствуют в агроценозах, и их остаточные (не летальные) концентрации могут влиять на жизнедеятельность и репродукцию насекомых, причём как вредителей, так и полезных или нейтральных. Данное исследование представляет собой экспериментальный сравнительный анализ влияния остаточных концентраций инсектицидов неоникотиноидного ряда и никотиновой кислоты на особенности размножения дрозофилы. Результаты эксперимента показали, что никотиновая кислота оказывает сходное по направлению (угнетение), но менее сильное (по сравнению с использованными инсектицидами) действие на плодовитость и жизнеспособность генетически различных линий дрозофилы. Выявлены генотип-зависимые эффекты исследованных добавок на смертность на стадии куколки. Установлено также, что среди потомков особей, переживших воздействие, доля доживающих до личиночной стадии повышается по сравнению с контрольной группой. Другими словами, в зависимости от генотипа длительное (в онтогенезе) воздействие неоникотиноидов и никотиновой кислоты в низких концентрациях может смещать отбор в потомстве особей, переживших воздействие, с ранней эмбриональной стадии в сторону родительских особей (т.е. влиять на гаметогенез и жизнеспособность гамет).

Ключевые слова: дрозофила, инсектициды, неоникотиноиды, никотиновая кислота, остаточные концентрации, плодовитость, жизнеспособность, смертность на стадии куколки, эмбриональная смертность, отбор.

Introduction

Different species of phytophagous insects and other pests destroy crops, transmit plant diseases and compete for resources in various agro- and ecosystems affecting crop production that results in considerable yield losses (Tonngang et al., 2017). The search for unusual chemical structures for insect control optimization revealed neonicotinoids as a new class of insecticides (Tomizawa, Casida, 2009) with relatively low toxicity for mammals and environment. This class of systemically acting neurotoxic compounds is uptaken by plants, mainly through the roots, and is transmitted to all plant parts through xylema and phloema (Bromilow et al., 1990). This systemic property together with very high toxicity to insects enabled to propose neonicotinoids for protection of the whole plant from pest insects.

Neonicotinoids target the cholinergic system of insects' central nervous system (CNS) (Yamamoto, Casida, 1999). The nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) playing a central role in rapid cholinergic synaptic transmission (Sattelle, 1980; Sattelle, Breer, 1990) is an important target site. Neonicotinoids act mainly agonistically on nAChRs on the postsynaptic membrane, mimicking acetyl choline (ACh) by binding with high affinity (Buckingham et al., 1997; Matsuda et al., 2005) and inducing neuronal hyperexcitation, which can lead to the insect's death within minutes (Belzunces et al., 2012; Palmer et al., 2013; Tomizawa, Casida, 2005). The vertebrate nervous system nAChR binding sites differ from those in insects, and in general they have lower numbers of such receptors with high affinity to neonicotinoids, that makes neonicotinoids to show selective toxicity for insects in comparison with vertebrates (Tomizawa, Casida, 2005; Casida, 2010; Liu et al., 2010).

Although neonicotinoids are still successful in control of many insect species, their popularity has imposed a mounting natural selection pressure for increased resistance to neonicotinoids, and in several species resistance has now reached levels that compromise the effect. Resistance to neonicotinoids (imidacloprid) can arise either through nAChR subtypes expression, detoxification mechanisms and/or structural alterations of target-site proteins (Thany, 2010). However, experimental data on this problem are limited. For example, Chao, Casida (1997), Yamamoto, Casida (1999), Sheets (2002) have

demonstrated that low doses of neonicotinoids do not cause reproductive or developmental toxicity. For target-site resistance, field-evolved mutations have only been characterized in two aphid species. So, metabolic resistance appears much more common, with the enhanced expression of one or more cytochrome P450s frequently reported in resistant strains (Bass et al., 2015).

From the other hand, with the active widespread use of this class of insecticides, a number of negative consequences have been identified, in particular for pollinating insects (Moffat et al., 2016; Tomizawa, Yamamoto, 1992; Barbara et al., 2008; Shi et al., 2017; Di Prisco et al., 2013; Henry et al., 2012). The detection of these effects led to a significant restriction or ban on these compounds use in agricultural practices in a number of countries. Ukraine is not among them. Considering that insecticides of this class are freely sold and their use is uncontrolled, the corresponding active substances are constantly present in agroecosystems, and their residual (non-lethal) concentrations can affect the viability and reproduction of insects, both harmful and useful or neutral. This study is an experimental comparative analysis of the effect of residual concentrations of neonicotinoid insecticides and nicotinic acid on *Drosophila* reproduction.

Materials and methods

Two *Drosophila melanogaster* stocks were used to carry out the experiment: the wild type stock *Canton-S* (C-S) and the mutant one – *knirps* (*knir^{ri}*) from the Collection of drosophila stocks of Genetics and Cytology Department of V.N.Karazin Kharkiv National University that is among objects that constitute National Heritage of Ukraine. The gene *knirps* [*radius incompletus*] (*knir^{ri}*) occupies the 3-47.0 locus (<http://flybase.org/reports/FBgn0001320>). The normal allele of this gene ensures the formation of a complete radial wing vein, and *knir^{ri}* mutation interrupts the vein, dividing it into two fragments: proximal and distal (Vasilyeva, 2005). The mutation is characterized by 100% penetrance and highly variable expressivity, which, apparently, is controlled by several systems of modifier genes (Vasilyeva, 1984). The *knir^{ri}* stock used in the study was synthesized by N.S.Filiponenko from the original *st ri* stock using a system of crosses with the balancer stock *CyO/Pin; Ly/TM3*. The stock used here is characterized by stable phenotypic manifestation: the proximal part of radial wing vein presence only. The symbol *ri* will be used further to mark this stock through the text.

Insecticides thiamethoxam (MW 291.71) (3-[(2-Chloro-1,3-thiazol-5-yl) methyl]-5-methyl-N-nitro-1,3,5-oxadiazinan-4-imine) – ACTARA® (dry powder) – and acetamiprid (MW 222.676) (N-[(6-chloro-3-pyridyl)methyl]-N'-cyano-N-methylacetamidine) – MOSPILAN (dry powder), as well as NICOTINIC ACID – pyridine-3-carboxylic acid (MW 123.111) (in a solution) were used for the experiment. Actara is an insecticide used for cultivated plants protection from a complex of sucking and leaf-eating pests. Hazard category: according to FAO classification thiamethoxam consider to be moderately hazardous to humans (WHO class III). Route of entry: contact and oral. Manufacturer: Syngenta TM. Packing: bag 0,004 kg. Mospilan is a systemic insecticide of a broad-spectrum of action. Hazard category: according to US EPA acetamiprid has been classified as an “unlikely” human carcinogen, causing generalized, nonspecific toxicity in mammals, and did not appear to have specific target organ toxicity (https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-099050_15-Mar-02.pdf). Route of entry: contact and oral. Manufacturer: Nippon Soda Co., Ltd., Japan. Packing: soluble powder, available in foil bags of 2.5 g. Nicotinic acid (niacin) is water-soluble vitamin of the B complex required for the formation of coenzymes NAD and NADP (The vitamins ..., 2007). Manufacturer: PrJSC “Pharmaceutical Firm “Darnitsa”. Packing: solution for injection in vacuum sealed ampoules (10 mg/ml).

Neonicotinoids (Actara, Mospilan) and niacin were added to the culture medium (fed to the larvae), so that the final concentrations of supplements in the medium were 0.005 mg/ml and 0.01 mg/ml respectively. The need to use different concentrations is caused by the lethal effect of higher concentrations of neonicotinoids.

For each stock, the experiment was carried out according to the following scheme: from the collection, the parental pairs (P) of each stock were randomly selected for each studied group: control – offspring developed on a standard medium; experimental – the offspring developed on a medium with the addition of “Actara” (actara), “Mospilan” (mospilan) or “Nicotinic acid” (niacin). Parental individuals were placed in tubes with medium supplied with appropriate tested compounds (5 ml). In the offspring (F1) the number of individuals surviving to the stage of the pupa (fertility; number of individuals), the death rate during metamorphosis (pupa lethality; %), and the number of individuals surviving to the stage of adults (viability; number of individuals) were recorded. For this virgin females and males of each experimental

group (in the age of 3 days) were placed in test tubes with medium in the amount of 2♀ and 2♂. The egg laying period was 7 days. Then the parents were removed. For each experimental group we analyzed 5–10 tubes in parallel, the data on which were averaged. The analysis of changes occurred in gametes of individuals survived in the presence of neonicotinoids or niacin in the medium was carried out according to their progeny (F2). That is imagoes F1 were used as parents to assess embryonic mortality. The offspring F2 in all cases developed on a standard (minimal) medium.

As a criterion for changes occurring in gametes of imagoes, the frequency of dominant lethal mutations (DLM) at early stages of embryogenesis was used (Tikhomirova, 1990). The frequency of DLM was defined as the percentage of eggs that stopped their development at a certain stage to the total number of eggs laid. To perform the experiment, virgin imagoes F1 were separated according to their sex within the 1st day after eclosion and were kept separately until sexually mature age (three days) in vials with temporary culture medium. Then males and females were put together for 12 hours for mating. After that inseminated females were placed in Petri dishes (d=10 cm) with temporary medium in an amount of 10 individuals per dish for 8 hours to obtain eggs. After the time, egg production was counted. Accounting was carried out with stereoscopic microscope (Delta Optical NTX-3C). Then the eggs were placed in a thermostat (t=23°C) for 48 hours. After the time, the DLM level was recorded according to the following parameters: white eggs – early embryonic lethality (the first 6–9 hours of embryonic development) – eDML; yellow and brown – late embryonic lethality – IDLM. For each variant of the experiment, 5–15 measurements were performed. The term of egg development arrest was confirmed by comparison with the standard photos of different stages of *D. melanogaster* embryonic development (Bownes, 1975). For this purpose, from each Petri dish, separately white and yellow eggs were collected on the single concave microscope slides in a 3% solution of sodium hypochlorite (NaOCl), which provides rapid dechlorination of the embryo. The analysis of embryos was carried out using the microscope "Konus" (at magnification of ×400) (Kostenko et al., 2015). The time of egg development arrest was confirmed by microscopic studies for all undeveloped embryos.

For fertility and viability indicators the arithmetic means, standard deviations, and standard errors were calculated. The effect of neonicotinoids and niacin on these indicators of studied stocks was established using a quantitative analysis of variance (ANOVA). The effects of the genotype and the presence of supplements in the culture medium on the levels of pupa, early and late embryonic mortality were established by two-way analysis of variance for qualitative characteristics (Plokhinsky, 1969). Calculations were carried out using Microsoft Excel and Statistica 6.0 software.

Results and discussion

The results of the experiment show that fewer individuals of both used *Drosophila* stocks survived till pupa stage (Fig. 1) under the influence of supplements to the medium studied in concentrations under investigation. Anyway, initial differences in fertility between stocks (higher fertility in C-S; lower – in *ri* – Fig. 1, control) are observed in all experimental variants, even they become more distinct. The most pronounced reduction in fertility is observed in the case of larval development in culture medium supplied with actara (0.005 mg/ml). Mospilan (0.005 mg/ml) seems to be less effective. And in the case of C-S stock its effect does not differ from niacin one. On the contrary, in the case of *ri* stock it is almost as effective as actara. The effect of niacin is the weakest among supplements studied in spite of concentration being the highest (0.01 mg/ml).

The results of ANOVA corroborate significant genotype dependent ($F=75.33$; $p<0.001$) effect of supplement presence in culture medium ($F=29.05$; $p<0.001$), and reveal the interaction of two factors ($F=3.22$; $p<0.05$).

Surely, actively feeding larvae are affected by various chemical compounds used to protect plants, especially those of contact mechanism of action and due to oral consumption. So, the most active selection might take place within individuals at this stage; especially while the first contact with the agent. Still, applying various insecticides one should take into account different susceptibility (survivability) of individuals of different genotypes.

On the contrary to fertility index, the initial level of pupa lethality does not differ significantly between *D. melanogaster* stocks used when larvae develop in standard culture medium (Fig. 2). Both analyzed neonicotinoids demonstrate similar pronounced effect – rise of pupa lethality index in C-S stock, but not in *ri* stock. Niacin induces pupa lethality in *ri* stock but not in C-S stock. These results show that neonicotinoids-mediated effects at larva-pupa period was more pronounced in *ri* stock.

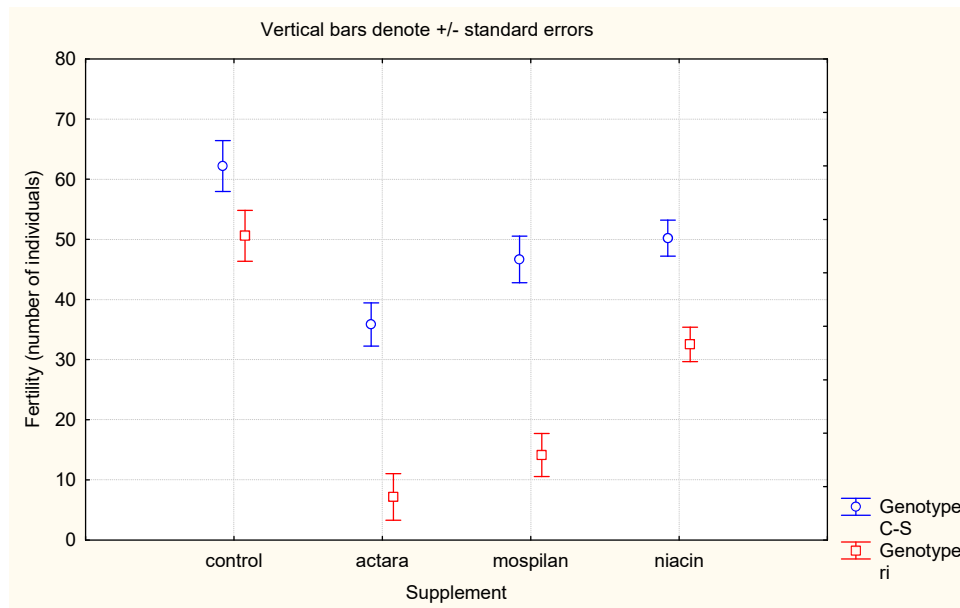


Fig. 1. The genotype dependent effects of larval exposure to low doses of neonicotinoids and niacin on *Drosophila melanogaster* fertility (blue, circles – C-S; red, squares – *ri*)

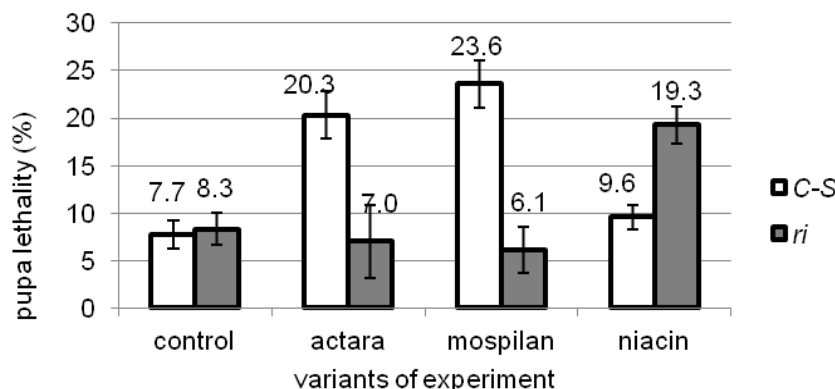


Fig. 2. The genotype dependent effects of larval exposure to low doses of neonicotinoids and niacin on *Drosophila melanogaster* pupa lethality

The results of two-way ANOVA for qualitative characteristics of *Drosophila melanogaster* pupa lethality index under larval exposure to low doses of neonicotinoids and niacin prove that existing variability of the index depends on the genotype ($F=16.35$; $p<0.001$), on the presence of supplement in culture medium ($F=6.26$; $p<0.001$), as well as on these two factors interaction ($F=24.27$; $p<0.001$).

The trend we observe for fertility index (Fig. 1) is kept for the viability of stocks studied (Fig. 3–5), although the analysis of sex-specific viability reveals (compare Fig. 3 and 4) that there are strong genotype-dependent differences in females' viability (the index for C-S stock is higher than for *ri*) but not in males' one when larvae develop in the standard culture medium. Under the influence of supplements used these differences become more pronounced, especially in females. We also can say that drosophila males of both stocks used tend to be less viable if being a larva they were subjected to low doses of neonicotinoids and niacin.

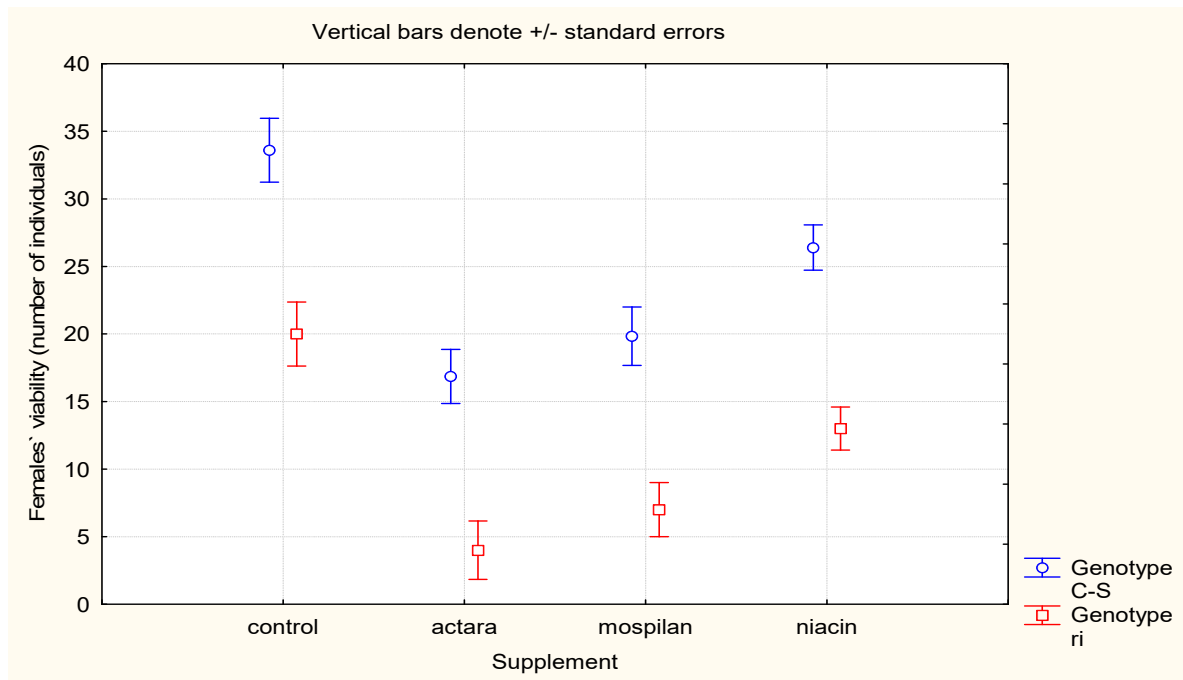


Fig. 3. The genotype dependent effects of larval exposure to low doses of neonicotinoids and niacin on *Drosophila melanogaster* females' viability (circles – C-S; squares – ri)

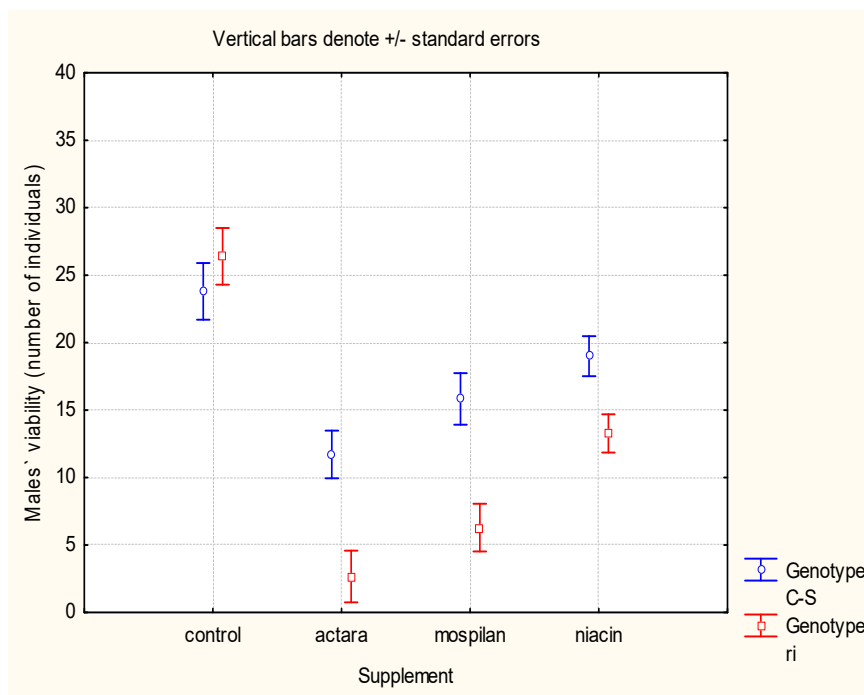


Fig. 4. The genotype dependent effects of larval exposure to low doses of neonicotinoids and niacin on *Drosophila melanogaster* males' viability (circles – C-S; squares – ri)

The results of ANOVA corroborate significant genotype dependent ($F=81.99$; $p<0.001$) effect of supplement presence in culture medium ($F=21.77$; $p<0.001$) on females' viability, as well as on males'

one (the genotype effect – $F=17.74$; $p<0.001$; the supplement presence effect – $F=30.68$; $p<0.001$). We also observe the effect of two factors interaction ($F=3.88$; $p<0.05$) on males' viability.

The changes of general index of viability (Fig. 5) completely reflect fertility index changes with the significant effect of genotype ($F=59.19$; $p<0.001$) and supplement presence in the culture medium ($F=33.08$; $p<0.001$).

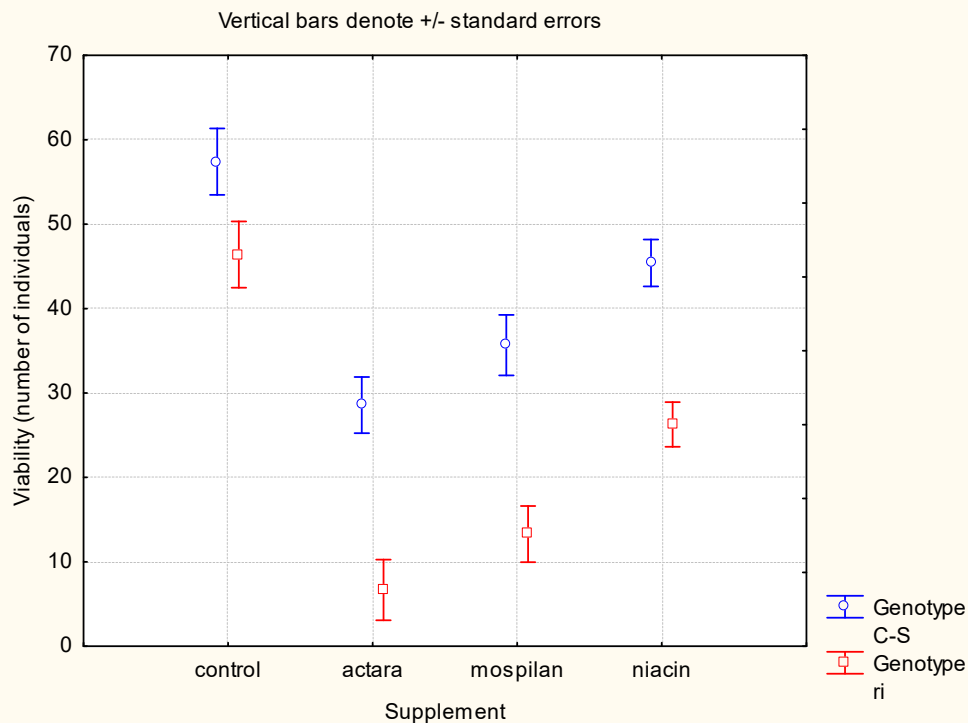


Fig. 5. The genotype dependent effects of larval exposure to low doses of neonicotinoids and niacin on *Drosophila melanogaster* imagoes viability (circles – C-S; squares – *ri*)

It should be said that both fertility and viability reduction is a typical nonspecific reaction of laboratory *Drosophila* stocks on diet changes, especially on the excess of the supplement (see, for example, Volkova et al., 2010, 2013). Still, among various compounds examined by our research group the effect of neonicotinoids is the most pronounced.

Survivability of F2 progeny from individuals developed in the presence of neonicotinoids or niacin in the medium was analyzed according to the effectiveness of larva hatching from eggs (embryonic lethality indexes) (Fig. 6, 7). According to the results obtained there is a strong effect of genotype both on early ($F=27.55$; $p<0.001$) and late embryonic lethality ($F=909.21.55$; $p<0.001$). Initially C-S and *ri* stocks are contrast in these indexes: C-S stock is characterized by rather low level of eDLM (Fig. 6) but relatively high level of IDLM (Fig. 7); on contrary, *ri* stock is characterized by high level of eDLM (Fig. 6) and low level of IDLM (Fig. 7). Parents' development in the culture mediums supplied with neonicotinoids or niacin raised slightly the level of eDLM among C-S offspring but reduced significantly the level of eDLM among *ri* offspring (Fig. 6). The effect on IDLM depends on supplement type (Fig. 7). For example under actara supplement we observe the reduction of index in both stocks that is more pronounced in C-S one. Mospilan appears to have no effect on this index in concentration used. While parents' development in the culture medium supplied with niacin tends to result in index reduction among C-S offspring but rises it significantly among *ri* offspring. The two-way ANOVA for qualitative characteristics proved the effect of supplement as well as the combined effect of both controlled factors on early and late embryonic lethality indexes. Therefore, depending on the genotype, the long-term (in ontogenesis) effects of neonicotinoids and nicotinic acid at low concentrations may shift the selection in the offspring of exposed individuals from the early embryonic stage towards the parents (i.e., affect gametogenesis and viability of gametes).

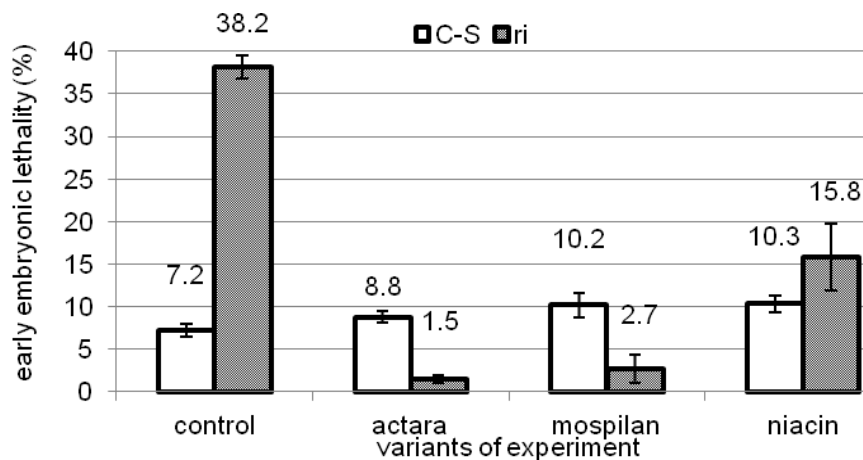


Fig. 6. The genotype dependent effects of larval exposure to low doses of neonicotinoids and niacin on *Drosophila melanogaster* early embryonic lethality

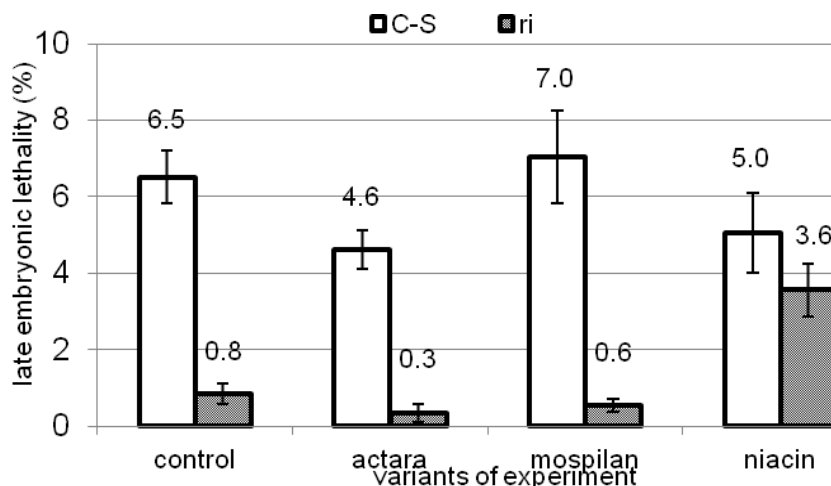


Fig. 7. The effects of larval exposure to low doses of neonicotinoids and niacin on *Drosophila melanogaster* late embryonic lethality

The genotype-determined differences can be explained from the point of view of nucleotides substitutions in nAChR subunit genes that can affect receptor-ligand affinity. Genome studies have identified 11 nAChR subunit genes in the honeybee (Jones et al., 2007, 2006), compared with 10 each in *D. melanogaster* (Jones et al., 2007). There are core nAChR subunits conserved between various insect species with over 60% of amino acid sequences homology (Jones et al., 2007; Sattelle, 2009). However, at least one divergent subunit in the fruit fly, mosquito and honeybee has less than 20% homology (Sattelle, 2009). In *D. melanogaster* genes encoding the ligand-binding α -type ($D\alpha 1$, $D\alpha 2$, $D\alpha 3$, $D\alpha 4$, $D\alpha 7$) subunits and for the structural β -type subunits ($D\beta 1$ and $D\beta 2$) have overlapping distributions in various regions of the nervous system. However, expression of homomeric receptors with either the $D\alpha 1$ (ALS) or $D\alpha 2$ (SAD) alone does not generate a functional receptor and *Drosophila* β -type (ARD and SBD) subunits do not contribute to functional receptor expression. Coexpression of the *Drosophila* α - and β -type subunits in various combinations does not produce any electrophysiological or biochemical response. At present, the functional receptor with ion channel property and/or ligand binding activity can be generated only when any of the three α -type subunits is coexpressed with the vertebrate (chick or rat) β -type subunit. These results strongly suggest the importance of the β - or non- α -type subunit and the

heterooligomeric status of the native *Drosophila* nAChR with possible involvement of unidentified subunit(s) (Lansdell, Millar, 2000).

Conclusions

The results of the experiment showed that niacin has a similar effect (reduction of indexes) on the fertility and viability of the genetically different *Drosophila* stocks in comparison with the neonicotinoids used, but the effect of neonicotinoids is more pronounced. The genotype-dependent effects of the studied supplements on pupa mortality were also established. Depending on the genotype, low concentrations of neonicotinoids and niacin may enhance selection processes at feeding (larva) and metamorphosis (pupa) stages of insect development that will result in better survivability of embryos formed by imagoes survived under the pressure of such factor. Therefore, the formation of insects' resistance to neonicotinoids is possible in agroecosystems.

References

- Barbara G.S., Grunewald B., Paute S. et al. Study of nicotinic acetylcholine receptors on cultured antennal lobe neurones from adult honeybee brains // *Invert. Neurosci.* – 2008. – Vol.8, issue 1. – P. 19–29.
- Bass C., Denholm I., Williamson M.S., Nauen R. The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides // *Pestic. Biochem. Physiol.* – 2015. – Vol.121. – P. 78–87.
- Belzunces L.P., Tchamitchian S., Brunet J.L. Neural effects of insecticides in the honey bee // *Apidologie.* – 2012. – Vol.43. – P. 348–370.
- Bownes M. A photographic study of development in the living embryo of *Drosophila melanogaster* // *J. Embryol. Exp. Morph.* – 1975. – Vol. 33, no. 3. – P. 789–801.
- Bromilow R.H., Chamberlain K., Evans A.A. Physicochemical aspects of phloem translocation of herbicides // *Weed Science.* – 1990. – Vol.38. – P. 305–314.
- Buckingham S.D., Lapied B., Corronc H.L. et al. Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors // *J. Exp. Biol.* – 1997. – Vol.200. – P. 2685–2692.
- Casida J.E. Neonicotinoid metabolism: compounds, substituent's, pathways, enzymes, organisms, and relevance // *J. of Agriculture and Food Chemistry.* – 2010. – Vol.59. – P. 2923–2931.
- Chao S.L., Casida J.E. Interaction of imidacloprid metabolites and analogs with nicotinic acetylcholine receptor of mouse brain in relation to toxicity // *Pestic. Biochem. Physiol.* – 1997. – Vol.58. – P. 77–88.
- Di Prisco G.V., Cavaliere V., Annoscia D. et al. Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2013. – Vol.110. – P. 18466–18471.
- Henry M., Beguin M., Requier F. et al. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees // *Science.* – 2012. – Vol.336. – P. 348–350.
- Jones A.K., Brown L.A., Sattelle D.B. Insect nicotinic acetylcholine receptor gene families: from genetic model organism to vector, pest and beneficial species // *Invertebrate Neuroscience.* – 2007. – Vol.7, issue 1. – P. 67–73.
- Jones A.K., Raymond-Delpech V., Thany S.H. et al. The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the honey bee, *Apis mellifera* // *Genome Research.* – 2006. – Vol.16, issue 11. – P. 1422–1430.
- Kostenko V.V., Kolot N.V., Vorobyova L.I. Research of embryonic mortality stages of *Drosophila melanogaster* depending on age and starvation of an imago // *Russian Journal of Developmental Biology.* – 2015. – Vol.46, issue 6. – P. 381–388.
- Lansdell S.J., Millar N.S. Cloning and heterologous expression of D-alpha-4, a *Drosophila* neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit: identification of an alternative exon influencing the efficiency of subunit assembly // *Neuropharmacology.* – 2000. – Vol.39. – P. 2604–2614.
- Liu G.Y., Ju X.L., Cheng J. Selectivity of imidacloprid for fruit fly versus rat nicotinic acetylcholine receptors by molecular modelling // *J. Mol. Model.* – 2010. – Vol. 16. – P. 993–1002.
- Matsuda K., Shimomura M., Ihara M. et al. Neonicotinoids show selective and diverse actions on their nicotinic receptor targets: Electrophysiology, molecular biology, and receptor modeling studies // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2005. – Vol.69. – P. 1442–1452.
- Moffat C., Buckland S.T., Samson A.J. et al. Neonicotinoids target distinct nicotinic acetylcholine receptors and neurons, leading to differential risks to bumblebees // *Scientific Reports.* – 2016. – Vol.6. – P. 1–10.

- Palmer M.J., Moffat C., Saranzewa N. et al. Cholinergic pesticides cause mushroom body neuronal inactivation in honeybees // *Nature Communications*. – 2013. – Vol.4. – P. 1634–1642.
- Plokhinsky N.A. *Biometrics*. – M: MSU, 1969. – 367p. (in Russian)
- Sattelle D.B. Invertebrate nicotinic acetylcholine receptors-targets for chemicals and drugs important in agriculture, veterinary medicine and human health // *J. of Pestic. Sci.* – 2009. – Vol.34, issue 4. – P. 233–240.
- Sattelle D.B. Acetylcholine receptors of insects // *Adv. Insect. Physiol.* – 1980. – Vol.15. – P. 115–215.
- Sattelle D.B., Breer H. Cholinergic nerve terminals in the central nervous system of insects: molecular aspects of structure, function and regulation // *J. Neuroendocrinol.* – 1990. – Vol.2. – P. 241–256.
- Sheets L.P. The neonicotinoid insecticides // *Neurotoxicology handbook*. Vol.1. / Ed. E.J.Massaró. – Oxford, UK: Humana Press Inc., 2002. – P. 79–87.
- Shi T.-F., Wang Y.-F., Qi L.L. et al. Sublethal effects of the neonicotinoid insecticide thiamethoxam on the transcriptome of the honey bees (Hymenoptera: Apidae) // *Journal of Economic Entomology*. – 2017. – Vol.110, issue 6. – P. 2283–2289.
- Thany S.H. Neonicotinoid insecticides: historical evolution and resistance mechanisms // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2010. – Vol.683. – P. 75–83.
- The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health / Ed. G.F.Combs. 3rd ed. – 2007. – P. 54–55.
- Tikhomirova M.M. *Genetic analysis*. – Leningrad: Leningrad State University Publ., 1990. – 280p. (in Russian)
- Tomizawa M., Casida J.E. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2005. – Vol.45. – P. 247–268.
- Tomizawa M., Casida J.E. Molecular recognition of neonicotinoid insecticides: the determinants of life or death // *Acc. Chem. Res.* – 2009. – Vol.42. – P. 260–269.
- Tomizawa M., Yamamoto I. Binding of nicotinoids and the related compounds to the insect nicotinic acetylcholine receptor // *J. Pestic. Sci.* – 1992. – Vol.17. – P. 231–236.
- Tonnang H.E.Z., Herve B.D.B., Biber-Freudenberger L. et al. Advances in crop insect modelling methods – Towards a whole system approach // *Ecological Modelling*. – 2017. – Vol.354. – P. 88–103.
- Vasilyeva L.A. Analysis of a system of genes expressing the incomplete radial vein of the *Drosophila melanogaster* wing // *Genetics*. – 1984. – Vol.20, no. 4. – P. 599–604. (in Russian)
- Vasilyeva L.A. Change of the venation system of the *Drosophila melanogaster* wing under the influence of temperature shock and selection // *Journal of General Biology*. – 2005. – Vol.66, no. 1. – P. 68–74. (in Russian)
- Volkova N.Ye., Filiponenko N.S., Krasovska V.V. et al. Effect of the folic acid and methionine on *Drosophila melanogaster* fitness // *The Journal of V.N.Karazin Kharkiv National University. Series "Biology"*. – 2013. – Issue 17, No. 1056. – P. 92–76. (in Russian)
- Volkova N.Ye., Philiponenko N.S., Kostenko V.V. et al. Changes of *Drosophila melanogaster* quantitative traits at the influence of the donor of methyl groups – betaine. I. Analysis of adaptability components and expressiveness of the trait radius incompletes // *The Journal of V.N.Karazin Kharkiv National University. Series "Biology"*. – 2010. – Issue 12, No. 920. – P. 10–25. (in Russian)
- WHO class III
(http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/Thiamethoxam2014.pdf)
- Yamamoto I., Casida J.E. *Nicotinoid insecticides and the nicotinic acetylcholine receptor*. – Springer-Verlag, Tokyo, 1999. – P. 3–27.

Представлено: Т.О.Єлецька / Presented by: T.O.Yeletska

Рецензент: Ю.Г.Шкорбатов / Reviewer: Y.G.Shkorbatov

Подано до редакції / Received: 16.10.2017

... ЗООЛОГІЯ ТА ЕКОЛОГІЯ ... ZOOLOGY AND ECOLOGY ...

УДК: 595.412:59.087

Сучасні методи фауністичних досліджень наземних тихоходів (Tardigrada) Є.О.Киося

*Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна (Харків, Україна)
yevgenkiosya@karazin.ua*

Тихоходи (тип Tardigrada) – мікроскопічні безхребетні, що населяють водойми, а також водні плівки в наземних екосистемах. До числа «наземних» тихоходів належать представники еутардиград (клас Eutardigrada) і панцирних тихоходів (клас Heterotardigrada, родина Echiniscidae), яких можна знайти у ґрунті, рослинному опаді, у мохах, лишайниках та деяких інших субстратах. На сьогоднішній день фауни тихоходів досліджені вкрай неповно та нерівномірно. Крім того, численні відомості, отримані давно, вже застаріли через значні зміни в таксономії цієї групи, що відбулися протягом останніх десятиліть. У статті наведено огляд літературних даних з методів дослідження фауни наземних тихоходів. Передусім описані методи збору та зберігання зразків субстратів, заселених тихоходами, й техніки добування тихоходів із різних типів зразків. Далі обговорюються систематичні ознаки тихоходів, підходи до їх визначення та основні методи, необхідні для рутинної ідентифікації видів, у першу чергу – виготовлення мікропрепаратів та їх дослідження методами світлової мікроскопії. Єдиного стандарту для багатьох методів, що обговорюються, наразі не існує, тому описані різні підходи, ефективність яких була підтверджена експериментально і вважається задовільною. Також описані методики електронної мікроскопії та генетичних досліджень тихоходів.

Key words: *тихоходи, фауна, таксономія, мікроскопія, ДНК-баркування.*

Modern methods of the faunistic research of terrestrial water bears (Tardigrada) Ye.O.Kiosya

Water bears (phylum Tardigrada) are microscopic invertebrates inhabiting water pools as well as thin water films in terrestrial ecosystems. So called "terrestrial" tardigrades include representatives of eutardigrades (class Eutardigrada) and armoured tardigrades (class Heterotardigrada, family Echiniscidae) which can be found in soil, leaf litter, in mosses, lichens and some other habitats. At the moment faunas of tardigrades are studied insufficiently and very unevenly. Besides, a lot of data obtained a long time ago became outdated and new studies are needed. A review of methods commonly used in faunistic studies of terrestrial tardigrades is given here. First of all, methods of sampling and storage of samples containing tardigrades are described. Further, systematic criteria of tardigrades and approaches to their identification are discussed along with the methods of routine species identification (the main of them are making slides and studying them with various techniques of light microscopy). The universal standard for many methods does not exist, so different approaches are discussed, that were experimentally proven to be effective and are widely accepted as satisfactory. The methods of electron microscopy and genetic studies of tardigrades are also described.

Ключові слова: *tardigrades, fauna, taxonomy, microscopy, DNA-barcoding.*

Современные методы фаунистических исследований наземных тихоходок (Tardigrada) Е.А.Киося

Тихоходки (тип Tardigrada) – микроскопические беспозвоночные, населяющие водоёмы, а также водные плёнки в наземных экосистемах. К числу «наземных» тихоходок принадлежат представители эутардиград (класс Eutardigrada) и панцирных тихоходок (класс Heterotardigrada, семейство Echiniscidae), которых можно обнаружить в почве, растительной подстилке, во мхах, лишайниках и некоторых других местообитаниях. В настоящий момент фауны тихоходок исследованы крайне неполно и неравномерно. Кроме того, многие сведения, полученные давно, уже устарели из-за значительных изменений в таксономии этой группы, произошедших за последние десятилетия. В

статье приводится обзор литературных данных по методам исследования фауны наземных тихоходок. Прежде всего, описаны методы сбора и хранения образцов субстрата, населённых тихоходками, и техники извлечения тихоходок из различных типов образцов. Далее обсуждаются систематические признаки тихоходок, подходы к их определению и основные методы, необходимые для рутинной идентификации видов, прежде всего – изготовление микропрепаратов и их исследование методами световой микроскопии. Единого стандарта для многих обсуждаемых методов не существует, поэтому описаны различные подходы, эффективность которых была подтверждена экспериментально и считается удовлетворительной. Также описываются методики электронной микроскопии и генетических исследований тихоходок.

Ключевые слова: тихоходки, фауна, таксономия, микроскопия, ДНК-штрихкодирование.

Введение

Несмотря на повышенный интерес к сверхустойчивости тихоходок, связанный с перспективами прикладных биомедицинских и космических разработок (Persson et al., 2011; Hashimoto et al., 2016), разнообразие этой группы животных остаётся недостаточно изученным. Особенно это справедливо по отношению к морским тихоходкам: вероятно, на сегодняшний день описана только небольшая часть (около 20%) из реально существующих видов (Bartels et al., 2016).

Более полно исследовано разнообразие тихоходок, обитающих в пресных водоёмах, а также «наземных», то есть таких, которые населяют водные плёнки в наземных экосистемах. Тем не менее, на многих территориях фауна наземных тихоходок либо вовсе не изучалась, либо о ней имеются лишь отрывочные и устаревшие сведения. Кроме того, многие фаунистические сводки, составленные давно, уже устарели из-за значительных изменений в таксономии этой группы, произошедших за последние десятилетия (Pilato et al., 2011). Также дебатировался и требует дальнейших исследований вопрос о том, применимы ли стандартные зоогеографические концепции к тихоходкам (и другим микроскопическим беспозвоночным) или же для них справедлив принцип «всё есть везде», как для многих бактерий (Pilato, Binda, 2001; Guil et al., 2009).

В данной статье приводится обзор литературы, описывающей актуальные методики, применяющиеся в исследовании фауны тихоходок.

Сбор образцов

Тихоходки – очень малы (0,1–1 мм) и практически не видны невооружённым глазом, поэтому сбор и непосредственный учёт отдельных особей в природе невозможен. Вместо этого следует собирать пробы субстратов, в которых тихоходки предположительно могут находиться. В наземных экосистемах это могут быть лишайники, мхи, печёночники, плауны, некоторые мелкие покрытосеменные, а также растительная подстилка и верхний слой почвы (до 5 см). Кроме того, можно собирать тихоходок из мелких временных водоёмов, таких как заливаемые водой дупла деревьев (Ramazzotti, Maucchi, 1983).

Место сбора следует описывать как можно более точно, чтобы впоследствии на него можно было вернуться и собрать образцы повторно. Для этого рекомендуется отмечать координаты с помощью геолокации (GPS), дополняя эту информацию подробными текстовыми описаниями и фотографиями исследуемых участков. На этикетке образца помимо локации желательно указывать дату сбора, тип фитоценоза, тип образца субстрата и основания, с которого его собрали, а для гористой местности – также и высоту над уровнем моря.

Рекомендуемый размер исследуемой площадки и число образцов, собираемых с неё, имеющимися методиками сбора чётко не определены и устанавливаются каждым исследователем на своё усмотрение. По этой причине сложно корректно сравнивать между собой данные по видовому разнообразию тихоходок, изученному в разных местах разными людьми. В среднем, адекватной выборкой считается от нескольких десятков до нескольких сотен образцов с площадки до 100 м².

Экология тихоходок слабо исследована, что несколько осложняет выбор образцов для сбора. Не установлено приуроченности большинства видов тихоходок к отдельным видам мхов, лишайников или конкретным типам иного субстрата (Meyer, 2006a), которая напоминала бы связь

между растениями и насекомыми-фитофагами. Тем не менее, разные виды, вероятно, отличаются друг от друга по своим предпочтениям. Для них могут быть важны такие параметры, влияющие на микроклимат, как общая структура куртины мха, слоевища лишайника, почвы или подстилки, режим влажности, кислотность и уровень инсоляции (Hallas, 1978; Jönsson, 2003; Авдоница, 2011). Соответственно, для получения наиболее полной картины, следует брать образцы, различающиеся по этим параметрам.

Исследование сезонной динамики заселения тихоходками мха *Rhytidiadelphus squarrosus* (Hedw.) Warnst показало, что численное соотношение тихоходок различных видов изменяется в течение года (Schuster, Greven, 2007). Одни виды практически исчезают из проб летом, когда уменьшается количество осадков, а другие, напротив, снижают численность при обилии осадков.

При сборе образцов важно принимать во внимание высокую степень мозаичности в распределении тихоходок по внешне одинаковым или однородным субстратам. Было показано, например, что мхи и лишайники, растущие на соседних камнях или деревьях в довольно сходных условиях, могут резко отличаться по видовому разнообразию и численному обилию тихоходок (Meuer, 2006b). Также было изучено распределение тихоходок по образцу размером 18×18 см, взятому из куртины мха *Hypnum cupressiforme* Hedw. Этот образец был разделён на 25 равных частей, и в каждой из них по отдельности было исследовано наличие тихоходок. Оказалось, что тихоходки распределены по этому образцу крайне неравномерно – в некоторых частях встречались десятки особей нескольких разных видов, тогда как в других ни одной тихоходки обнаружено не было (Degma et. al., 2011). В этой же работе было показано, что распределение тихоходок по образцу напрямую не зависело от градиента влажности в его пределах. Кроме того, в другом исследовании было продемонстрировано, что в случае постепенного высыхания образца мха *Grimmia alpicola* Hedw тихоходки не были склонны к миграциям, направленным на то, чтобы дольше оставаться в зоне повышенной влажности (Nelson, Adkins, 2001).

Таким образом, как по внешнему виду образцов субстрата, так и по их относительной влажности точно предсказать, в каких из них будут тихоходки, а в каких нет, практически невозможно. Мозаичность связана, прежде всего, с характером расселения тихоходок. Повидимому, их активное перемещение между подходящими для их жизни участками субстрата крайне ограничено, и в подавляющем большинстве случаев они распространяются пассивно, с ветром и потоками воды (Ramazzotti, Maucsi, 1983). Исходя из описанного выше, ясно, что не стоит ограничиваться сбором одного образца каждого типа, а следует собирать несколько однотипных образцов из каждого локалитета.

Размер образцов, изымаемых из биотопа, также строго не регламентируется методиками. Однако необходимо иметь в виду, что он должен быть достаточным для многократного (повторного) исследования каждого образца. На один разбор, в среднем, уходит кусочек образца 5×5 см, то есть общий его размер должен быть в несколько раз больше.

Хранение образцов

Пробы почвы и растительной подстилки нежелательно хранить более нескольких суток, после чего эффективность извлечения тихоходок из них снижается. Напротив, срок хранения собранных мхов и лишайников может быть очень продолжительным. Это связано с различными методическими подходами к извлечению тихоходок из разных типов субстрата.

Образцы мхов и лишайников для хранения предварительно высушивают в тени, без специального нагревания. При этом тихоходки переходят в состояние ангидробิโอа. В этом состоянии они являются метаболически неактивными, но сохраняют жизнеспособность на протяжении длительного времени и могут быть возвращены к активной жизни размачиванием пробы в воде (Nelson, 2002). Собственно, для микроскопирования и определения по морфологическим признакам не важно, будут ли тихоходки живыми на момент их обнаружения в образцах. Этим тихоходки выгодно отличаются от, например, бделлоидных коловраток, попадающихся в тех же пробах (Ricci, Melone, 2000). Однако для некоторых методик молекулярно-генетических и цитогенетических исследований всё же предпочтительно наличие живых особей (см. далее).

Точные временные пределы выживаемости тихоходок в состоянии ангидробиоза не установлены, хотя отдельные работы по ее оценке предпринимались. В научно-популярных источниках часто можно встретить упоминания о тихоходках, якобы успешно переживающих в высушенном виде более ста лет. Эта информация, вероятнее всего, не соответствует действительности и основана на единичном наблюдении Тины Франчески за тихоходками из пробы мха, хранившегося в гербарии около 120 лет. В тексте этой работы 1948 г. отмечено, что после регидратации одна из тихоходок слегка пошевелила передними ногами, что трудно признать полноценным и массовым возвращением к активной жизни (Jönsson, Bertolani, 2001).

Для проверки способности тихоходок переживать столь долгое высушивание были исследованы 63 пробы мхов и лишайников, хранившихся в коллекциях от 9 до 138 лет (Guidetti, Joensson, 2002). Из этих проб удалось извлечь около 1500 тихоходок и более 500 их яиц, однако жизнеспособность сохранили лишь четыре яйца тихоходок *Ramazzottius oberhaeuseri* (Doyere), из проб, высушенных 9 лет назад. Также была изучена выживаемость тихоходок *R. oberhaeuseri* и *Echiniscus* spp. из пробы лишайника, разделённой на множество частей, которые размачивали через разные промежутки времени. В рамках данного исследования выяснилось, что после трёх-четырёх лет хранения проб в бумажных конвертах при комнатной температуре тихоходки этих видов утрачивают жизнеспособность (Rebecchi et al., 2006). Притом надо заметить, что тихоходки родов *Ramazzottius* и *Echiniscus* – это одни из самых засухоустойчивых, адаптированных к часто пересыхающим местообитаниям. Многие другие виды способны переносить в высушенном состоянии лишь несколько месяцев (Rebecchi et al., 2006).

Существует предположение, что тихоходки значительно дольше сохраняют жизнеспособность в пробах субстрата, которые замораживают, чем в тех, которые хранят при комнатной температуре. Так, недавние исследования (Tsujiimoto et al., 2016) продемонстрировали успешное возвращение в активное состояние тихоходок *Acutuncus antarcticus* (Richters) из пробы мха, собранной в 1983 году и более 30 лет хранившейся в морозильной камере при температуре -20°C. Конечно, данный конкретный случай можно было бы объяснить специфическими приспособлениями антарктических видов тихоходок к местному холодному климату. Однако вероятно, что все тихоходки, независимо от их местообитания, лучше переносят ангидробиоз при пониженных температурах.

Также предполагается, что на жизнеспособность ангидробиотических тихоходок может положительно влиять ограничение доступа воздуха. В покоящемся состоянии метаболизм тихоходок практически приостанавливается, так что поглощать кислород для дыхания им не нужно. В то же время, в присутствии кислорода проходят процессы окисления, повреждающие ткани (Rebecchi et al., 2009).

Таким образом, высушенные части наиболее ценных образцов субстрата может быть целесообразно перекладывать из бумажных конвертов в герметичные пластиковые пакеты и замораживать.

Извлечение тихоходок из образцов

Существует множество методик для извлечения тихоходок из проб, однако все они включают два основных этапа: 1) вымывание тихоходок и других мелких животных из образца субстрата в воду или фиксирующую жидкость и 2) просматривание этой жидкости и отбор индивидуальных тихоходок и их яиц.

Мхи, лишайники и прочие образцы, подобные им по структуре, можно просто размачивать в воде, ждать, пока тихоходки выйдут из ангидробиоза (0,5–3 часа), а затем встряхивать и отжимать воду. Это можно делать довольно интенсивно – тихоходки слишком малы для того, чтобы быть раздавленными этими движениями. Поскольку активные тихоходки могут крепко удерживаться на субстрате при помощи коготков, рекомендуется наркотизировать их перед встряхиванием прибавлением к размоченному субстрату раствора этилового спирта (Morgan, King, 1976).

С пробами почвы и большинством образцов растительной подстилки простое размачивание не даёт хорошего результата, так как обнаружить тихоходок в толще мелких частиц чрезвычайно сложно и затратно по времени. Поэтому тихоходок необходимо как-то отделять от общей массы

частиц. Метод флотации, часто применяемый для извлечения, например, клещей, для тихоходок малопригоден, так как они скорее тонут в жидкости, чем всплывают на её поверхность. Остаются такие варианты, как механическое просеивание (промывание) проб через сита и активное изгнание тихоходок из пробы.

Для просеивания, как правило, используют систему из двух сит. Первое сито, с крупными ячейками (более 2 мм) служит для удаления крупных частиц, сами же тихоходки оседают на втором сите с ячейками 30–40 мкм (Nelson, 2002).

Для изгнания тихоходок из проб часто используют воронки Берманна (Harada, Ito, 2006; Guil et al., 2015). Впрочем, показано, что более эффективным является метод, изначально предложенный для извлечения бделлоидных коловраток (Devetter, 2010). При этом методе в чашку Петри заливают воду и помещают в неё образец, лежащий на целлюлозном фильтре. Снизу образец охлаждают, а сверху подсвечивают флуоресцентными (ненагревающими) лампами. Тогда мелкие животные, включая тихоходок и коловраток, начинают мигрировать прочь от света и выходят в воду. Недостатком данного метода является то, что с его помощью нельзя добыть яйца тихоходок, а также уже мертвых особей.

Воду или фиксирующую жидкость с тихоходками просматривают в небольшой чашке Петри при увеличении $\times 25$ – 50 стереомикроскопа, в падающем свете, на тёмном поле (Kinchin, 1994). Микроскопы, предусматривающие рассматривание объектов на стекле в проходящем свете, для выбора тихоходок из проб малопригодны. Во-первых, у них слишком маленькие поля зрения и глубина резкости для эффективного обнаружения мелких беспозвоночных, рассеянных в жидкости. Во-вторых, в поле зрения такого микроскопа неудобно производить манипуляции с найденными животными.

Обнаруженных тихоходок и их яйца, в зависимости от цели дальнейших исследований, переносят на предметное стекло или в небольшую ёмкость с водой, из стекла или пластика. Для переноса можно использовать пипетки Пастера (с тонким носиком), микропипетки, петли Ирвина или микроложечки, которые можно собственноручно изготовить, например, из игл для шприцев.

Изготовление микропрепаратов тихоходок

Для хранения в коллекциях, определения видов и установления типовых экземпляров новых таксонов изготавливают постоянные микропрепараты. Для этого монтируют тихоходок на предметные стёкла. При этом либо приклеивают к каждому стеклу бумажную этикетку, либо подбирают стёкла с шлифованным полем для записи, на котором указывается необходимая информация для идентификации.

При изготовлении препаратов тихоходок помещают в поливинил-лактофенол или же в среды на основе хлоральгидрата и гуммиарабика (жидкость Фора, жидкость Хойера, жидкость Берлезе и т.п.), также применяющиеся для изготовления препаратов клещей, тлей и других мелких членистоногих. Все эти среды являются водосовместимыми и не предусматривают специального предварительного обезвоживания тихоходок (Kinchin, 1994).

Недавно на клоне партеногенетических тихоходок *Milnesium* cf. *alpigenum* были проведены исследования, целью которых было определить оптимальную процедуру изготовления микропрепаратов, при которой тихоходки оптимальным образом расправляются, но не деформируются (Morek et al., 2016). В этой работе сравнивались результаты девяти процедур, различающихся способом подготовки тихоходок к монтированию на препарат, количеством применяемой среды, а также варианты с надавливанием на покровное стекло и без надавливания. Оказалось, что наилучших результатов позволяет добиться методика, описанная ниже.

Сначала тихоходок инактивируют в ёмкости с горячей водой (30 минут при $+60^{\circ}\text{C}$ в термостате), при этом они погибают и расправляются. Далее их переносят на предметное стекло в каплю воды; наблюдая в стереомикроскоп, убирают почти всю воду и заключают тихоходку в каплю среды (около 50 μl в расчёте на покровное стекло 18×18 мм). Накрывают покровным стеклом, ждут, пока среда растечётся и заполнит собой всё пространство под ним, и затем слегка надавливают сверху энтомологической булавкой, чтобы среда чуть выступила по краям покровного стекла. Затем среда между стеклами сохнет на протяжении длительного времени (5

дней в термостате при +60°C или несколько недель при комнатной температуре), после чего края покровного стекла окантовывают прозрачным лаком для ногтей, чтобы избежать пересушивания среды, её кристаллизации и растрескивания. Во время просушки препараты необходимо хранить горизонтально; после просушки и окантовки лаком можно ставить их в коробки вертикально.

Поскольку тихоходки – мелкие и полупрозрачные, а среда, в которую их заключают, ещё больше просветляет их, то на препаратах их практически не видно, и даже при больших увеличениях светового микроскопа они выглядят очень слабоконтрастными. По этой причине для исследования тихоходок методами световой микроскопии рекомендуется применять либо технику фазового контраста, либо микроскопию Номарского, то есть технику дифференциального интерференционного контраста (англ. DIC) (Frohlich, 2008). Данные техники не предусматривают предварительного окрашивания тихоходок красителями, и оно не требуется для определения видов (см. ниже). Однако для исследования соотношения полов, различения раздельнополых и партеногенетических популяций можно перед заключением в среду окрасить тихоходок ацетокармином или лактоацетоорсеином (Bertolani, 1994).

Определение видов при помощи световой микроскопии

Определение таксономической принадлежности тихоходок традиционно производят, исследуя их морфологические признаки, прежде всего – строение ротоглоточного аппарата и строение коготков на ногах. Для панцирных тихоходок (класс *Heterotardigrada*, семейство *Echiniscidae*) важно также строение щитков панциря и отходящих от них выростов, а для некоторых эутардиград (класс *Eutardigrada*) – скульптура кутикулы (Nelson, 2002; Pilato, Binda, 2010). Другие признаки, такие как окраска, форма тела, наличие и цвет глаз и прочие имеют ограниченное значение и используются для определения видов лишь в редких случаях. Следует особо отметить, что у тихоходок отсутствуют наружные гениталии, которые часто исследуются для различения близких видов во многих группах членистоногих. Теоретически в качестве таксономического признака также может быть использована ультраструктура сперматозоидов (Guidi, Rebecchi, 1996), однако на практике исследовать этот признак сложно, и в определительных таблицах он практически не фигурирует.

Развитие наземных тихоходок проходит с несколькими линьками. Метаморфоз отсутствует либо же слабо выражен. У ювенильных особей панцирных тихоходок (сем. *Echiniscidae*) имеются определённые отличия от взрослых (часто – меньшее число коготков и выростов панциря), поэтому у них для определения надёжнее брать более крупных особей. У эутардиград важные морфологические признаки развивающихся особей, как правило, не отличаются от таковых у взрослых. Однако важно помнить, что незадолго до линьки тихоходки выбрасывают через ротовое отверстие все твёрдые кутикулярные части своего ротоглоточного аппарата и переходят в так называемую «симплекс-стадию», в которой их определение крайне затруднено (Kinchin, 1994).

Самцы и самки большинства видов раздельнополых наземных тихоходок не различаются по систематически важным морфологическим признакам, хотя для многих морских и пресноводных видов обычен половой диморфизм (Morgan, King, 1976). Из исключений наиболее известны тихоходки рода *Milnesium*, у самцов которых видоизменены коготки на передних ногах, что, вероятно, необходимо для удержания самки при спаривании (Tumanov, 2006).

Поскольку тело тихоходок полупрозрачно, внутренние органы просвечивают и хорошо видны. При этом хорошо заметны различия в их видимой структуре между тихоходками, находящимися на разных стадиях цикла линек и репродуктивного цикла (Rebecchi, Bertolani, 1994). Более того, под стереомикроскопом эти отличия зачастую видны лучше, чем отличия между тихоходками разных видов. На постоянных микропрепаратах внутренние органы сильно просветляются и становятся малозаметны, а для определения видов их строение не используется.

Некоторые различия между таксонами носят скорее количественный, чем качественный характер. Это, прежде всего, морфометрические показатели. Для их получения тихоходок измеряют при помощи окуляр-микрометра или специализированного программного обеспечения фотокамер. Поскольку размеры тихоходки зависят от возраста и индивидуальных особенностей развития, во внимание принимаются не абсолютные показатели промеров, а индексы,

отражающие пропорции и соотношения. Наиболее часто используются индексы системы *pt* (от англ. percent ratio и tube), показывающие отношение между измеряемым параметром и длиной ротовой трубки тихоходки (Pilato et al., 2007).

Стабильность и надёжность морфометрических признаков, применяющихся в систематике, были недавно проверены методами так называемой экспериментальной таксономии (Kozstyla et al., 2016). В этой работе исследовали клоны 6 партеногенетических видов тихоходок из 4 семейств класса Eutardigrada. Каждый клон разделили на несколько групп особей, которых культивировали в различных условиях (отличающихся по температуре и доступности пищи) и затем сравнивали по морфометрическим показателям. Всего таким образом было исследовано более двух тысяч тихоходок, на которых провели в общей сложности около 28 000 измерений. В результате исследования было установлено, что условия развития влияют на морфометрические признаки тихоходок, однако влияние это – незначительное и практически не существенное для целей систематики.

Также было подсчитано, что для корректной оценки морфометрических показателей тихоходок необходимо делать промеры на выборке в 20–30 особей каждого вида (Stec et al., 2016). Поэтому при выборе тихоходок из проб важно не ограничиваться несколькими экземплярами.

Помимо признаков взрослых и растущих особей тихоходок для систематики многих таксонов важны признаки откладываемых яиц. У разных представителей стратегия по защите яиц от поедания различается, но в большинстве случаев она сводится к двум основным вариантам: откладка гладких яиц в экзувии, то есть в сбрасываемую кутикулу (рода *Hypsibius* spp., *Isohypsibius* spp., *Diphascion* spp., *Echiniscus* spp. и др.) и свободная откладка яиц с орнаментированным хорионом (например, *Macrobotus* spp., *Paramacrobotus* spp., *Mesobiotus* spp., *Ramazzottius* spp.). Значение экзувиев с яйцами для определения видов – ограничено, хотя на экзувиях, как и на целых тихоходках, можно исследовать строение когтей. Зато орнаментированные яйца могут быть очень полезны для определения. Многие виды тихоходок, неразличимые по признакам взрослых особей, можно надёжно отличить только по признакам яиц, таким как число и форма отростков, а также мелкие детали их строения (Nelson, 2002). Также на определённых стадиях развития в яйцах просматриваются ротоглоточные аппараты эмбрионов, что позволяет связать морфологию яиц с морфологией взрослых особей. Поэтому для эффективного определения очень важно уметь различать яйца тихоходок, выбирать их из проб и помещать на микропрепараты.

Единого актуального определителя видов тихоходок в настоящий момент не существует. Сводный определитель, которым пользовались ранее (Ramazzotti, Maucchi, 1983), сейчас уже безнадежно устарел, равно как и большинство региональных определителей, таких как «Тихоходки Польши» (Dastych, 1988) или «Тихоходки Британии» (Morgan, King, 1976), а полноценная замена им пока не создана. Для идентификации отрядов, семейств и родов эутардиград хорошо подходит определитель Пилато и Бинды (Pilato, Binda, 2010), где также ясно и подробно описаны главные систематические признаки тихоходок. Определение видов в пределах рода – значительно более проблематично. Конечно, для некоторых родов и групп видов были опубликованы обновленные определительные таблицы (Tumanov, 2006; Kaczmarek, Michalczyk, 2017 и др.). Однако из-за высоких темпов описания всё новых видов тихоходок (Guil, Cabrero-Sanudo, 2007) эти ключи быстро становятся неполными, поэтому помимо них необходимо обращаться к новым статьям с оригинальными описаниями.

Задачу поиска свежих публикаций по определённым родам или группам видов тихоходок сильно облегчает актуальный список видов (англ. check-list). Изначально он был опубликован в виде статьи (Guidetti, Bertolani, 2005), затем в ещё одной статье вышли первые дополнения к нему (Degma, Guidetti, 2007), а далее обновления уже не публиковались на бумаге, но продолжают регулярно выходить в электронном виде на сайте рабочей группы по тихоходкам университета Модены и Реджо-Эмилии: www.tardigrada.modena.unimo.it. Кроме того, свежие публикации по систематике тихоходок удобно отслеживать на сайте “Tardigrada Newsletter”: www.tardigrada.net.

Иногда для различения близких видов (и практически всегда для описания новых таксонов) работы со статьями бывает недостаточно, и требуется сравнительное исследование типовых экземпляров разных видов, хранящихся в музейных и частных коллекциях (Pilato et al., 2011). К

счастью, ввиду малого размера тихоходок, перевозка и пересылка необходимых для этого микропрепаратов значительно облегчена в сравнении с транспортировкой типовых образцов многих других животных.

Электронная микроскопия

Основы морфологической систематики тихоходок были заложены исключительно при помощи методов световой микроскопии. Однако в последние десятилетия для изучения мелких деталей строения этих животных также применяется сканирующая, или растровая электронная микроскопия (РЭМ, англ. SEM).

Препараты для РЭМ готовят, тщательно промывая тихоходок, извлечённых из пробы, и затем обезживая их проведением через батарею сольвентов или переходом через критическую тройную точку (англ. critical point drying) в абсолютном спирте (Mitchell, Miller, 2008).

Так как РЭМ позволяет изучить только наружные признаки (структура кутикулы, когтей или орнамента хориона яиц) и не показывает внутреннее строение, была отдельно разработана методика для изучения пространственной структуры и мелких деталей строения ротоглоточного аппарата тихоходок (Eibye-Jacobsen, 2001). По этой методике необходимо препарировать тихоходку в капле раствора перхлората натрия (NaClO), источником которого может быть бытовой отбеливатель. При помощи тонких заточенных иголок тихоходку необходимо разорвать, извлечь ротоглоточный аппарат из передней части тела и тщательно промыть дистиллированной водой. Альтернативно можно отсаживать живых тихоходок, готовящихся к линьке, в мелкие ёмкости с водой и ждать активного выброса ротоглоточного аппарата перед вхождением в симплекс-стадию (Guidetti et al., 2012).

Для РЭМ исследуемый образец должен находиться на металлическом столике (англ. SEM stub). Ротоглоточный аппарат можно монтировать прямо на нём. Тотальные препараты тихоходок и их яиц необходимо переносить на липкую подложку (двусторонний токопроводящий скотч), приклеиваемую к столику. Поскольку переносимый препарат уже должен быть обезвожен, его невозможно перенести пипеткой или микроложкой. Поэтому для переноса используется, например, кисточка с одним волоском, к которому сухие тихоходки притягиваются электростатически. Впоследствии на препараты напыляют сверху тонкий токопроводящий слой и исследуют их, изготавливая микрофотографии.

Цитогенетические исследования

Хромосомные числа и в целом кариотипы различных видов тихоходок мало отличаются, поэтому подсчет хромосом практически не используется для идентификации таксонов тихоходок. В то же время, цитогенетический анализ может быть интересным для особенностей изучения репродуктивной биологии этой группы животных (Bertolani, 1994). В пределах одного «морфотипа», или «морфологического вида» тихоходок можно обнаружить несколько «цитотипов», различающихся плоидностью и способом размножения (раздельнополые и с мейотическим или амейотическим партеногенезом).

Для цитогенетических исследований нужны делящиеся клетки. У тихоходок их непросто найти, так как их тела состоят из относительно небольшого числа клеток, и клеточные деления у них редки. Тем не менее, истинно эутеличными тихоходки не являются. У них можно наблюдать митотические деления в тканях кишечника, а также мейоз при формировании половых клеток. Самые крупные и хорошо различимые хромосомы можно наблюдать в созревающих ооцитах самок (Киося, 2010).

Молекулярно-генетические исследования

Поскольку определение тихоходок по морфологическим признакам сложно и доступно лишь узкому кругу таксономистов, активно разрабатываются более универсальные методы идентификации. Одним из них является методика ДНК-штрихкодирования тихоходок (Cesari et al., 2009), основные этапы которой описаны ниже.

1. Живую тихоходку фиксируют 96% этиловым спиртом и гомогенизируют при помощи тонких вольфрамовых игл.

2. Экстрагируют ДНК в буферный раствор и очищают от примесей.

3. Амплифицируют нуклеотидные последовательности определённых генов (например, 18S rRNA и COI) путём полимеразной цепной реакции (ПЦР) в термоблоке.

4. Выделяют амплифицированные последовательности путём электрофореза в агарозном геле.

5. Очищают амплифицированные гены от геля и проверяют концентрацию ДНК в продуктах ПЦР на спектрофотометре (этот этап не является обязательным).

6. Последовательность нуклеотидов в исследуемом участке ДНК определяют с помощью реакции секвенирования, визуализируют и корректируют.

7. Для предотвращения путаницы, связанной с возможным загрязнением образцов чужеродной ДНК, проверяют нуклеотидные последовательности по базам данных и удостоверяются, что они действительно принадлежат тихоходкам.

8. Сопоставляют нуклеотидные последовательности исследованных видов с ранее опубликованными данными (например, из базы GenBank) и строят филогенетические деревья.

После смерти тихоходки ДНК постепенно разрушается, поэтому исследовать лучше недавно собранные или замороженные пробы, в которых тихоходки ещё живы. Изучение ДНК из старых образцов также возможно, но гораздо менее эффективно (Rebecchi et al., 2009).

Из-за малого размера тихоходок из каждой особи можно взять лишь один образец для исследования ДНК, причём впоследствии данный экземпляр уже нельзя использовать для исследования морфологии, а значит, его видовая принадлежность может быть поставлена под сомнение. С другой стороны, особь, помещённая на микропрепарат и использованная для изучения морфологии, как правило, не может быть источником ДНК. Поэтому для надёжного сопоставления морфологических и молекулярных данных можно использовать методику подбора так называемых «гарантийных», или «ваучерных экземпляров» (англ. "voucher specimens") тихоходок (Cesari et al., 2013). В соответствии с этой методикой из пробы выбирают живых (подвижных) самок тихоходок с крупными ооцитами, отсаживают их по одной в небольшие ёмкости с водой и содержат при +7°C до откладки яиц. Самку, отложившую яйца, фиксируют, изготавливают из неё постоянный микропрепарат и используют для исследования морфологии, а сами отложенные яйца инкубируют при +7°C. Когда из яиц вылупляется следующее поколение тихоходок, скорлупу яиц помещают на микропрепараты, а ювенильных особей – используют для исследования ДНК. Так может быть гарантировано однозначное соответствие между морфологией взрослой особи, морфологией яиц и изучаемыми нуклеотидными последовательностями ДНК и, таким образом, обеспечивается точная идентификация видов (Bertolani et al., 2010). Также подобный подход помогает выявить филогенетические связи тихоходок на уровне родов и семейств (Bertolani et al., 2014).

Опытные исследователи могут использовать модификацию этой техники, в которой «ваучерные экземпляры» на микропрепаратах заменяют микрофотографиями живых тихоходок, из которых впоследствии экстрагируют ДНК. Поскольку подвижную тихоходку сложно качественно сфотографировать, исследуемых особей предварительно ненадолго замораживают: после размораживания тихоходки некоторое время сохраняют неподвижность (Cesari et al., 2011). Следуя этой методике, нужно с самого начала понимать, что и как следует сфотографировать, так как возможности провести повторное исследование тихоходки этот метод не предусматривает.

Альтернативный подход к молекулярно-генетическим исследованиям видового разнообразия тихоходок предполагает исследования ДНК сразу всех тихоходок, находящихся в пробе субстрата (Blaxter et al., 2004; Robeson et al., 2009). При этом самих тихоходок либо вовсе не извлекают из пробы и не определяют по морфологическим признакам, либо приблизительно (до рода) определяют по фотографиям. Для описания разнообразия в этом случае оперируют понятием "молекулярные таксономические единицы" (англ. MOTU – molecular operational taxonomic units). При помощи подобных методов, то есть только по нуклеотидным последовательностям ДНК, без морфологического анализа были даже описаны три новых вида тихоходок рода

Paramacrobiotus (Schill et al., 2010). Этот подход сравнительно прост и удобен, а значит – может быть использован широким кругом исследователей. Однако пока не вполне ясно, как сопоставлять данные, полученные с его помощью, с огромным массивом данных, ранее полученных методами традиционной морфологической систематики.

Выводы

1. Фаунистические исследования тихоходок имеют ряд особенностей, связанных, прежде всего, с мелкими размерами этих животных.
2. Методика сбора образцов субстрата с тихоходками нуждается в стандартизации.
3. Для точной идентификации видов рекомендуется использовать не только традиционные методы световой микроскопии, но и электронную микроскопию, а также молекулярно-генетические методы. Это обстоятельство, а также необходимость исследования определённых стадий жизненного цикла и мозаичность распределения тихоходок в субстратах обуславливают необходимость сбора большого числа однотипных образцов из одного локалитета.

Список литературы

- Авдонина А.М. Экология наземных тихоходок (Tardigrada): аутэкологический аспект // *Invertebrate Zoology*. – 2011. – Т.8 (Вып.1). – С. 11–22. /Avdonina A.M. Ecologiya nazemnykh tikhokhodok (Tardigrada): autecologicheskii aspekt // *Invertebrate Zoology*. – 2011. – Т.8 (Vyp.1). – С. 11–22./
- Киося Е.А. Цитогенетика созревания ооцитов тихоходки *Macrobiotus glebkai* (Tardigrada: Eutardigrada: Macrobiotidae) // *Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія*. – 2010. – Вип.12 (№920). – С. 26–30. /Kiosya Ye.O. Tsitogenetika sozrevaniya ootsitov tikhokhodki *Macrobiotus glebkai* (Tardigrada: Eutardigrada: Macrobiotidae) // *Visnik Kharkivs'kogo natsional'nogo universytetu imeni V.N.Karazina. Seriya: biologiya*. – 2010. – Vyp.12 (no. 920). – С. 26–30./
- Bartels P.J., Apodaca J.J., Mora C., Nelson D.R. A global biodiversity estimate of a poorly known taxon: phylum Tardigrada // *Zoological Journal of the Linnean Society*. – 2016. – Vol.178. – P. 730–736.
- Blaxter M., Elsworth B., Daub J. DNA taxonomy of a neglected animal phylum: an unexpected diversity of tardigrades // *Proceedings of Royal Society of London, Biology letters*. – 2004. – Vol.271 (Suppl. 4). – P. 189–192.
- Bertolani R. Tardigrada // In: *Reproductive biology of invertebrates*, ed. K.G.Adiyodi. – New Delhi: Oxford & IBH Publishing Co, 1994. – Vol.VI, part B. – P. 25–37.
- Bertolani R., Rebecchi L., Cesari M. A model study for tardigrade identification // In: *Tools for identifying biodiversity: progress and problems* / Ed. P.L.Nimis, R.Vignes Lebbe. – 2010. – P. 333–339.
- Bertolani R., Guidetti R., Marchioro T. et al. Phylogeny of Eutardigrada: new molecular data and their morphological support lead to the identification of new evolutionary lineages // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. – 2014. – Vol.76. – P. 110–126.
- Cesari M., Bertolani R., Rebecchi L., Guidetti R. DNA barcoding in Tardigrada: the first case study on *Macrobiotus macrocalix* (Eutardigrada, Macrobiotidae) // *Molecular Ecology Resources*. – 2009. – Vol.9. – P. 699–706.
- Cesari M., Giovannini I., Bertolani R., Rebecchi L. An example of problems associated with DNA barcoding in tardigrades: a novel method for obtaining voucher specimens // *Zootaxa*. – 2011. – Vol.3104. – P. 42–51.
- Cesari M., Guidetti R., Rebecchi L. et al. A DNA barcoding approach in the study of tardigrades // *Journal of Limnology*. – 2013. – Vol.72 (Suppl.). – P. 182–198.
- Dasty H. Tardigrada of Poland // *Monografie Fauny Polski*. – 1988. – Vol.16. – 286p.
- Degma P., Guidetti R. Notes to the current checklist of Tardigrada // *Zootaxa*. – 2007. – Vol.1579. – P. 41–53.
- Degma P., Katina S., Sabatovicova L. Horizontal distribution of moisture and Tardigrada in a single moss cushion // *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. – 2011. – Vol.49 (Suppl.1). – P. 71–77.
- Devetter M. A method for efficient extraction of rotifers (Rotifera) from soils // *Pedobiologia*. – 2010. – Vol.53. – P. 115–118.

- Eibye-Jacobsen J. A new method for making SEM preparations of the tardigrade buccopharyngeal apparatus // *Zoologischer Anzeiger*. – 2001. – Vol.240. – P. 309–319.
- Frohlich V.C. Phase Contrast and Differential Interference Contrast (DIC) Microscopy // *Journal of visualized experiments*. – 2008. – Vol.17 (844).
- Guidetti R., Joensson K.I. Long-term anhydrobiotic survival in semi-terrestrial micrometazoans // *Journal of Zoology*. – 2002. – Vol.257. – P. 181–187.
- Guidetti R., Bertolani R. Tardigrade taxonomy: an updated check list of the taxa and a list of characters for their identification // *Zootaxa*. – 2005. – Vol.845. – P. 1–46.
- Guidetti R., Altiero T., Marchioro T. et al. Form and function of the feeding apparatus in Eutardigrada (Tardigrada) // *Zoomorphology*. – 2012. – Vol.131. – P. 127–148.
- Guidi A., Rebecchi L. Spermatozoan morphology as a character for tardigrade systematics: comparison with sclerified parts of animals and eggs in eutardigrades // *Zoological Journal of the Linnean society*. – 1996. – Vol.116 (1–2). – P. 101–113.
- Guil N., Cabrero-Sanudo F.J. Analysis of the species description process for a little known invertebrate group: the limnoterrestrial tardigrades (Bilateria, Tardigrada) // *Biodiversity and Conservation*. – 2007. – Vol.16. – P. 1063–1086.
- Guil N., Sanchez-Moreno S., Machordom A. Local biodiversity patterns in micrometazoans: Are tardigrades everywhere? // *Systematics and Biodiversity*. – 2009. – Vol.7 (No. 3). – P. 259–268.
- Guil N., Rodrigo E., Machordom A. Soil tardigrade biodiversity with the description of a new eutardigrade genus and its phylogenetic position // *Systematics and Biodiversity*. – 2015. – Vol.13 (3). – P. 234–256.
- Hallas T.E. Habitat preference in terrestrial tardigrades // *Annales Zoologici Fennici*. – 1978. – Vol.15. – P. 66–68.
- Harada H., Ito M.T. Soil-inhabiting tardigrade communities in forests of Central Japan // *Hydrobiologia*. – 2006. – Vol.558. – P. 119–127.
- Hashimoto T., Horikawa D.D., Saito Y. et al. Extremotolerant tardigrade genome and improved radiotolerance of human cultured cells by tardigrade-unique protein // *Nature Communications*. – 2016. – Vol.7. – P. 1–14.
- Jönsson K.I., Bertolani R. Facts and fiction about long-term survival in tardigrades // *Journal of the Zoological Society of London*. – 2001. – Vol.255. – P. 121–123.
- Jönsson K.I. Population density and species composition of moss-living tardigrades in a boreo-nemoral forest // *Ecography*. – 2003. – Vol.26. – P. 356–364.
- Kaczmarek L., Michalczyk L. The *Macrobotus hufelandi* group (Tardigrada) revisited // *Zootaxa*. – 2017. – Vol.4363 (1). – P. 101–123.
- Kinchin I.M. *Biology of tardigrades* – London: Portland Press, 1994. – 185p.
- Kosztyla P., Stec D., Morek W. et al. Experimental taxonomy confirms the environmental stability of morphometric traits in a taxonomically challenging group of microinvertebrates // *Zoological Journal of the Linnean Society*. – 2016. – Vol.178. – P. 765–775.
- Meyer H.A. Interspecific association and substrate specificity in tardigrades from Florida, Southeastern United States // *Hydrobiologia*. – 2006a. – Vol.558. – P. 129–132.
- Meyer H.A. Small-scale spatial distribution variability in terrestrial tardigrade populations // *Hydrobiologia*. – 2006b. – Vol.558. – P. 133–139.
- Mitchell C., Miller W.R. A simple SEM (scanning electron microscope) preparation protocol for tardigrades // *Journal of the Pennsylvania Academy of Science*. – 2008. – Vol.81 (2/3). – P. 86–90.
- Morek W., Stec D., Gasiorek P. et al. An experimental test of eutardigrade preparation methods for light microscopy // *Zoological Journal of the Linnean Society*. – 2016. – Vol.178. – P. 785–793.
- Morgan C.I., King P.E. *British tardigrades*. – London-NY: Academic Press, 1976. – 133p.
- Nelson D.R., Adkins R.G. Distribution of tardigrades within a moss cushion: do tardigrades migrate in response to changing moisture conditions? // *Zoologischer Anzeiger*. – 2001. – Vol.240. – P. 493–500.
- Nelson D.R. Current status of the Tardigrada: evolution and ecology // *Integrative and Computational Biology*. – 2002. – Vol.42. – P. 652–659.

- Persson D., Halberg K.A., Jorgensen A. et al. Extreme stress tolerance in Tardigrades: surviving space conditions in low earth orbit // *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. – 2011. – Vol.49. – P. 90–97.
- Pilato G., Binda M.G. Biogeography and limno-terrestrial tardigrades: are they truly incompatible binomials? // *Zoologischer Anzeiger*. – 2001. – Vol.240. – P. 511–516.
- Pilato G., Costa G., Conti E. et al. Morphometric analysis of some metric characters of two *Macrobiotus* species (Eutardigrada, Macrobiotidae) // *Journal of Limnology*. – 2007. – Vol.66 (Suppl.1). – P. 26–32.
- Pilato G., Binda M.G. Definition of families, subfamilies, genera and subgenera of the Eutardigrada, and keys to their identification // *Zootaxa*. – 2010. – Vol.2404. – P. 1–54.
- Pilato G., Kiosya Ye., Lisi O. et al. Annotated list of Tardigrada records from Ukraine with the description of three new species // *Zootaxa*. – 2011. – Vol.3123. – P. 1–31.
- Ramazzotti G., Maucci W. Il Phylum Tardigrada // *Mem. Ist. Ital. Idrobiol.* – 1983. – Vol.41. – P. 1–1012. (English translation by C.Beasley, 1995)
- Rebecchi L., Bertolani R. Maturative pattern of ovary and testis in eutardigrades of freshwater and terrestrial habitats // *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development*. – 1994. – Vol.26, no. 2. – P. 107–118.
- Rebecchi L., Guidetti R., Borsari S. et al. Dynamics of long-term anhydrobiotic survival of lichen-dwelling tardigrades // *Hydrobiologia*. – 2006. – Vol.558. – P. 23–30.
- Rebecchi L., Cesari M., Altiero T. et al. Survival and DNA degradation in anhydrobiotic tardigrades // *Journal of Experimental Biology*. – 2009. – Vol.212. – P. 4033–4039.
- Ricci C., Melone G. Key to the identification of the genera of bdelloid rotifers // *Hydrobiologia*. – 2000. – Vol.418. – P. 73–80.
- Robeson M.S., Costello E.K., Freeman K.R. et al. Environmental DNA sequencing primers for eutardigrades and bdelloid rotifers // *BioMed Central Ecology*. – 2009. – Vol.9 (Issue 1). – P. 1–10.
- Schill R.O., Foerster F., Dandekar T., Wolf M. Using compensatory base change analysis of internal transcribed spacer 2 secondary structures to identify three new species in *Paramacrobiotus* (Tardigrada) // *Organisms Diversity and Evolution*. – 2010. – Vol.10. – P. 287–296.
- Schuster R., Greven H. A long-term study of population dynamics of tardigrades in the moss *Rhytidiadelphus squarrosus* (Hedw.) Warnst // *Journal of Limnology*. – 2007. – Vol.66 (1). – P. 141–151.
- Stec D., Gasiorek P., Morek W. et al. Estimating optimal sample size for tardigrade morphometry // *Zoological Journal of the Linnean Society*. – 2016. – Vol.178. – P. 776–784.
- Tsujimoto M., Imura S., Kanda H. Recovery and reproduction of an Antarctic tardigrade retrieved from a moss sample frozen for over 30 years // *Cryobiology*. – 2016. – Vol.72. – P. 78–81.
- Tumanov D.V. Five new species of the genus *Milnesium* (Tardigrada, Eutardigrada, Milnesiidae) // *Zootaxa*. – 2006. – Vol.1122. – P. 1–23.

Представлено: М.О.Кравченко / Presented by: M.O.Kravchenko

Рецензент: С.Ю.Утевський / Reviewer: S.Yu.Utevsky

Подано до редакції / Received: 09.10.2017

••• МІКРОБІОЛОГІЯ ••• MICROBIOLOGY •••

УДК: 579.64:632.3/9

Антагоністична активність проти фітопатогенних бактерій та здатність до утворення біоплівки бактерій *Enterococcus italicus* ONU547 та їх консорціумів з *Lactobacillus plantarum*
А.Г.Мерліч, І.Д.Жуцько, Н.В.Ліманська, В.О.Іваниця

Одеський національний університет імені І.І.Мечникова (Одеса, Україна)
andriymerlich@gmail.com

Вивчено антагоністичні властивості бактерій штаму *E. italicus* ONU547 та його консорціумів з *Lactobacillus plantarum* ONU12 та ONU311 проти фітопатогенів *in vivo* та їх здатність до утворення біоплівки на корінцях крес-салату та пшениці. Бактерії штаму *E. italicus* ONU547 проявили антагоністичну активність проти фітопатогенів *Rhizobium radiobacter* C58 та *Erwinia carotovora* ZM1 *in vivo*, спричиняючи 33,3 та 24,8% інгібування, відповідно, та утворювали біоплівку середнього рівня сформованості на корінцях рослин. Консорціуми бактерій ентерококу з *L. plantarum* у більшості випадків проявили вищу антагоністичну активність та здатність до утворення біоплівки. Консорціум бактерій всіх трьох використаних в роботі штамів молочнокислих бактерій проявив найвищу антагоністичну активність проти *R. radiobacter*, спричиняючи 77,7% інгібування. Крім цього консорціуму, фітопатоген *E. carotovora* найкраще інгібувала також суміш ентерококу з *L. plantarum* ONU311 (33,3% інгібування). Показано, що механізмом інгібувальної дії бактерій штаму *E. italicus* ONU547 проти фітопатогенів могли бути високі адгезивні властивості та/або конкуренція за поживні речовини, тоді як антагоністичну активність їх консорціумів з лактобацилами можна пояснити, крім того, дією органічних кислот.

Ключові слова: антагоністичні властивості, молочнокислі бактерії, біоплівки.

Antagonistic activity against plant pathogenic bacteria and ability to biofilm formation of *Enterococcus italicus* ONU547 bacteria and their consortia with *Lactobacillus plantarum*
A.G.Merlich, I.D.Zhunko, N.V.Limanska, V.O.Ivanytsia

Antagonistic properties of bacteria of *E. italicus* ONU547 strain and their consortia with *Lactobacillus plantarum* ONU12 and ONU311 against plant pathogens *in vivo* and their ability to form biofilm on the roots of cress plant and wheat have been studied. The bacteria of *E. italicus* ONU547 strain showed antagonistic activity against the plant pathogens *Rhizobium radiobacter* C58 and *Erwinia carotovora* ZM1 *in vivo* causing 33.3 and 24.8% of inhibition, respectively, and formed the biofilm of middle level on the plant roots. The consortia of enterococci bacteria with *L. plantarum* showed in most cases higher antagonistic activity and ability to biofilm formation. Bacterial consortia of all used lactic acid bacteria strains showed the highest antagonistic activity against *R. radiobacter* causing 77.7% of inhibition. Besides this consortium, the phytopathogen *E. carotovora* was inhibited preferably by the mixture of enterococci with *L. plantarum* ONU311 (33.3% of inhibition). It has been shown that high adhesive properties and/or competition for nutrients could be the mechanism of inhibitory activity of bacteria of *E. italicus* ONU547 strain against plant pathogens, whereas the antagonistic activity of their consortia with lactobacilli can be explained, in addition, by the action of organic acids.

Key words: antagonistic properties, lactic acid bacteria, biofilms.

Антагонистическая активность против фитопатогенных бактерий и способность к образованию биопленки бактерий *Enterococcus italicus* ONU547 и их консорциумов с *Lactobacillus plantarum*
А.Г.Мерлич, И.Д.Жуцько, Н.В.Лиманская, В.А.Иваниця

Изучены антагонистические свойства бактерий штамма *E. italicus* ONU547 и его консорциумов с *Lactobacillus plantarum* ONU12 и ONU311 против фитопатогенов *in vivo* и их способность к образованию биопленки на корешках кресс-салата и пшеницы. Бактерии штамма *E. italicus* ONU547 проявили антагонистическую активность против фитопатогенов *Rhizobium radiobacter* C58 и *Erwinia carotovora* ZM1 *in vivo*, вызывая 33,3 и 24,8% ингибирования, соответственно, и образовывали биопленки среднего уровня сформированности на корешках растений. Консорциумы бактерий энтерококка с *L. plantarum* в большинстве случаев проявили высшую антагонистическую активность и способность к

образованию биопленки. Консорциум бактерий всех трех использованных в работе штаммов молочнокислых бактерий проявил наивысшую антагонистическую активность против *R. radiobacter*, вызывая 77,7% ингибирования. Кроме этого консорциума, фитопатоген *E. carotovora* ингибировала также смесь энтерококка с *L. plantarum* ОНУ311 (33,3% ингибирования). Показано, что механизмом ингибирующего действия бактерий штамма *E. italicus* ОНУ547 против фитопатогенов могли быть высокие адгезивные способности и/или конкуренция за питательные вещества, тогда как антагонистическую активность их консорциумов с лактобациллами можно объяснить, кроме того, действием органических кислот.

Ключевые слова: антагонистические свойства, молочнокислые бактерии, биопленки.

Вступ

Молочнокислі бактерії (МКБ) – група мікроорганізмів, для яких відомі високі антагоністичні властивості проти фітопатогенних бактерій (Ржевская и др., 2014). Відомо, що фітопатогени несуть серйозну загрозу сільському господарству, і тому лактобактерії, які здатні пригнічувати їх ріст, заслуговують особливого інтересу (Булеца на ін., 2015). З літературних джерел відомо про інгібувальну активність різних видів МКБ проти фітопатогенних бактерій, таких як *Rhizobium radiobacter*, *Erwinia carotovora*, *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas syringae*, яку було показано *in vivo* (Limanska et al., 2012, 2014; Korotaeva et al., 2013; Narasimha et al., 2012; Visser et al., 1986). Крім того, ще однією корисною для сільського господарства властивістю МКБ є здатність до біоплівкоутворення на поверхні рослин, оскільки однією з численних функцій біоплівки є захист рослин від фітопатогенів (Галкін та ін., 2012). Однак антагоністичні властивості проти фітопатогенів *in vivo* і здатність до утворення біоплівки на поверхнях рослин МКБ виду *Enterococcus italicus* та їх консорціумів з *Lactobacillus plantarum* досі ще не було вивчено.

Тому метою цієї роботи було дослідити антагоністичні властивості та здатність до утворення біоплівки бактерій штаму *E. italicus* ОНУ547 та їх консорціумів з *L. plantarum* на моделях *in vivo*.

Об'єкти та методи дослідження

В експериментах було використано бактерії штаму *Enterococcus italicus* ОНУ547, який ізолювали з тайської ферментованої капусти, та два штами *Lactobacillus plantarum* – ОНУ12 та ОНУ311, що були виділені з виноградного суслу та ідентифіковані в наших попередніх дослідженнях (Merlich et al., 2013). Добові культури указаних штамів МКБ було вирощено у рідкому середовищі de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) (Василиук та ін., 2014) при 37°C. Фітопатогенні бактерії штамів збудника бактеріальної гнилі *E. carotovora* ZM1, що був люб'язно наданий д.б.н., проф. Ф.І.Товкачем, та збудника бактеріального раку *R. radiobacter* C58 було вирощено при 28°C в NB (nutrient broth, Himedia, Індія) для отримання добових культур.

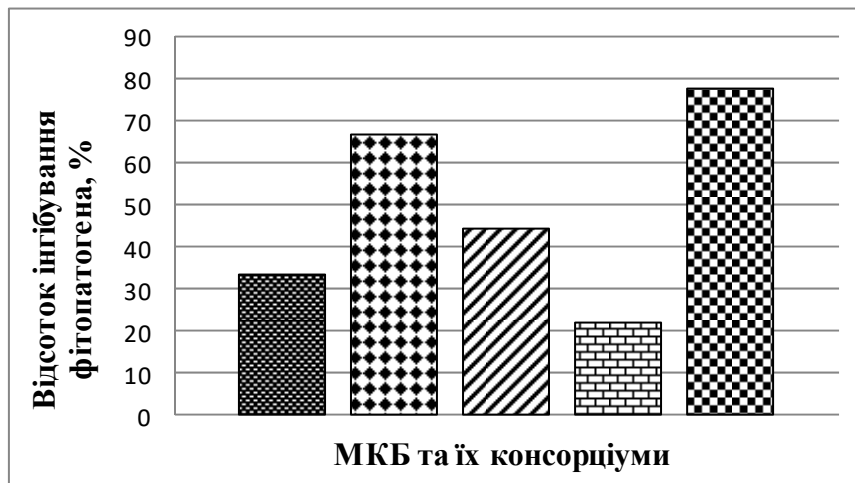
Визначення антагоністичної активності лактобактерій проти фітопатогенів *in vivo* проводили на експлантах моркви (*Daucus carota* L.). З попередньо ретельно промитих коренеплодів знімали у стерильних умовах верхній шар, фломбували та нарізали для отримання дисків-експлантів (Ryder et al., 1985). Їх клали апікальною стороною вгору в вологі чашки Петрі (з шаром фільтрувального паперу на дні), що містили 10 мл стерильної води з водогону. Добові культури бактерій штамів *E. italicus* ОНУ547, *L. plantarum* ОНУ12 та *L. plantarum* ОНУ311 використовували в концентраціях 10^8 , 10^9 та 10^9 кл/мл, відповідно. З добових культур готували консорціуми бактерій *E. italicus* ОНУ547 + *L. plantarum* ОНУ12, *E. italicus* ОНУ547 + *L. plantarum* ОНУ311, *L. plantarum* ОНУ12 + *L. plantarum* ОНУ311 в пропорції 1:1 та *E. italicus* ОНУ547 + *L. plantarum* ОНУ12 + *L. plantarum* ОНУ311 в пропорції 1:1:1. Далі 100 мкл отриманих консорціумів та окремо бактерій *E. italicus* ОНУ547 наносили на поверхню експлантів моркви в зоні розміщення камбіального кільця та після цього додавали 100 мкл добових культур *R. radiobacter* C58 або *E. carotovora* ZM1. В якості контролів використовували експланти, на які наносили окремо фітопатогени, MRS та фітопатогени. Інкубацію здійснювали при кімнатній температурі протягом 15–30 діб. Було виконано чотири незалежних експерименти по три повтори в кожному, облік результатів і статистичну обробку проводили, як описано в наших попередніх роботах (Мерліч, Ліманська, 2016; Limanska et al., 2015).

Здатність до утворення біоплівки на поверхнях рослин вивчали на моделі крес-салату (*Lepidium sativum* L.) та пшениці (*Triticum vulgare*). Для цього насіння рослин стерилізували за допомогою 25% перекису водню на протязі однієї хвилини, три рази промивали в стерильній воді з водогону та пророщували в стерильній вологій камері впродовж трьох діб. Суспензії добових культур МКБ доводили до концентрації 10^8 кл/мл стерильним фізіологічним розчином, готували

комбінації консорціумів бактерій, як описано вище, та вносили у лунки планшети в об'ємі 1,5 мл. Потім у кожен лунку поміщали проросток крес-салату або пшениці. Інкубацію здійснювали при 37°C впродовж доби. На другий день утворені біоплівки на поверхнях рослин фіксували за допомогою 96% етанолу протягом 15 хв та забарвлювали 1% розчином акридинового помаранчевого впродовж 10 хв. Потім проростки викладали на предметні скельця та після висихання корінці обстежували на наявність біоплівок за допомогою мікроскопа зі збільшенням $\times 320$. Експерименти були виконані в п'яти повторях, та рівень сформованості біоплівок оцінювали за системою плюсів, як описано у роботах (Галкін та ін., 2012).

Результати та обговорення

Фітопатогенні бактерії штаму *R. radiobacter* C58 виявилися чутливими до використаних в роботі МКБ та їх консорціумів. Так, бактерії штаму *E. italicus* ОНУ547 інгібували ріст фітопатогена на 33,3%, а найвищу активність проявив консорціум бактерій всіх трьох штамів МКБ, який пригнічував ріст на 77,7% (рис. 1). Високу антагоністичну активність показав також консорціум бактерій штамів *L. plantarum* ОНУ12 + *L. plantarum* ОНУ311, який інгібував ріст *R. radiobacter* C58 на 66,7%, що, однак, на 33,3% менше, ніж антагоністична дія окремих штамів (Мерліч, Ліманська, 2016). Додавання *E. italicus* ОНУ547 до консорціуму лактобактерій сприяло збільшенню антагоністичної активності проти *R. radiobacter* C58 на 11%. Комбінація бактерій штамів *E. italicus* ОНУ547 + *L. plantarum* ОНУ12 пригнічувала ріст фітопатогена на 44,7%, а *E. italicus* ОНУ547 + *L. plantarum* ОНУ311 – на 22,3%.



- *E. italicus* ОНУ547
- *L. plantarum* ОНУ12 + ОНУ311
- *E. italicus* ОНУ547 + *L. plantarum* ОНУ12
- *E. italicus* ОНУ547 + *L. plantarum* ОНУ311
- *E. italicus* ОНУ547 + *L. plantarum* ОНУ12 + *L. plantarum* ОНУ311

Рис. 1. Антагоністична активність консорціумів бактерій штамів *E. italicus* ОНУ547, *L. plantarum* ОНУ12 та *L. plantarum* ОНУ311 проти *R. radiobacter* C58 на експлантах моркви

Бактерії штаму *E. italicus* ОНУ547 інгібували ріст *E. carotovora* ZM1 на 24,8% (рис. 2). Найвищу антагоністичну активність проти цього штаму фітопатогенних бактерій продемонстрували консорціуми бактерій штамів *E. italicus* ОНУ547 + *L. plantarum* ОНУ 311 та всіх трьох штамів МКБ, що спричинили 33,3% інгібування.

Консорціуми бактерій *E. italicus* ОНУ547 + *L. plantarum* ОНУ12 та *L. plantarum* ОНУ12 + *L. plantarum* ОНУ311 інгібували ріст *E. carotovora* ZM1 на 22% та 16,5% відповідно. Таким чином, додавання бактерій штаму *E. italicus* ОНУ547 до бактерій штамів *L. plantarum* ОНУ12 та ОНУ311 сприяло підвищенню інгібувальної активності на 5,5% та 16,8%. Низьку інгібувальну активність

суміші *L. plantarum* ОНУ12 + *L. plantarum* ОНУ311 можна пояснити низьким антагонізмом окремого штаму *L. plantarum* ОНУ311, який був показаний в нашому попередньому дослідженні (Мерліч, Ліманська, 2016).

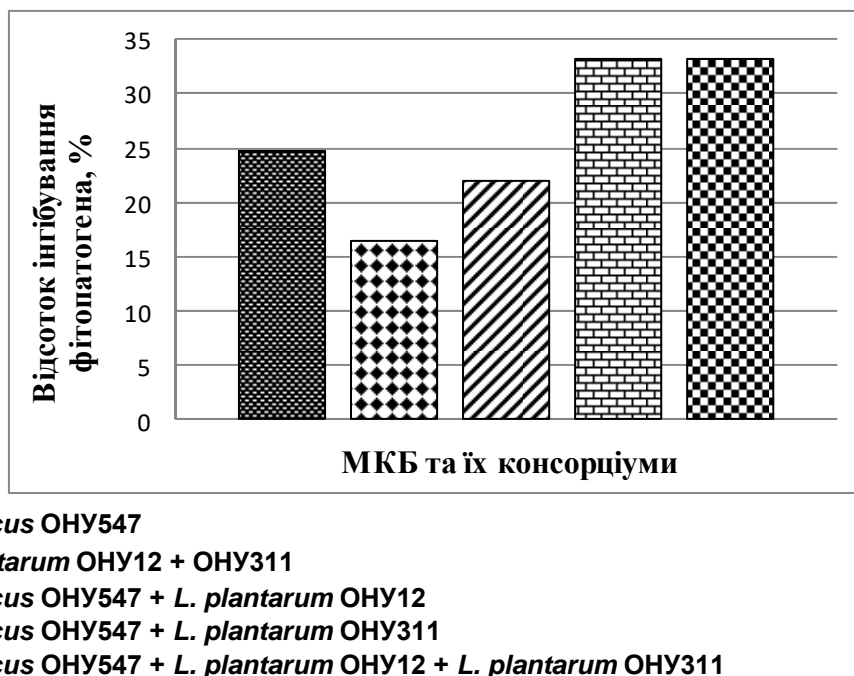


Рис. 2. Антагоністична активність консорціумів бактерій штамів *E. italicus* ОНУ547, *L. plantarum* ОНУ12 та *L. plantarum* ОНУ311 проти *E. carotovora* ZM1 на експлантах моркви

Антагоністичну активність бактерій виду *L. plantarum* проти фітопатогенів на коренеплодах моркви було показано в роботах Ж.Сергєєвої (Сергєєва та ін., 2012, 2016) та наших попередніх публікаціях (Мерліч, Ліманська, 2016; Limanska et al., 2015). Інгібувальну активність їх консорціумів з бактеріями виду *E. italicus* проти фітопатогенів *in vivo* в цій роботі показано вперше. Крім того, це перше повідомлення про антагоністичну активність МКБ виду *E. italicus* проти фітопатогенних бактерій *E. carotovora* та *R. radiobacter*, як і проти фітопатогенів взагалі. Відомо, що МКБ проявляють свою антагоністичну активність шляхом конкурентної адгезії та конкуренції за поживні речовини та, крім того, за допомогою продукції спектру антагоністичних речовин, які включають органічні кислоти, перекис водню, діацетил та бактеріоцини (Гармашева та ін., 2015; Сергєєва та ін., 2012; Lindgren, Dobrogosz, 1990). Особливої уваги заслуговує механізм антагоністичної активності бактерій *E. italicus* ОНУ547 проти використаних в роботі фітопатогенів. В наших попередніх дослідженнях для *E. italicus* ОНУ547 показано здатність до продукції бактеріоцину, який, проте, виявився неактивним проти грамнегативних бактерій, включаючи *E. carotovora* ZM1 та *R. radiobacter* C58 (Мерліч та ін., 2017). Як показано в нашій попередній роботі (Мерліч та ін., 2017), цей штам МКБ через добу не закисляв в значній мірі культуральну рідину (рН 5). Тому, найбільш вірогідним механізмом інгібувальної дії *E. italicus* ОНУ547, як і інших МКБ, проти фітопатогенів *in vivo* можуть бути високі адгезивні властивості або/та здатність до конкуренції за поживні речовини. Можливими механізмами інгібування фітопатогенів консорціумами лактобацил можуть бути також органічні кислоти, які вони утворюють. Дійсно, на відміну від *E. italicus*, рН консорціумів лактобацил складав від 4,3 (*L. plantarum* ОНУ12 + *L. plantarum* ОНУ311) до 4,7 (*E. italicus* ОНУ547 + *L. plantarum* ОНУ311), що пояснюється дією органічних кислот лактобацил.

Крім антагоністичної активності *E. italicus* ОНУ547 окремо та консорціуми МКБ проявили здатність до утворення біоплівки, що було продемонстровано на моделях корінців проростків крес-салату та пшениці (табл. 1).

Таблиця 1.
 Утворення біоплівки бактеріями *E. italicus*, *L. plantarum* та їх консорціумів на коренях пшениці та крес салату

МКБ та їх консорціуми	Біоплівка на коренях крес-салату	Біоплівка на коренях пшениці
<i>E. italicus</i> ОНУ547	+++	++
<i>E. italicus</i> ОНУ547 + <i>L. plantarum</i> ОНУ12	+++	++++
<i>E. italicus</i> ОНУ547 + <i>L. plantarum</i> ОНУ311	++++	++++
<i>E. italicus</i> ОНУ547 + <i>L. plantarum</i> ОНУ12 + <i>L. plantarum</i> ОНУ311	++++	++++
<i>L. plantarum</i> ОНУ12 + <i>L. plantarum</i> ОНУ311	+++	+++

Так, бактерії штаму *E. italicus* ОНУ547 формували біоплівки на корінцях рослин крес-салату та пшениці. Найвищу здатність до формування біоплівок на обох моделях рослин проявили консорціуми *E. italicus* ОНУ547 + *L. plantarum* ОНУ311 та *E. italicus* ОНУ547 + *L. plantarum* ОНУ12 + *L. plantarum* ОНУ311. В літературних джерелах є повідомлення про здатність *L. plantarum* до утворення біоплівок на поверхнях рослин (Kachouri et al., 2016; Галкін та ін., 2012). Консорціум бактерій штамів *L. plantarum* ОНУ12 + *L. plantarum* ОНУ311 без *E. italicus* ОНУ547 в своєму складі проявив дещо нижчу здатність до біоплівоутворення. Це свідчить про те, що додавання бактерій ентерококу до консорціуму лактобацил підвищує рівень сформованості біоплівки. В наших попередніх експериментах відмічено здатність до утворення біоплівок на поверхнях коренів крес-салату бактеріями окремих штамів вищезгаданого консорціуму (неопубліковані данні). Рівень утворення біоплівки бактеріями консорціуму не відрізнявся від рівня, що проявили бактерії окремого штаму *L. plantarum* ОНУ12, та був вищим від *L. plantarum* ОНУ311.

Здатність МКБ до утворення біоплівок на поверхнях корінців рослин є цінною властивістю, яка здатна забезпечити ризосферну компетенцію, що в свою чергу є необхідною умовою для здійснення біологічного контролю за фітопатогенами (Shrestha et al., 2014).

Висновки

1. Бактерії штаму *E. italicus* ОНУ547 проявили антагоністичну активність проти фітопатогенів *R. radiobacter* та *E. carotovora in vivo*, як окремо, так і в консорціумах з бактеріями штамів *L. plantarum* та продемонстрували високу здатність до біоплівоутворення на коренях крес-салату та пшениці.

2. Вивчені консорціуми бактерій, які поєднують в собі такі властивості, як антагоністична активність проти фітопатогенів та здатність до утворення біоплівки на поверхні корінців рослин, можуть бути перспективними для створення екологічно чистих біопрепаратів для захисту рослин.

Список літератури

- Булеца Н.М., Буценко Л.М., Пасічник Л.А., Патица В.П. Чутливість фітопатогенних бактерій до стрептоміцину за дії пестицидів // Мікробіологічний журнал. – 2015. – Т.77, №6. – С. 62–69. /Buletsa N.M., Butsenko L.M., Pasichnyk L.A., Palyka V.P. Chutlyvist' fitopatogennykh bakteriy do streptomitsynu za dii pestytsydiv // Mikrobiologichnyy zhurnal. – 2015. – T.77, no. 6. – S. 62–69./
- Василіук О.М., Коваленко Н.К., Гармашева І.Л. Антагоністичні властивості штамів *Lactobacillus plantarum*, ізольованих із традиційних ферментованих продуктів України // Мікробіологічний журнал. – 2014. – Т.76, №3. – С. 24–30. /Vasylyuk O.M., Kovalenko N.K., Garmasheva I.L. Antagonistychni vlastyvoli shtamiv *Lactobacillus plantarum*, izol'ovanykh iz tradytsiynykh fermentovanykh produktiv Ukrainy // Mikrobiologichnyy zhurnal. – 2014. – T.76, no. 3. – S. 24–30./
- Галкін М.Б., Ліманська Н.В., Філіпова Т.О., Іваниця В.О. Формування біоплівки бактеріями *Lactobacillus plantarum* на коренях рослин *Lepidium sativum* L. // Мікробіологія і Біотехнологія. – 2012. – №3. – С. 34–43. /Galkin M.B., Limanska N.V., Filipova T.O., Ivanytsya V.O. Formuvannya bioplivky bakteriyamy *Lactobacillus plantarum* na korenyakh roslin *Lepidium sativum* L. // Mikrobiologiya i Biotekhnologiya. – 2012. – No. 3. – S. 34–43./
- Гармашева І.Л., Василіук О.М., Коваленко Н.К., Олещенко Л.Т. Дослідження природи антагоністичної дії штамів *Lactobacillus plantarum* щодо умовно-патогенних та фітопатогенних мікроорганізмів // Мікробіологія і Біотехнологія. – 2015. – №2. – С. 49–58. /Garmasheva I.L., Vasylyuk O.M., Kovalenko N.K., Oleshchenko L.T. Doslidzhennya pryrody antagonistychnoi dii shtamiv *Lactobacillus plantarum* shchodo umovno-patogennykh ta fitopatogennykh mikroorganizmiv // Mikrobiologiya i Biotekhnologiya. – 2015. – No. 2. – S. 49–58./
- Мерліч А.Г., Жуньо І.Д., Ліманська Н.В., Іваниця В.О. Антагоністична активність продуктів

- метаболізму бактерій *Lactobacillus plantarum* та *Enterococcus italicus* за сумісної дії проти фітопатогенних бактерій // Мікробіологія і Біотехнологія. – 2017. – №3. – С. 45–54. /Merlich A.H., Zhun'ko I.D., Limans'ka N.V., Ivanytsya V.O. Antagonistychna aktyvnist' produktiv metabolizmu bakteriy *Lactobacillus plantarum* та *Enterococcus italicus* za sumisnoi dii proty fitopatogennykh bakteriy // Mikrobiologiya i Biotekhnologiya. – 2017. – No. 3. – S. 45–54./
- Мерліч А.Г., Ліманська Н.В. Антагоністична активність бактерій *Lactobacillus plantarum*, виділених з рослинних джерел України та Франції, проти фітопатогенних бактерій // Мікробіологія і Біотехнологія. – 2016. – №4. – С. 71–85. /Merlich A.H., Limans'ka N.V. Antagonistychna aktyvnist' bakteriy *Lactobacillus plantarum*, vydilyenykh z roslynykh dzhерel Ukrainy ta Frantsii, proty fitopatogennykh bakteriy // Mikrobiologiya i Biotekhnologiya. – 2016. – No. 4. – S. 71–85./
- Ржевская В.С., Отурина И.П., Теплицкая Л.М. Изучение биологических свойств штаммов молочнокислых бактерий // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И.Вернадского, Серия «Биология, химия». – 2014. – Т.27 (66), №1. – С. 145–160. /Rzhevskaya V.S., Oturina I.P., Teplytskaya L.M. Izucheniye biologicheskikh svoystv shtammov molochnokislykh bakteriy // Uchenyye zapiski Tavricheskogo natsionalnogo universiteta im. V.I.Vernadskogo, Seriya "Biologiya, khimiya". – 2014. – T.27(66), no. 1. – S. 145–160./
- Сергеева Ж.Ю., Крилова К.Д., Ліманська Н.В. та ін. Вплив *Lactobacillus plantarum* ONU87 та автолізу бактерій *Erwinia carotovora* ZM1 на інфекційність збудників м'якої гнилі // Мікробіологія і Біотехнологія. – 2012. – №4. – С. 18–28. /Sergeyeva Zh.Yu., Krylova K.D., Limans'ka N.V. ta in. Vplyv *Lactobacillus plantarum* ONU87 ta avtolizatu bakteriy *Erwinia carotovora* ZM1 na infektsiynist' zbudnykiv m'yakoi gnyli // Mikrobiologiya i Biotekhnologiya. – 2012. – No. 4. – S. 18–28./
- Сергеева Ж.Ю., Басюл О.В., Горшкова О.Г. та ін. Антагоністична активність лактобактерій, ізольованих із ферментованих рослинних продуктів із В'єтнаму // Мікробіологія і Біотехнологія. – 2016. – №4. – С. 50–59. /Sergeyeva Zh.Yu., Basyul O.V., Gorshkova O.H. ta in. Antagonistychna aktyvnist' laktobakteriy, izol'ovanykh iz fermentovanykh roslynykh produktiv iz V'etnamu // Mikrobiologiya i Biotekhnologiya. – 2016. – No. 4. – S. 50–59./
- Kachouri F., Ksontini H., El Abed S. et al. *Lactobacillus plantarum*: effect of a protective biofilm on the surface of olives during storage // Brazilian Journal of Microbiology. – 2016. – Vol.47. – P. 202–209.
- Korotaeva N.V., Kondratiuk T.V., Basiul O.V. et al. Effect of *Lactobacillus plantarum* ONU87 in mixture with autolysate of erwinias on formation of tumors caused by *Rhizobium radiobacter* C58 // Microbiology and Biotechnology. – 2013. – No. 2. – P. 6–14.
- Limanska N.V., Korotaeva N.V., Yamborko G.V., Ivanytsya V.O. Effect of *Lactobacillus plantarum* on tumor formation caused by *Rhizobium radiobacter* // Microbiology and Biotechnology. – 2014. – No. 1. – P. 8–18.
- Limanska N., Ivanytsya T., Choiset Y. et al. Effect of *Enterococcus durans* bacteriocin on bacterial wilt agent // Microbiology and Biotechnology. – 2012. – No. 2. – P. 30–40.
- Limanska N., Korotaeva N., Biscola V. et al. Study of potential application of lactic acid bacteria in the control of infection caused by *Agrobacterium tumefaciens* // Plant Pathology & Microbiology. – 2015. – Vol.6, issue 8. – P. 1–9.
- Lindgren S.E., Dobrogosz W.J. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations // FEMS Microbiology Reviews. – 1990. – Vol.7 (1–2). – P. 149–163.
- Merlich A.G., Ivanytsya V.O., Korotaeva N.V. et al. *Lactobacillus plantarum* from berries of grape cultivated in the south of Ukraine // Microbiology and Biotechnology. – 2013. – No. 3. – P. 31–39.
- Narasimha M., Malini M., Savitha J., Srinivas C. Lactic acid bacteria (LAB) as plant growth promoting bacteria (PGPB) for the control of wilt of tomato caused by *Ralstonia solanacearum* // Pest Management in Horticultural Ecosystems. – 2012. – Vol.18, no. 1. – P. 60–65.
- Ryder M.H., Tate M.E., Kerr A. Virulence properties of strains of *Agrobacterium* on the apical and basal surfaces of carrot root discs // Plant Physiol. – 1985. – Vol.77. – P. 215–221.
- Shrestha A., Kim B.S., Park D.H. Biological control of bacterial spot disease and plant growth-promoting effects of lactic acid bacteria on pepper // Biocontrol Science and Technology. – 2014. – Vol.24, no. 7. – P. 763–779.
- Visser R., Holzapfel W.H., Bezuidenhout J.J., Kotzé J.M. Antagonism of lactic acid bacteria against phytopathogenic bacteria // Applied and Environmental Microbiology. – 1986. – Vol.52, no. 3. – P. 552–555.

Представлено: Б.Н.Мілкус / Presented by: B.N.Milkus

Рецензент: Є.Е.Перський / Reviewer: Ye.E.Persky

Подано до редакції / Received: 05.10.2017

УДК: 579.222:591.132

Етіологічна роль та чутливість анаеробних бактерій, виділених від хворих з гнійним некротичним панкреатитом, до антибіотиків В.В.Поточилова¹, В.Г.Войцеховський²

¹Комунальний заклад Київської обласної ради «Київська обласна клінічна лікарня» (Київ, Україна)

²Національний медичний університет імені О.О.Богомольця (Київ, Україна)
Vika.ptch@gmail.com

З метою з'ясування можливостей обов'язкового застосування препаратів з антианаеробною активністю в схемах комбінованої або монотерапії у лікуванні пацієнтів з гострим некротичним панкреатитом вивчали видовий склад облигатно-анаеробних мікроорганізмів у оперативному матеріалі від цих пацієнтів та визначали їх чутливість до антимікробних препаратів. Обстежено 86 пацієнтів з діагнозом гострий некротичний панкреатит, з них 51 пацієнт чоловічої статі (середній вік чоловіків становив 49,6±11 років) та 35 жінок (середній вік жінок – 56±12 років.) З гнійного вмісту хворих виділено 63 штами анаеробних мікроорганізмів. Висока чутливість представників анаеробної мікрофлори виявлена в основному до ванкоміцину – 83,8%, іміпенему – 88,7%, колістину – 80,6%, меропенему – 82,2%. Це вказує на доцільність більш широкого застосування цих препаратів та їх аналогів при анаеробній інфекції у пацієнтів з гострим некротичним панкреатитом. Підтверджено дані інших авторів щодо високої стійкості до аміноглікозидів у анаеробних мікроорганізмів, виділених від хворих з гострим некротичним панкреатитом. В нашому дослідженні виявлено знижену чутливість виділених штамів до метронідазолу (66,13%), у порівнянні з представленою іншими авторами у літературі (99,2%).

Ключові слова: некротичний панкреатит, анаеробні мікроорганізми, антибактеріальні препарати, антибіотикорезистентність.

The etiological role and sensitivity of anaerobic bacteria isolated from patients with purulent necrotizing pancreatitis to antibiotics V.V.Potochilova, V.G.Voicehovskii

In order to find out the possibility of obligatory administration of drugs with anti-anaerobic activity in combined or monotherapy in the treatment of patients with acute necrotic pancreatitis, the species composition of obligate anaerobic microorganisms in the surgical material from these patients was studied and their susceptibility to antimicrobial drugs was determined. 86 patients were diagnosed with acute necrotizing pancreatitis, of which 51 male patients (mean age 49.6±11 years old) and 35 female patients (mean age 56±12 years old). 63 strains of anaerobic microorganisms were isolated from the purulent content of the patients. The high sensitivity of the anaerobic microflora was revealed mainly to vancomycin – 89.8%, imipenem – 88.7%, colistin – 80.6% and meropenem – 82.2%. This indicates the expediency of wider application of used drugs and their analogues in anaerobic infections treatment in patients with acute necrotizing pancreatitis. The results of other authors concerning high resistance of anaerobic microorganisms isolated from patients with acute necrotizing pancreatitis to aminoglycosides have been confirmed. The reduced sensitivity of the isolated strains to metronidazole (66.13%) has been revealed, as compared with revealed by other authors (99.2%).

Key words: necrotic pancreatitis, anaerobic microorganisms, antibacterial drugs, antibiotic resistance.

Этиологическая роль и чувствительность анаэробных бактерий, выделенных у больных с гнойным некротическим панкреатитом, к антибиотикам В.В.Поточилова, В.Г.Войцеховский

С целью выяснения возможности обязательного применения препаратов с антианаэробной активностью в схемах комбинированной или монотерапии в лечении пациентов с острым некротическим панкреатитом был изучен видовой состав облигатно-анаэробных микроорганизмов в оперативном материале от этих больных и определена их чувствительность к антимикробным препаратам. Обследовано 86 пациентов с диагнозом острый некротический панкреатит, из них 51 пациент мужского пола (средний возраст мужчин составлял 49,6±11 лет) и 35 женского (средний возраст женщин – 56±12 лет. Из гнойного содержимого больных выделено 63 штамма анаэробных

мікроорганізмів. Высокая чувствительность представителей анаэробной микрофлоры обнаружена в основном к ванкомицину – 83,8%, имипенему – 88,7%, колистину – 80,6%, меропенему – 82,2%. Это указывает на целесообразность более широкого применения использованных препаратов и их аналогов при анаэробной инфекции у пациентов с острым некротическим панкреатитом. Подтверждены данные других авторов о высокой устойчивости к аминогликозидам анаэробных микроорганизмов, выделенных от больных с острым некротическим панкреатитом. Выявлена сниженная чувствительность выделенных штаммов к метронидазолу (66,13%), по сравнению с представленной другими авторами в литературе (99,2%).

Ключевые слова: некротический панкреатит, анаэробные микроорганизмы, антибактериальные препараты, антибиотикорезистентность.

Вступ

В наукових публікаціях з'являється все більше даних, які свідчать, що в етіології запальних процесів при гострому некротичному панкреатиті важливе місце, поряд з аеробними та факультативно-анаеробними мікроорганізмами і клостридіями, займають неспороутворюючі анаеробні бактерії. За даними різних авторів, що мають досвід у вивченні анаеробних інфекцій, неклостридіальні анаеробні та клостридіальні бактерії з різних джерел виділяються у 20–70 % випадків (Хирургические инфекции, 2003).

Ця проблема важлива не тільки у зв'язку з високою питомою вагою неспороутворюючих анаеробних бактерій в патології і мало вивченим спектром клінічних проявів, але і з великими труднощами їх лабораторного вивчення, що потребує нових підходів при діагностиці, лікуванні та попередженні захворювань.

Бактеріальна транслокація збудників з просвіту кишківника внаслідок порушення бар'єрної функції його стінки вважається основним механізмом виникнення гнійно-септичних ускладнень гострого некротичного панкреатиту. Надлишкове надходження бактерій в систему ворітної вени може сприяти розвитку поліорганної недостатності (Савельев, 2004).

Метою роботи було вивчити видовий склад облигатно-анаеробних мікроорганізмів в оперативному матеріалі від хворих на гострий некротичний панкреатит та визначити їх чутливість до антимікробних препаратів.

Матеріали та методи

У період 2011–2016 рр. до Комунального закладу Київської обласної ради «Київська обласна клінічна лікарня» поступило 86 пацієнтів з діагнозом гострий некротичний панкреатит. З них 51 пацієнт чоловічої статі (59,31%) та 35 жіночої (40,69%). Середній вік чоловіків складав 49,6±11 років, середній вік жінок складав 56±12 років.

Одним з першочергових завдань дослідження було виділення з гнійного вмісту тканини підшлункової залози та оточуючої парапанкреатичної клітковини анаеробних мікроорганізмів. Кількісний склад мікроорганізмів визначали з гнійного вмісту, отриманого при ендоскопічному обстеженні, а також під час оперативних втручань та при санаціях черевної порожнини.

Матеріал транспортували до бактеріологічної лабораторії відповідно до правил забору та транспортування матеріалу (Зубков, 2004). Культивування здійснювали у тіогліколевому середовищі з додаванням резазурину та на збагаченому 5% кров'яному м'ясопептонному агарі.

Всі застосовані поживні середовища дозволені до використання в Україні і мають сертифікат якості (паспорт) та інструкцію з використання.

Для приготування розчинів, реактивів і поживних середовищ використовували дистильовану воду за «ГОСТ 6709-72».

Для зменшення дифузії кисню з повітря після посіву матеріалу пробірки заливали зверху стерильною вазеліновою олією (товщина шару 1–1,5 см). Інкубували при температурі 37°C протягом 48–72–96 годин до появи видимого росту мікроорганізмів в пробірці.

Для проведення наступного етапу мікроорганізми, які виростили в пробірках, відбирали піпеткою для подальшого посіву на збагачений 5% кров'яний м'ясопептонний агар і розсівали за Голдом.

Умов анаеробіозу досягали в анаеростатах GENbox 7,0 L та GENbox 2,5 L виробництва Biomerieux, Франція. Умов анаеробіозу досягали за допомогою анаеропакетів GENbox анаер виробництва Biomerieux, Франція. Контроль анаеробіозу проводили за допомогою Anaer Indikator виробництва Biomerieux, Франція.

Тест на чутливість до антибактеріальних та хіміотерапевтичних препаратів показаний при кожному інфекційному процесі. Тест на чутливість проводили з чистою культурою мікроорганізмів, що попередньо була виділена на щільному поживному середовищі. В результаті визначались мінімальні інгібуючі концентрації (МІК), на основі яких розраховували дозування препарату. Традиційні методи визначення МІК засновані на використанні антибіотиків. МІК була найменша концентрація, що викликала інгібіцію мікроорганізмів.

Визначення чутливості виділених культур мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів проводили також і диско-дифузійним методом, за Баер та Кірбі, з використанням стандартних комерційних дисків з антибактеріальними препаратами виробництва HiMedia (Індія), інтерпретували у відповідності до рекомендацій CLSI – 2014 року (CLSI: Clinical and Laboratory Standard Institute, 2014).

Ідентифікацію мікроорганізмів проводили на мікробіологічному аналізаторі VITEK 2 compact 15 (Франція). Культури анаеробних мікроорганізмів, що вирости впродовж 48–72 годин у напіврідкому середовищі, пересівали на збагачений 5% кров'яний агар Мюллера-Хінтона, накладали диски з антимікробними препаратами та інкубували в термостаті при температурі 37°C до 72 години.

Результати та обговорення

Досліджували культури анаеробних мікроорганізмів у пацієнтів з гнійним некротичним панкреатитом. З гнійного вмісту хворих на гострий некротичний панкреатит було виділено 63 культури анаеробних мікроорганізмів; їх перелік та кількість представлені в табл. 1.

Таблиця 1.

Види анаеробних мікроорганізмів та кількість штамів, виділених з гнійного вмісту при гострому некротичному панкреатиті

№ з/п	Вид мікроорганізмів	Кількість штамів	
		При ендоскопічному обстеженні, кількість	Під час оперативних втручань і при санаціях порожнин, кількість
1	<i>Bacteroides ureolyticus</i>	12	3
2	<i>Bacteroides</i> spp.	4	0
3	<i>Clostridium sordellii</i>	5	2
4	<i>Clostridium</i> group	7	0
5	<i>Clostridium innocuum</i>	7	0
6	<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>	8	0
7	<i>Veillonella</i> spp.	6	0
8	<i>Anaerococcus prevotii</i>	7	1
9	<i>Fusobacterium</i> spp.	0	1
	Всього	56	7

Встановлено, що бактероїди виділялись частіше за інших анаеробних мікроорганізмів. Було виділено 19 штамів *Bacteroides* spp. Всі виділені штами мікроорганізмів виявились чутливими до колістину та меропенему. Висока чутливість була і до ванкоміцину, кліндаміцину та ампіциліну/сульбактаму. Всі виділені мікроорганізми виявились стійкими до канаміцину.

Всі виділені клостридії, *Peptoniphilus asaccharolyticus*, *Anaerococcus prevotii* та *Veillonella* spp. були найбільш чутливими до тобраміцину, ванкоміцину та іміпенему.

З клінічного матеріалу лише в одному випадку виділився *Fusobacterium* spp. Даний мікроорганізм виявив чутливість до тобраміцину, ванкоміцину, колістину, меропенему, кліндаміцину, іміпенему.

Як видно з представлених в табл. 2 даних, в показниках чутливості досліджуваних культур відмічались певні закономірності. Результати наших досліджень, щодо стійкості анаеробних мікроорганізмів до канаміцину, підтвердили результати, отримані іншими дослідниками (Фурсова, 2012).

Таблиця 2.

Кількість штамів анаеробних мікроорганізмів, виділених при гнійному некротичному панкреатиті, та їх чутливість до антибактеріальних препаратів

№ з/п	Види анаеробних мікроорганізмів	Антибактеріальні препарати								
		Тобраміцин	Канаміцин	Ванкоміцин	Метронідазол	Ампіцил/сульбактам	Кліндаміцин	Іміпенем	Колістин	Меропенем
1	<i>Bacteroides ureolyticus</i> , n=15	3	0	13	10	12	13	14	15	15
2	<i>Bacteroides spp.</i> , n=4	3	0	3	2	4	4	3	4	4
3	<i>Clostridium sordellii</i> , n=7	7	0	7	7	2	2	7	7	7
4	<i>Clostridium group</i> , n=7	6	0	6	4	5	3	6	5	4
5	<i>Clostridium innocuum</i> , n=7	5	0	1	5	1	1	5	5	1
6	<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i> , n=8	8	1	8	3	8	8	8	2	8
7	<i>Veillonella spp.</i> , n=6	6	2	6	4	4	5	5	6	6
8	<i>Anaerococcus prevotii</i> , n=8	7	2	7	5	6	6	7	5	5
9	<i>Fusobacterium spp.</i> , n=1	1	0	1	1	0	1	0	1	1
Всього штамів n=63		46	5	52	41	41	43	55	50	51
% чутливих штамів		74,1	8,06	83,87	66,13	66,1	69,35	88,7	80,65	82,26

Примітки: числа у таблиці означають кількість чутливих штамів; n – загальна кількість штамів.

В цілому, висока чутливість представників анаеробної мікрофлори виявлена в основному до ванкоміцину – 83,8%, іміпенему – 88,7%, колістину – 80,6%, меропенему – 82,2%. Результати наших досліджень вказують на доцільність більш широкого застосування цих препаратів та їх аналогів при анаеробній інфекції у пацієнтів з гострим некротичним панкреатитом.

Зазначимо, що метронідазол має бактерицидний ефект відносно анаеробних мікроорганізмів, ферментні системи яких здатні відновлювати нітрогрупу. Активна відновлена форма препарату порушує реплікацію ДНК і синтез білка в мікробній клітині, а також пригнічує тканинне дихання. Резистентність збудників до метронідазолу розвивається рідко (Джалашев, 1992). Дані літератури та наші дослідження дещо відрізняються стосовно ефективності метронідазолу. За результатами наших досліджень, чутливість виділених штамів до метронідазолу суттєво відрізнялася від даних інших авторів (Фурсова, 2012; Кубышкин, Блатун, 2007). Виявлено знижену чутливість виділених штамів до метронідазолу (66,13%), у порівнянні з представленою іншими авторами у літературі (99,2%) (Кубышкин, Блатун, 2007).

Висновки

1. При аналізі результатів досліджень анаеробних мікроорганізмів, виділених при гострому некротичному панкреатиті, виявлено високий рівень їх чутливості до ванкоміцину – 83,87%, іміпенему – 88,7%, колістину – 80,6% та меропенему – 82,26%.

2. Підтверджено дані інших авторів щодо високої стійкості до аміноглікозидів у анаеробних мікроорганізмів, виділених від хворих з гострим некротичним панкреатитом.

3. Виявлено знижену чутливість виділених штамів до метронідазолу (66,13%), у порівнянні з представленою іншими авторами у літературі (99,2%).

Список літератури

Джалашев Я.Х. Клиника, диагностика и лечение неклостридиальной анаэробной инфекции желчевыводящих путей в военных лечебных учреждениях. Автореф. дис. ... канд. мед. наук /

14.00.27; 03.00.07 – хирургия, микробиология. – Спб, 1992. – 26с. /Dzhalashev Ya.Kh. Klinika, diagnostika i lecheniye neklostridial'noy anaerobnoy infektsii zhelchevyvodyashhikh putey v voyennykh lechebnykh uchrezhdeniyakh. Avtoref. dis. ... kand. med. nauk / 14.00.27; 03.00.07 - khirurgiya, mikrobiologiya. – Spb, 1992 – 26s./

Зубков Н.М. Сбор, транспортировка биологического материала и трактовка результатов микробиологических исследований // Клинич. микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2004. – №2. – С.143–154. /Zubkov N.M. Sbor, transportirovka biologicheskogo materiala i traktovka rezul'tatov mikrobiologicheskikh issledovaniy // Klinich. mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya. – 2004. – No. 2. – S. 143–154./

Кубышкин В.А., Блатун Л.А. Метронидазол при анаэробной неклостридиальной инфекции // РМЖ. – 2007. – №29. – С.2222. /Kubyshkin V.A., Blatun L.A. Metronidazol pri anaerobnoy neklostridial'noy infektsii // RMZh. – 2007. – No. 29. – S. 2222./

Руководство по неотложной хирургии органов брюшной полости / Под ред. В.С.Савельева. – М.: «Триада9Х», 2004. – 640с. /Rukovodstvo po neotlozhnoy khirurgii organov bryushnoy polosti / Pod red. V.S.Savel'yeva. – M.: "Triada9Kh", 2004. – 640s./

Фурсова Н.К. Лекарственная устойчивость микроорганизмов. Учебное пособие. – МО, Щелково: Издатель Мархотин П.Ю., 2012. – 248с. /Fursova N.K. Lekarstvennaya ustoychivost' mikroorganizmov. Uchebnoye posobiye. – MO, Shhelkovo: Izdatel' Markhotin P.Yu., 2012. - 248s./

Хирургические инфекции / Под ред. Н.А.Ерьюхина, Б.Р.Гельфанда, С.А.Шляпникова. – СПб.: Питер, 2003. – 864с. /Khirurgicheskiye infektsii / Pod red. N.A.Yeryukhina, B.R.Gel'fanda, S.A.Shlyapnikova. – SPb.: Piter, 2003. – 864s./

CLSI: Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 24 Informational Supplement. CLSI document M100-S24. – Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute, 2014.

Представлено: Л.В.Авдеева / Presented by: L.V.Avdeeva

Рецензент: С.Е.Перський / Reviewer: Ye.E.Persky

Подано до редакції / Received: 13.09.2017

... ФІЗІОЛОГІЯ ЛЮДИНИ ТА ТВАРИН ...
... PHYSIOLOGY OF HUMAN AND ANIMALS ...

УДК: 577.3

Зміни силової відповіді *musculus soleus* у алкоголізованих щурів з експериментально-індукованою ішемією тривалістю 1 та 2 години
С.Ю.Зай¹, О.П.Мотузюк¹, В.Ю.Білобров², Д.А.Вулицька², О.Д.Ноздренко³, О.М.Абрамчук¹¹Східноєвропейський національний університет імені Лесі Українки (Луцьк, Україна)
svitlana.zay91@ukr.net²Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології та медицини»
(Київ, Україна)³Національний медичний університет імені О.О.Богомольця (Київ, Україна)

Висвітлені результати дослідження змін розвитку силової відповіді *musculus soleus* алкоголізованих щурів з експериментально-індукованою ішемією тривалістю 1 та 2 години. Експериментальну індукцію ішемії здійснювали через 30 днів після початку хронічної алкоголізації шляхом перетискування джгутом зовнішньої клубової артерії. Для реєстрації сили ізометричного скорочення м'яза використовували тензометричну установку. Результати досліджень показали, що в алкоголізованих щурів з експериментально-індукованою ішемією тривалістю 1 та 2 години відбувається значне лінійне пригнічення скоротливої активності скелетних м'язів на різних фазах скоротливого процесу. Відмінності в роботі м'язу, впродовж досліджуваних етапів скорочення, можна пояснити різницею у процесах взаємодії філаментів на дотетанічному та тетанічному етапах скорочення і впливом на ці процеси змін в сполучнотканинних оболонках м'язу при розвитку ішемічних каскадів за дії етанолу. Тобто встановлено порушення скоротливої здатності скелетних м'язів в результаті нехолінергічних ефектів даної патології. Моторна дисфункція м'язу при алкогольній міопатії з експериментально-індукованою ішемією в першу чергу буде проявлятися при виконанні точних позиціонованих рухів і корекції точної цілеспрямованої зміни в суглобових кутах.

Ключові слова: ішемія, хронічна алкоголізація, сила скорочення, *musculus soleus*.

Changes in *musculus soleus* strength response in alcoholic rats with experimentally induced 1 and 2 hours ischemia
S.Yu.Zay, O.P.Motuziuk, V.Yu.Bilobrov, D.A.Vulitskaya, O.D.Nozdrenko, O.M.Abramchuk

In the article there are highlighted the results of changes in *musculus soleus* strength response in alcoholic rats with experimentally induced ischemia duration of 1 and 2 hours duration. Experimental induction of ischemia was carried out, 30 days after the onset of chronic alcoholism, by squeezing the external iliac artery by the tourniquet. A strain gauge was used to record the change in the force of isometric contraction of the muscle. The results of our studies have shown that in alcoholic rats with experimentally induced ischemia with duration of 1 and 2 hours, there is a significant linear suppression of the contractile activity of skeletal muscles in different phases of the contraction process. Differences in the work of muscle, during the studied stages of contraction, can be explained by the difference in the processes of filaments interaction at the pretetanic and tetanic stages of contraction, and by the effect on these processes of changes in the connective tissue *musculus* membranes at the development of ischemic cascades due to effects of ethanol. That is, the violation of the contractile ability of skeletal muscles is revealed as a result of non-cholinergic effects of this pathology. Motor dysfunction of *musculus soleus* at alcoholic myopathy with experimentally induced ischemia will primarily be manifested when performing accurate positioned movements and correcting precise targeted changes in articular angles.

Key words: *ischemia, chronic alcoholism, force of contraction, musculus soleus.*

Изменение силового ответа *musculus soleus* у алкоголизованных крыс с экспериментально-индуцированной ишемией продолжительностью 1 и 2 часа

С.Ю.Зай, О.П.Мотузюк, В.Ю.Белобров, Д.А.Вулицька, О.Д.Ноздренко, О.М.Абрамчук

Отражены результаты исследования изменений силового ответа *musculus soleus* алкоголизованных крыс с экспериментально-индуцированной ишемией продолжительностью 1 и 2 часа. Экспериментальную индукцию ишемии осуществляли через 30 дней после начала хронической алкоголизации, путем пережимания жгутом наружной подвздошной артерии. Для регистрации силы изометрического сокращения мышцы использовали тензометрическую установку. Результаты наших исследований показали, что у алкоголизованных крыс с экспериментально-индуцированной ишемией продолжительностью 1 и 2 часа происходит значительное линейное подавление сократительной активности скелетных мышц на разных фазах сократительного процесса. Различия в работе мышцы, в течение исследуемых этапов сокращения, можно объяснить разницей в процессах взаимодействия филаментов на дотетаническом и тетаническом этапах сокращения, и влиянием на эти процессы изменений в соединительнотканых оболочках мышцы при развитии ишемических каскадов при действии этанола. Таким образом, установлено нарушение сократительной способности скелетных мышц в результате нехолинергических эффектов данной патологии. Моторная дисфункция мышцы при алкогольной миопатии с экспериментально-индуцированной ишемией в первую очередь будет проявляться при выполнении точных позиционированных движений и коррекции точного целенаправленного изменения в суставных углах.

Ключевые слова: ишемия, хроническая алкоголизация, сила сокращения, *musculus soleus*.

Вступ

Ішемічні ушкодження – одні з найпоширеніших патологічних станів скелетних м'язів нижніх кінцівок, становлять більше 35% від загальної кількості пошкоджень опорно-рухового апарату (Murdock, Murdoch, 2012). Вони є однією з основних причин післяопераційних ускладнень (Bortolotto et al., 2004) та, в результаті гострої артеріальної оклюзії, можуть призводити до ампутації кінцівки та навіть смерті людини (Erkut et al., 2007). Загалом ішемія – патологічний стан місцевого недокрів'я, що, зазвичай, зумовлений судинним чинником (звуженням просвіту артерії), який призводить до тимчасової дисфункції або стійкого ушкодження тканини або органу (Bortolotto et al., 2004). Основна мета при лікуванні ішемії – швидке відновлення кровотоку (реперфузія) у пошкоджених ділянках. Така терапія призводить до нового патофізіологічного процесу під назвою реперфузійна травма, яка також викликає істотне ушкодження тканини (Erkut et al., 2007).

Наслідки ішемії залежать від ступеня і швидкості зниження параметрів кровотоку, його тривалості, чутливості тканин до гіпоксії, загального стану організму. Зазвичай, післятравматичне ішемічне ушкодження м'язів виникає внаслідок місцевого гіпертензійного ішемічного синдрому. Ішемічні контрактури виникають внаслідок порушення кровообігу в м'язах, нервах та інших тканинах з наступними їх рубцевими змінами (Turóczy et al., 2014). У походженні цих контрактур важливу роль відіграє ішемічне ушкодження нервових стовбурів та навколосуглобових нервових сплетінь. У більшості випадків лікування вимагає інвазійного втручання.

На сьогодні відомо, що вже після двох годин ішемії скелетного м'язу та подальшої реперфузії суттєво знижується концентрація АТФ одночасно зі значним збільшенням кількості лактату з 25,0 до 114 ммоль/кг сухої ваги. А вже після трьох годин ішемії внутрішньом'язовий запас АТФ складав біля 5% від вихідного рівня, а пул глікогену був вичерпаний на 88% (Carvalho et al., 1997). З функціональної точки зору дані цифри вказують на те, що велика кількість високоенергетичних фосфатних сполук витрачається ішемічно пошкодженою м'язовою клітиною на підтримку гомеостазу, особливо під час першої години ішемізації, і, як наслідок, порушення обміну речовин призводить до значного зростання втомлюваності ішемізованого м'язу (Khoma et al., 2014).

Хронічний алкоголізм призводить до дисфункцій скелетних м'язів, включаючи хворобливість і атрофії із супутньою втратою м'язової маси, зміною ходи і порушенням рухливості. Ці розлади

класифікуються як алкогольна міопатія і супроводжуються важкими метаболічними і фізіологічними змінами у скелетних м'язах (Fernandez-Sola et al., 2007). Алкогольна міопатія спостерігається у хронічних алкоголіків у 40–60 % випадків і зустрічається у п'ять разів частіше, ніж алкогольний цироз печінки (Fernandez-Sola et al., 2007). Патоморфологічні дослідження м'язів за хронічної алкогольної міопатії свідчать про наявність гострого м'язового некрозу (рабдоміолізу) з деструкцією м'язових волокон і внутрішньоклітинним набряком. Дані електроміографії вказують на денерваційну спонтанну активність у вигляді потенціалів фібриляцій, зменшення амплітуди і тривалості потенціалів дії рухових одиниць. Алкогольна міопатія є багатофакторною хворобою, яку супроводжує низка патологічних процесів, а саме: зміни окислювально-відновного статусу та антиоксидантний дисбаланс у скелетних м'язах (Estruch et al., 1993), зниження швидкості білкового синтезу, включаючи міофібрилярні білки (Fernandez-Sola et al., 2002), зміна стану мембран (Ohlendieck et al., 2003), синтез ацетальдегід-білкових аддуктів (Nicolas et al., 2003), порушення вуглеводного, білкового, ліпідного та енергетичного обмінів, сигнальних каскадів, реалізації апоптозу і регуляції генів (Wang et al., 2011), ушкодження ДНК і РНК (Hofer et al., 2005), зменшення швидко-силових показників (Fernandez-Sola et al., 2007), що є результатом інгібування асоціації та дисоціації актоміозинового комплексу через порушення роботи кальцієвої і магнієвої АТФ-аз, морфологічні зміни мітохондрій (Абрамчук та ін., 2008) та саркоплазматичного ретикулу тощо.

У людей, які зловживають алкоголем, досить часто діагностують так званий синдром позиційної ішемії, спричинений стисненням однієї з кінцівок вагою власного тіла внаслідок тривалого перебування у вимушеній позиції. Актуальною проблемою наразі залишається відсутність специфічних маркерів, а також точних діагностичних тестів для швидкого виявлення рівня ішемічної травми за дії етанолу, що має важливе значення для ефективності подальшої її терапії. Метою даного дослідження було з'ясувати зміни силових характеристик скелетних м'язів задніх кінцівок у алкоголізованих щурів за умов експериментально-індукованої ішемії.

Методика

Експерименти проводилися на 25 дорослих щурах лінії Вістар, середньою масою 150 г, яких утримували в умовах стаціонарного віварію.

Досліджувані тварини були поділені на 3 групи (n=5):

- MS_(N) – інтактні тварини;
- MS_(AI-1) – алкоголізовані з експериментально-індукованою ішемією тривалістю 1 год;
- MS_(AI-2) – алкоголізовані з експериментально-індукованою ішемією тривалістю 2 год.

Оперативні втручання та забій тварин виконували відповідно до вимог «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» і норм біомедицинської етики, відповідно до законів України №: 3446-IV 21.02.2006 р., м. Київ, «Про захист тварин від жорстокого поводження» з проведенням медико-біологічних досліджень.

Дослідження було поділено на дві фази: хронічний і гострий експеримент. Експериментальну хронічну алкоголізацію здійснювали за методикою М.Х.Халілова та Ш.А.Закірходжаєва: протягом 30 календарних днів вводили 40% спирт у дозі 2 мл/100 г за допомогою металевого катетера. Тварини контрольної групи аналогічним шляхом отримували еквівалентний об'єм дистильованої води. Усі хірургічні процедури проводились в асептичних умовах під загальною анестезією. Як анестетик застосовували тіопентал натрію (40 мг/кг). Глибину анестезії контролювали шляхом оцінки сили згинального рефлексу при пощипуванні великого пальця ноги.

Експериментальну індукцію ішемії здійснювали через 30 днів після початку хронічної алкоголізації, шляхом перетискування джгутом зовнішньої клубової артерії (*arteria iliaca externa*), стегнової артерії (*arteria femoralis*) та її каудальних терміналей на рівні гомілки. *Musculus soleus* препарували за допомогою попередньо простерилізованих офтальмологічних інструментів. Тварин умертвляли методом декапітації, відразу після екстирпації м'яза.

Адаптований (позбавлений залишків нервів, судин і сполучної тканини) м'язовий препарат протягом 10 хв розміщували у плексигласовій камері при 37°C та постійно циркулюючому фізіологічному розчині Тірде (рН 7,3–7,4). В експериментальному дослідженні використовували хімічні реактиви кваліфікації х.ч. або ч.д.а. («Хімлаборреактив», Україна), етиловий спирт (40%), дистильовану воду.

Для реєстрації зміни сили ізометричного скорочення камбалоподібного м'яза (*musculus soleus*) використовували тензометричну установку. Стимуляцію ішемізованого м'яза здійснювали електричними імпульсами прямокутної форми із такими характеристиками: частота – 30 Гц, тривалість – 0,2 мс, тривалість стимуляційного пробігу – 3000 мс, час релаксації між стимуляційними пробігами – 3 хв.

Статистичний аналіз результатів вимірювання здійснювали методами варіаційної статистики у комп'ютерній програмі Origin 7.0. Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами вибірок використовували U-критерій Манна-Уїтні. Вірогідними вважалися відмінності при $p \leq 0,05$. Результати представлені як середнє арифметичне \pm похибка середнього ($M \pm m$).

Результати та обговорення

На рис. 1 представлено зміну силової відповіді *musculus soleus* у алкоголізованих щурів з експериментально-індукованою ішемією тривалістю 1 та 2 години на електростимуляцію частотою 30 Гц. Результати дослідження показали, що ішемія камбалоподібного м'яза алкоголізованих щурів призводить до зменшення силової продуктивності з кожним наступним тетанічним скороченням в обох групах. Порівнюючи характер зміни тетанічних скорочень у двох групах, слід відмітити, що у $MS_{(Al-1)}$ спостерігається лінійне падіння сили протягом першої половини тесту, після чого тривалий час утримується на відносно однаковому рівні. Зі збільшенням часу ішемії до 2 годин після першого пробігу спостерігається різкий спад, після чого сила знижується поступово.

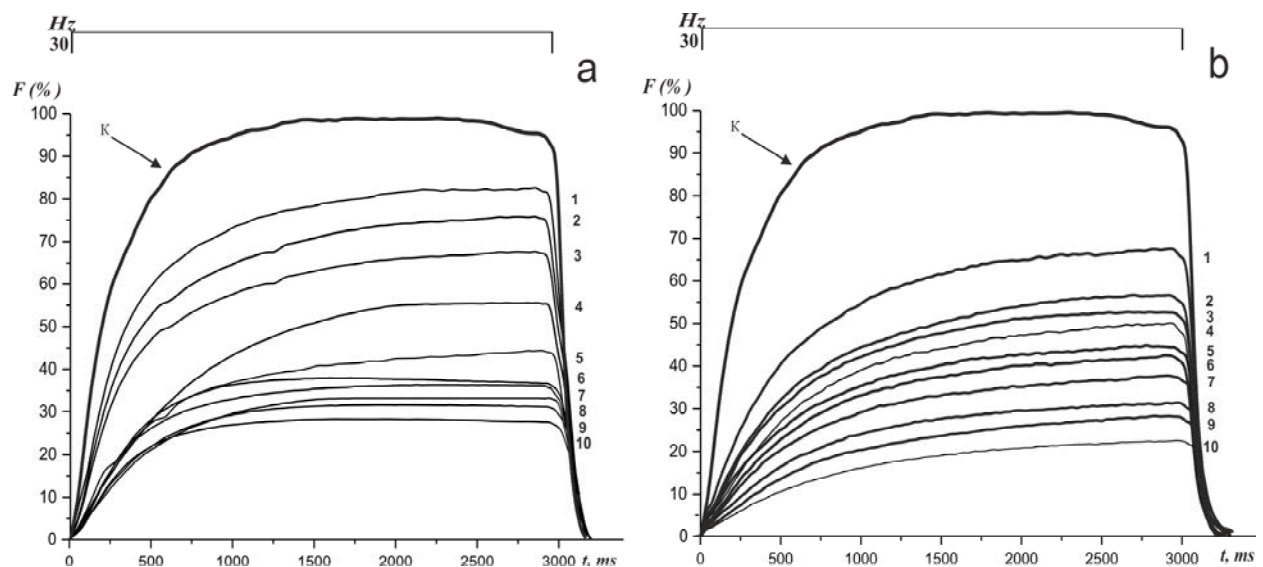


Рис. 1. Зниження силової відповіді *musculus soleus* у алкоголізованих щурів з експериментально-індукованою ішемією тривалістю 1 (а) та 2 (б) години при електростимуляції частотою 30 Гц

$F(\%)$ – сила скорочення представлена в відсотках від контрольних значень, прийнятих за 100%; t, ms – час в мс; 1–10 – порядковий номер послідовних скорочень; k – контрольне значення силової відповіді.

Слід зазначити, що за 2-годинної ішемії спостерігається зрушення часових параметрів скорочення. Зокрема, яскраво виражено збільшення тривалості дотетанічної ділянки, що є наслідком патологічних внутрішньоклітинних процесів в ішемізованому м'язі. Внаслідок цього знижується можливість повної реалізації стимуляційних сигналів мотонейронних пулів, що виражається в першу чергу у неспроможності м'яза втримувати досягнутий рівноважний стаціонарний стан скорочення.

Зміна рівня генерації максимальної сили скорочення є маркером загальної дисфункції м'язової системи. Дисфункція може бути пов'язана з порушенням сумачії трансмембранних струмів у відповідності з внутрішніми властивостями мембрани, що впливає на патологічне перетворення послідовності потенціалів дії, які запускають м'язове скорочення, що викликає максимальну силову відповідь м'язу.

Результати наших досліджень показали, що за ішемії тривалістю 1 година *m. soleus* алкоголізованих щурів розвиває меншу максимальну силу скорочення вже на початку експерименту, яка становить $81,91 \pm 3,83$ % від контрольного значення ($p \leq 0,05$). Падіння максимальної сили проявляється з кожним наступним скороченням і на закінченні експерименту знаходиться в межах $26,39 \pm 1,34$ % від контролю ($p \leq 0,05$) (рис. 2а). Зниження силової продуктивності ішемізованого м'яза алкоголізованих щурів, є наслідком виснаження клітинних енергетичних субстанцій, особливо розпаду АТФ (Morin et al., 2001), що призводить до різкого порушення гомеостазу і втрати іонного градієнта через клітинні мембрани (Macintosh et al., 2012).

Зі збільшенням тривалості ішемії до 2 годин максимальна сила скорочення падає ще помітніше. Зокрема, початкове значення F (% max) у цій групі становить $62,99 \pm 2,76$, а кінцеве – $20,34 \pm 3,18$ % ($p \leq 0,05$) (рис. 2а). Одним з основних факторів зменшення максимальної силової відповіді при збільшенні часу ішемії може бути збільшення жорсткості м'яза за рахунок збільшення у ньому кількості колагенових волокон (Ноздренко та ін., 2012).

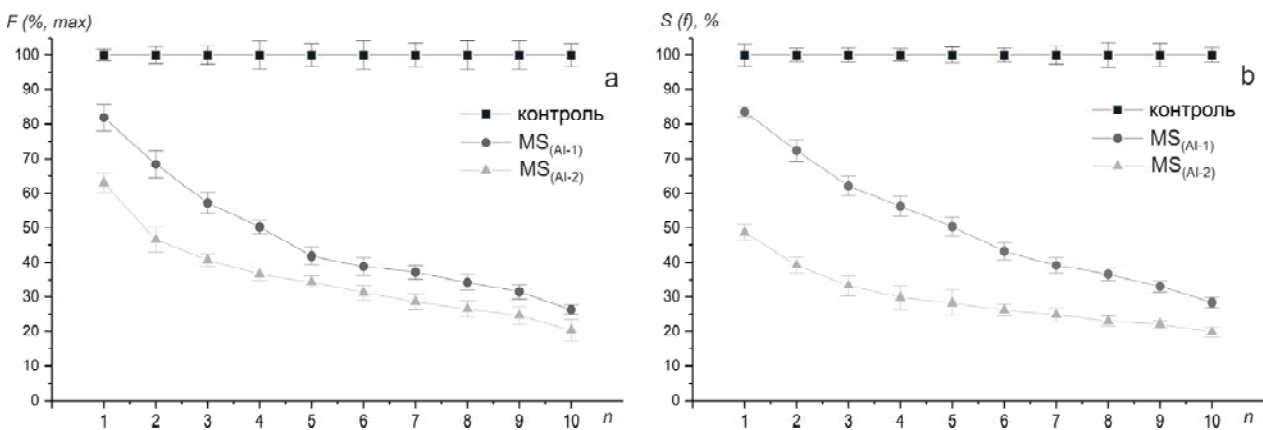


Рис. 2. Зміна максимальної сили скорочення – F (% max) – а, зміна інтегрованої потужності – S (f) – б, при скороченні *m. soleus* у алкоголізованих щурів з експериментально-індукованою ішемією тривалістю 1 – $MS_{(AI-1)}$ та 2 години – $MS_{(AI-2)}$, на модульовану електростимуляцію частотою 30 Гц (в відсотках від контрольних значень, прийнятих за 100%). n – порядковий номер послідовних скорочень

Реєстрація такого важливого біомеханічного показника, як інтегрована потужність (яка вираховується по загальній площі, що описує силова крива), показала аналогічні зміни: поступове її зменшення зі збільшенням тривалості експерименту та тривалості ішемії. Даний показник у групі $MS_{(AI-1)}$ становить $83,53 \pm 1,43$ % від контрольного значення на початку та поступово знижується до $28,42 \pm 1,58$ % ($p \leq 0,05$) в кінці експериментального теста. За умови 2-годинної ішемії даний показник

різко відрізняється від такого ж у контрольній групі та становить лише $48,64 \pm 2,37$ % і лінійно знижується до $19,76 \pm 1,54$ % ($p \leq 0,01$) в кінці експерименту (рис. 2b).

Уповільнення динамічних реакцій (рис. 2) зі збільшенням часу ішемії, на нашу думку, може бути зумовлене порушенням цілісності мембран міоцитів, яке активно відбувається вже на перших етапах ішемічного пошкодження.

Таким чином, результати наших досліджень показали, що у алкоголізованих щурів з експериментально-індукованою ішемією тривалістю 1 та 2 години відбувається значне лінійне пригнічення скоротливої активності скелетних м'язів на різних фазах скоротливого процесу. Встановлено порушення скоротливої здатності скелетних м'язів в результаті нехолінергічних ефектів даної патології. Неспроможність м'яза підтримувати сталу величину сили при тетанічному скороченні свідчить не лише про вплив описаної патології на скоротливу активність, але й про відмінності у молекулярних механізмах генерації силової відповіді. Відмінності в роботі м'яза впродовж досліджуваних етапів скорочення можна пояснити різницею у процесах взаємодії філаментів на етапах тетанічного та дотетанічного скорочення і впливом на ці процеси змін в сполучнотканинних оболонках м'язу при розвитку ішемічних каскадів.

З'ясування молекулярних механізмів скорочення скелетних м'язів за їх патологічного ушкодження значною мірою залежить від адекватної оцінки встановлених нами змін їх кінетичних характеристик. Принципова різниця описаних динамічних властивостей скорочення (рис. 1, 2) м'яза, а також істотна залежність динамічних характеристик від рівня патології суттєво ускладнює експериментальний аналіз цих процесів. Залежність між частотним кодуванням та реальними патернами еферентної активності навіть неушкоджених м'язових одиниць досі ще детально не вивчена. Дослідження даного питання на фоні загального порушення роботи м'язової системи внаслідок розвитку патологічного процесу є складною проблемою, оскільки генерація силової відповіді м'яза не є сталою величиною, а залежить від особливостей скорочення, зокрема швидкості розвитку сили, міри втомлюваності.

Суттєвим ускладненням при вирішенні даної проблеми є те, що виявлено порушення внутрішньоклітинного обміну кальцію у міоцитах за хронічної алкогольної інтоксикації. В експериментах на щурах показано, що утворені ацетальдегідом стабільні комплекси з білками локалізуються всередині або близько до сарколеми, оболонки м'язової клітини, що викликає підвищення ферментної активності Ca^{2+} -АТФ-ази саркоендоплазматичного ретикулуму, порушення функціонування Na^+ - K^+ -насосу і потенціал-залежних кальцієвих каналів, які призводять до зниження скорочувальної функції м'язового волокна або його деструкції (Nicolas et al., 2003).

Таким чином, розвиток алкогольної міопатії порушує усі ланки обміну речовин м'язової тканин. Дистрофічні зміни м'язових волокон переходять до їх руйнування. Середній діаметр м'язових волокон за дії етанолу складає 80% від їх діаметру (Bortolotto et al., 2004). Хронічна алкогольна міопатія є уповільненим синдромом з характерною м'язовою слабкістю і атрофією. Основну роль у її розвитку виконує етанол, його метаболіти, дефіцит мікроелементів та інших чинників. Значні незворотні зміни, що відбуваються у кістковій і м'язовій тканинах, є результатом дії алкогольної інтоксикації, яка призводить до порушення живлення тканин (Wang et al., 2011; Erkut et al., 2007; Bortolotto et al., 2004).

Наразі питання ішемії та симптомів, якими вона супроводжується, є недостатньо вивченими. Клінічні прояви ішемії несистематизовані і досить складні. Лише нещодавно були описані ступені важкості та стадійності гіпертензійного ішемічного синдрому та ішемічної контрактури, що виникає потім. Вивчено та описано тільки невелику кількість фізіологічних проявів, якими супроводжується ішемія. Відкритим залишається питання щодо функціонування уражених ішемією кінцівок. Отримані дані на експериментальних моделях відносно ініціалізації та прогресування ішемічного ураження при розвитку алкогольної міопатії спорадичні та часто описують окремі випадки чи окремі етапи загального патогенезу. Швидке виявлення ступеня ішемічної травми за даних умов має вирішальне значення для подальшої терапії, однак наразі відсутні точні діагностичні тести і методологія медикаментозного терапевтичного лікування цих патологій. Тому, пошук ефективних методів, які б

дозволили максимально зменшувати патологічні наслідки ішемічної травми скелетних м'язів, є вкрай необхідним запитом сучасної біомедицини у світі та в Україні.

Список літератури

- Абрамчук О.М., Ноздренко Д.М., Мотузюк О.П. Вплив етилового спирту на динаміку скорочення скелетних м'язів у ізотонічному режимі // Науковий вісник Волинського національного університету ім. Лесі Українки. – 2008. – №3. – С. 33–37. /Abramchuk O.M., Nozdrenko D.M., Motuziuk O.P. Vplyv etylovogo spyrtu na dynamiku skorochennya skeletnykh m'yaziv u izotonichnomu rezhymi // Naukovyy visnyk Volyns'kogo natsional'nogo universytetu im. Lesi Ukrainky. – 2008. – No. 3. – S. 33–37./
- Ноздренко Д.М., Мотузюк О.П., Заводовський Д.О., Степанюк Я.В. Ультроструктурні зміни міофібрил у людини при ішемічній контрактурі // Науковий вісник Волинського національного університету ім. Лесі Українки. Біологічні науки. – 2012. – №2. – С. 89–92. /Nozdrenko D.M., Motuziuk O.P., Zavadovs'kyi D.O., Stepanyuk Ya.V. Ul'trastrukturni zminy miofibril u lyudyny pry ishemichniy kontrakturi // Naukovyy visnyk Volyns'kogo natsional'nogo universytetu im. Lesi Ukrainky. Biologichni nauky. – 2012. – No. 2. – S. 89–92./
- Bortolotto S.K., Morrison W.A., Messina A. The role of mast cells and fibre type in ischaemia reperfusion injury of murine skeletal muscles // Journal of Inflammation. – 2004. – Vol.1 (2). (electronic resource)
- Carvalho A.J., McKee N.H., Green H.J. Metabolic and contractile responses of fast and slow twitch rat skeletal muscles to ischemia and reperfusion // Plast. Reconstr. Surg. – 1997. – Vol.99, no. 1. – P. 163–171.
- Erkut B., Özyazıcıoğlu A., Karapolat B.S. et al. Effects of ascorbic acid, alpha-tocopherol and allopurinol on ischemia-reperfusion injury in rabbit skeletal muscles: an experimental study // Drug Target Insights. – 2007. – Vol.2. – P. 249–258.
- Estruch R., Nicolas J.M., Villegas E. et al. Relationship between ethanol-related diseases and nutritional status in chronically alcoholic men // Alcohol & Alcoholism. – 1993. – Vol.28. – P. 543–550.
- Fernandez-Sola J., Garcia G., Elena M. et al. Musculus antioxidant status in chronic alcoholism // Alcohol. Clin. Exp. Res. – 2002. – Vol.26. – P. 1858–1862.
- Fernandez-Sola J., Preedy V.R., Lang C.H. et al. Molecular and cellular events in alcohol-induced musculus disease // Alcohol. Clin. Exp. Res. – 2007. – Vol.31, no. 12. – P. 1953–1962.
- Hofer T., Badouard C., Bajak E. et al. Hydrogen peroxide causes greater oxidation in cellular RNA than in DNA // Biol. Chem. – 2005. – Vol.386. – P. 333–337.
- Khoma O.M., Zavadovs'kyi D.A., Nozdrenko D.M. et al. Dynamics of ischemic skeletal soleus musculus contraction in rats // Fiziol. Zh. – 2014. – Vol.60, no. 1. – P. 34–40.
- Macintosh B.R., Holash R.J., Renaud J.M. Skeletal musculus fatigue – regulation of excitation-contraction coupling to avoid metabolic catastrophe // J. Cell Sci. – 2012. – Vol.125, no. 9. – P. 2105–2114.
- Morin D., Hauet T., Spedding M., Tillement J. Mitochondria as target for antiischemic drugs // Adv. Drug. Deliv. Rev. – 2001. – Vol.49, no. 1. – P. 151–174.
- Murdock M., Murdoch M.M. Compartment syndrome: a review of the literature // Clin. Podiatr. Med. Surg. – 2012. – Vol.29, no. 2. – P. 301–310.
- Nicolas J.M., Garcia G., Fatjo F. Influence of nutritional status on alcoholic myopathy // Am. J. Clin. Nutrition. – 2003. – Vol.78, no. 2. – P. 326–333.
- Ohlendieck K., Harmon S., Koll M. Ca²⁺ regulatory musculus proteins in the alcohol fed rat // Metabolism. – 2003. – Vol.52, no. 9. – P. 1102–1112.
- Turóczi Z., Arányi P., Lukáts A. et al. Musculus fiber viability, a novel method for the fast detection of ischemic musculus injury in rats // PLoS One. – 2014. – Vol.9 (1). (electronic resource)
- Wang W.Z., Baynosa R.C., Zamboni W.A. Therapeutic interventions against reperfusion injury in skeletal musculus // J. Surg. Res. – 2011. – Vol.171 (1). – P. 175–182.

Представлено: О.І.Костюков / Presented by: O.I.Kostyukov

Рецензент: Є.Е.Перський / Reviewer: Ye.E.Persky

Подано до редакції / Received: 10.10.2017

УДК: 612.741+612.816

Гендерні особливості функціонального стану нервово-м'язового апарату у осіб з високим рівнем адаптації до фізичного навантаження О.В.Колосова

Національний університет фізичного виховання та спорту України (Київ, Україна)
olena_kolos@ukr.net

У тестах у групі здорових людей (22 особи, вік 20–30 років), тренуваних до фізичного навантаження, досліджували особливості функціонування нервово-м'язового апарату в різних гендерних групах. Використовували електронейромиографічну (ЕНМГ) методику Н-рефлексометрії камбалоподібного м'яза (*m. soleus*). Тестовані були поділені на 2 групи за гендерною ознакою (чоловіки та жінки, в кожній групі по 11 осіб). Виявлено, що ЕНМГ-показники мали достовірні відмінності у чоловіків та жінок. Так, порогові значення Н- та М-відповідей у жінок були вищі в порівнянні з чоловіками, що може бути пов'язане з більшою товщиною підшкірної жирової клітківки в жіночому організмі. Крім цього, амплітуди максимальних Н- та М-відповідей у жінок були нижче, ніж у чоловіків, що може бути наслідком меншої м'язової маси у жінок та меншого об'єму м'язових волокон у м'язах жінок, ніж чоловіків. У той же час показники співвідношення максимальних Н- та М-відповідей, які є мірою сегментарної рефлексорної збудливості альфа-мотонейронів, не мали достовірних відмінностей у двох групах. Отримані результати відображають гендерні особливості функціонального стану нервово-м'язового апарату, які є генетично обумовленими, а також пов'язані з адаптаційними реакціями нервової та м'язової систем до фізичного навантаження.

Ключові слова: *нервово-м'язовий апарат, Н-рефлекс, камбалоподібний м'яз, адаптація до фізичного навантаження, гендерні особливості.*

The gender particularities of neuromuscular system state in humans with high level of adaptation to physical exercise O.V.Kolosova

Twenty two physically trained people, 20-30 years of age, took part in this EMG-study. To assess the functional state of humans neuromuscular system the method of H-reflex of soleus muscle was used. Registration of EMG-signals and tibial nerve stimulation were performed using neurodiagnostic complex (Nicolet Viking Select, USA-Germany). All tested people were divided in two groups – 11 males and 11 females. It was found that EMG-parameters had significant differences in men and women. H- and M-responses thresholds were higher in women than in men. This might be due to thicker subcutaneous fat tissue in female body. The amplitudes of the maximal H- and M-responses were smaller in women than in men. This might be the evidence of less muscle weight and muscle fiber volume in women in comparison with men. But the indices of segmental reflex motoneuron excitability (ratios of maximal H-and M-responses amplitudes) were equal in men and women. Such results reflects gender particularities of the functional state of human neuromuscular system, which are determined genetically and are also associated with adaptive neuromuscular system reactions to physical activity.

Key words: *neuromuscular system, H-reflex, soleus muscle, adaptation to physical activity, gender particularities.*

Гендерные особенности функционального состояния нервно-мышечного аппарата у людей с высоким уровнем адаптации к физической нагрузке Е.В.Колосова

В тестах в группе здоровых людей (возраст 20–30 лет), тренированных к физической нагрузке, исследовали особенности функционирования нервно-мышечного аппарата в разных гендерных группах. Использовали электронейромиографическую (ЭНМГ) методику Н-рефлексометрии камбаловидной мышцы (*m. soleus*). Испытуемые были разделены на 2 группы по гендерному признаку (мужчины и женщины, в каждой группе по 11 человек). Установлено, что ЭНМГ-показатели имели достоверные отличия у мужчин и женщин. Так, пороговые значения Н- и М-ответов у женщин были выше по сравнению с мужчинами, что может быть связано с большей толщиной подкожной жировой

клетчатки в женском организме. Кроме этого, амплитуды максимальных Н- и М-ответов у женщин были ниже, чем у мужчин, что может быть следствием меньшей мышечной массы у женщин и меньшего объема мышечных волокон в мышцах женщин, чем мужчин. В то же время показатели соотношения максимальных Н- и М-ответов, являющиеся мерой сегментарной рефлекторной возбудимости альфа-мотонейронов, не имели достоверных отличий в двух группах. Полученные результаты отображают гендерные особенности функционального состояния нервно-мышечного аппарата, обусловленные генетически, а также связанные с адаптационными реакциями нервной и мышечной систем к физической нагрузке.

Ключевые слова: *нервно-мышечный аппарат, Н-рефлекс, камбаловидная мышца, адаптация к физической нагрузке, гендерные особенности.*

Вступ

Пластичність нервової та м'язової систем організму людини полягає в різноманітних змінах структурно-функціональної та метаболічної організації під впливом різних факторів і бере участь у виникненні та закріпленні біологічно корисних змін (Костюк, 1974; Иоффе, 2005). Відомо, наприклад, що під впливом довгострокового фізичного навантаження в організмі людини відбуваються морфофункціональні зміни, що відображають розширення його функціональних можливостей, збільшення працездатності (Уилмор, Костилл, 2001). Функціональний стан нейромоторної системи можна оцінити за рівнем рефлекторної збудливості альфа-мотонейронів, який визначає реалізацію найпростіших рухових рефлексів, які в свою чергу впливають на прояв довільної м'язової діяльності (Поварещенкова, Петров, 2009).

У нашій роботі стан сегментарного рухового апарату оцінювали за параметрами Н-рефлексу камбалоподібного м'яза. Як відомо, Н-рефлекс є моносинаптичною рефлекторною відповіддю, що відводиться від м'яза в умовах електричної стимуляції її низькопорогових аферентів, що йдуть у складі м'язового або змішаного нерва. Цей рефлекс обумовлений активацією аферентних волокон Іа, які починаються від м'язових веретен цього м'яза і закінчуються безпосередньо на її мотонейронах (Бадалян, Скворцов, 1986). За допомогою методу Н-рефлексометрії можна оцінити індивідуальну організацію гальмівних та збуджуючих процесів внутрішньосегментарних систем та характер низхідних впливів з вищих відділів ЦНС на мотонейронний пул на сегментарному рівні (Команцев, 2006).

У літературі повідомлялося про зміни параметрів Н- та М- (прямих м'язових) відповідей камбалоподібного м'яза у осіб, що мають компресію спинномозкових нервів (Андриянова, Городничев, 2006). Іншими авторами було показана різниця показників Н-рефлексометрії камбалоподібного м'яза у легкоатлетів різної спеціалізації (спринтерів та стайерів) (Цветков, 1998). Значення порогу та амплітуди максимальних рефлекторних рухових відповідей тестованих м'язів мали відмінності у спортсменів на різних етапах підготовки, тобто на етапі довгострокової адаптації до фізичного навантаження параметри функціонального стану нервово-м'язового апарату відповідають вимогам, які є необхідними для реалізації тренувальних навантажень у даному виді спорту (Михайлова, Поварещенкова, 2010). В наших попередніх роботах також було виявлено відмінності у параметрах Н-рефлексометрії у спортсменів, що займаються різними видами спорту (Колосова, Халявка, 2016). Проте при цьому не було досліджено гендерних відмінностей параметрів Н-рефлексометрії. Не було також проведено дослідження змін показників Н-рефлексометрії при реорганізації нервово-м'язової системи людини під впливом адаптації до фізичного навантаження окремо у чоловіків та жінок. Тим часом, зміни функціонального стану нервово-м'язового апарату у спортсменів можуть слугувати моделлю для дослідження механізмів пластичності нервової та м'язової систем.

Таким чином, вважалося доцільним вивчення гендерних відмінностей електронейроміографічних показників, а також оцінка гендерних особливостей адаптації нервово-м'язового апарату людини до фізичних навантажень. Метою нашої роботи було детальне дослідження гендерних особливостей параметрів Н-рефлексометрії камбалоподібного м'яза у тренуваних осіб з високим рівнем адаптації до фізичного навантаження.

Методика

В дослідженнях брали участь 22 тестованих обох статей (11 чоловіків та 11 жінок), у віці від 20 до 30 років (середній вік $23,4 \pm 0,7$ років), без неврологічних захворювань в анамнезі та симптомів неврологічної патології на момент обстеження. Всі учасники були ознайомлені з процедурою тестів

і дали інформовану згоду. Обстежувані мали високий рівень тренуваності до фізичного навантаження (кваліфіковані спортсмени-біатлоністи).

Для оцінки функціонального стану нервово-м'язової системи використовували методику Н-рефлексометрії камбалоподібного м'язу литки (*m. soleus*) (Бадалян, Скворцов, 1986; Команцев, 2006). Під час дослідження тестована особа знаходилася в положенні лежачи на животі, ступні вільно звисали з кушетки. Н-рефлекс викликали біполярною черезшкірною стимуляцією великогомілкового нерву (*n. tibialis*) у підколінній ямці (поодиноким імпульсом тривалістю 1 мс). Для електроміографічного відведення Н- та М-відповідей від камбалоподібного м'язу використовували пару стандартних поверхневих електродів площею по 0,8 см², відстань між центрами яких була 20 мм. Реєстрацію ЕМГ-сигналів та стимуляцію *n. tibialis* проводили за допомогою нейродіагностичного комплексу Nicolet Viking Select (США-Німеччина). Для отримання середнього значення Н-рефлексу, що відповідає певному стану, усереднювали відповіді на 3-5 стимулів. Статистичний аналіз даних проводився за допомогою програми "Origin 7.0" (OriginLab, США).

Результати та обговорення

Аналізували наступні ЕНМГ-параметри: P_H і P_M (порогові значення сили стимулюючого току, необхідні для виникнення мінімальних Н- та М-відповідей), P_H/P_M (співвідношення порогових значень Н- та М-відповідей), H_{\max} і M_{\max} (значення амплітуд максимальних Н- та М-відповідей), H_{\max}/M_{\max} (співвідношення значень амплітуд максимальних Н- та М-відповідей в %). Отримували показники для правої (ПК) та лівої (ЛК) кінцівок. Усереднювали показники для кожної групи тестованих. Достовірність відмінностей параметрів в різних групах визначали за допомогою критерію Стьюдента для парних виборок.

Аналіз отриманих даних показав, що в цілому в групі обстежуваних осіб ЕНМГ-параметри знаходились в межах норми, що корелювало з суб'єктивними відчуттями – відсутністю болю та рухових обмежень (табл. 1). Для порівняльного аналізу спортсмени були розділені на дві групи: група 1 – чоловіки (11 осіб; середній вік 24,0±1,0 років), група 2 – жінки (11 осіб, середній вік 22,8±0,8 років) (табл. 2).

Таблиця 1.

Електронейроміографічні показники всієї групи тестованих (mean±se)

ЕНМГ-параметр	Норма	Бік тіла	Тестовані, 22 особи
P_H , мА	3–12	ПК	9,8±0,9
		ЛК	8,1±0,6
P_M , мА	5–20	ПК	14,6±1,4
		ЛК	12,2±1,1
P_H/P_M , умов. од.	<1	ПК	0,69±0,03
		ЛК	0,69±0,02
H_{\max} , мВ	3–12	ПК	6,4±0,6
		ЛК	6,8±0,6
M_{\max} , мВ	3–15	ПК	12,0±0,7
		ЛК	12,4±1,0
H_{\max}/M_{\max} , %	40–100	ПК	55,0±3,8
		ЛК	53,9±3,6

Виявлено, що електронейроміографічні показники мають достовірні відмінності у чоловіків та жінок. Так, у жінок спостерігалися достовірно ($p < 0,05$) вищі порогові значення Н- та М-відповідей, ніж у чоловіків, що може бути пов'язане з більшою товщиною підшкірної жирової клітковки у жінок, що призводить до збільшення електричного опору. За даними літератури відомо, що вміст жиру в організмі вище у жінок, ніж у чоловіків (Уилмор, Костилл, 2001). Таким чином, отримані результати в цілому узгоджуються з даними наших попередніх досліджень, в яких був виявлений взаємозв'язок порогових значень Н- та М-відповідей камбалоподібного м'язу з рівнем вмісту жиру в організмі спортсменів, що спеціалізуються у стрибках у воду та велоспорті (Колосова і др., 2017).

Таблиця 2.
Порівняння електронейромиографічних показників чоловіків та жінок (mean±se)

ЕНМГ-параметр	Норма	Бік тіла	Чоловіки	Жінки
П _н , мА	3–12	ПК	7,5±1,1	12,6±1,0*
		ЛК	6,6±1,1	9,4±0,5*
П _м , мА	5–20	ПК	11,4±1,9	18,7±2,0*
		ЛК	9,6±1,8	14,5±1,3*
П _н /П _м , умов.од.	<1	ПК	0,70±0,05	0,69±0,04
		ЛК	0,72±0,04	0,67±0,03
Н _{макс} , мВ	3–12	ПК	7,4±0,8	4,8±0,4*
		ЛК	7,7±0,9	6,2±0,9
М _{макс} , мВ	3–15	ПК	13,1±0,7	9,1±1,4*
		ЛК	13,8±1,5	10,7±1,5
Н _{макс} /М _{макс} , %	40–100	ПК	55,3±4,3	53,4±9,0
		ЛК	58,3±5,3	50,9±5,7

Примітка. * достовірність відмінностей між групами $p < 0,05$.

Окрім цього, у чоловічої групи були виявлені більші амплітуди максимальних Н- та М-відповідей в порівнянні з жінками, що може бути наслідком більшого об'єму м'язових волокон (в першу чергу за рахунок більшої площі їх поперечного перерізу, а також внаслідок їх більшої довжини) у м'язах чоловіків, ніж жінок. Саме більший об'єм м'язових волокон (і більша загальна м'язова маса, як наслідок) дозволяє чоловічому організму розвивати більшу силу, ніж жіночому. За даними досліджень, гістологічні та біохімічні якості у м'язів чоловіків та жінок не мають відмінностей (Schantz et al., 1983). Хоча абсолютні силові показники у чоловіків в середньому більше, ніж у жінок, при розрахуванні сили відносно одиниці площі поперечного перерізу м'яза різниці не спостерігається (Уилмор, Костилл, 2001). Відомо, що в процесі фізичних тренувань однакової спрямованості для жінок також є характерним менший ступінь гіпертрофії м'язів, ніж для чоловіків (Уилмор, Костилл, 2001). Більші амплітуди максимальних М-відповідей у чоловіків можуть свідчити також про більшу вираженість адаптаційних реакцій нервової системи, що призводять до залучення додаткових рухових одиниць, які діють синхронно та збільшують здатність м'яза розвивати силу. При цьому показник співвідношення максимальних Н- та М-відповідей, що відображає рівень сегментарної рефлексорної збудливості альфа-мотонейронів (Коц, 1975), не мав достовірних відмінностей у двох групах, що може свідчити про подібність спінальних регуляторних механізмів у чоловіків і жінок, оскільки камбалоподібний м'яз, який в основному складається з повільних моторних одиниць, здебільшого контролюється на рівні спинного мозку (Коц, 1975).

Таким чином, можна зробити висновок, що існують певні гендерні особливості функціонування нервово-м'язового апарату людини, які, з одного боку, є генетично та гормонально обумовленими, а з іншого, пов'язані з різним проявом адаптаційних реакцій нервової та м'язової систем до фізичного навантаження. Гендерні відмінності можна оцінити за допомогою методу Н-рефлексометрії, аналізуючи порогові та амплітудні значення Н- та М-відповідей.

Список посилань

Андриянова Е.Ю., Городничев Р.М. Электронейромиографические показатели и механизмы развития пояснично-крестцового остеохондроза. – Великие Луки, 2006. – 119с. /Andriyanova E.Yu. Elektroneyromiograficheskiye pokazateli i mekhanizmy razvitiya poyasnichno-kresttsovogo osteokhondroza. – Velikie Luki, 2006. – 119s./

Бадалян Л.О., Скворцов И.А. Клиническая электромиография. – М: Медицина, 1986. – 368с. /Badalyan L.O., Skvortsov I.A. Klinicheskaya elektromiografiya. – M: Meditsina, 1986. – 368s./

Июффе М.Е. Пластичность двигательных структур мозга и двигательное обучение // Физиология мышц и мышечной деятельности. Материалы III Всероссийской школы-конференции. – М., ФФМ МГУ. – 2005. – С.48. /Ioffe M.E. Plastichnost' dvigatel'nykh struktur mozga i dvigatel'noye obucheniye // Fiziologiya myshts i myshechnoy deyatel'nosti. Materialy III Vserossiyskoy shkoly-konferentsii. – M., FFM MGU. – 2005. – S.48./

- Колосова Е.В., Халывка Т.А. Сравнение параметров Н-рефлексометрии у спортсменов, специализирующихся в гребле и велоспорте // *Материалы XIV Межд. конф. «Научное обоснование физического воспитания, спортивной тренировки и подготовки кадров по физической культуре, спорту и туризму».* – Беларусь (Минск). – Т.3. – 2016. – С. 84–86. /Kolosova Ye.V., Khalyavka T.A. Sravneniye parametrov N-refleksometrii u sportstmenov, spetsializiruyushhikhsya v greble i velosporte // *Materialy XIV Mezhd. konf. «Nauchnoye obosnovaniye fizicheskogo vospitaniya, sportivnoy trenirovki i podgotovki kadrov po fizicheskoy kul'ture, sportu i turizmu».* – Belarus' (Minsk). – T.3. – 2016. – S. 84–86./
- Колосова Е.В., Халывка Т.А., Горенко З.А. Сравнение электронейромиографических показателей у спортсменов, специализирующихся в прыжках в воду и велоспорте // *Фізична культура, спорт та здоров'я нації: збірник наукових праць.* – Вип.3 (22). – Вінниця, 2017. – С. 319–323. /Kolosova Ye.V., Khalyavka T.A., Gorenko Z.A. Sravneniye elektroneyromiograficheskikh pokazateley u sportstmenov, spetsializiruyushhikhsya v pryzhkakh v vodu i velosporte // *Fizychna kul'tura, sport ta zdorov'ya natsii: zbirnyk naukovykh prats'.* – Vyp.3 (22). – Vinnytsya., 2017. – S. 319–323./
- Команцев В.Н. Методические основы клинической электронейромиографии. Руководство для врачей. – Санкт-Петербург, 2006. – 349с. /Komantsev V.N. Metodicheskiye osnovy klinicheskoy elektroneyromiografii. Rukovodstvo dlya vrachey. – Sankt-Peterburg, 2006. – 349s./
- Коц Я.М. Физиология нервно-мышечного аппарата // *Физиология человека.* – М: Физкультура и спорт, 1975. – С. 67–108. /Kots Ya.M. Fiziologiya nervno-myshechnogo apparata // *Fiziologiya cheloveka.* – M: Fizkul'tura i sport, 1975. – S. 67–108./
- Костюк П.Г. Некоторые общие вопросы нейронной интеграции // *Механизмы объединения нейронов в нервном центре.* – Л.: Наука, 1974. – С. 6–12. /Kostyuk P.G. Nekotoryye obshhiye voprosy neyronnoy integratsii // *Mekhanizmy ob'edineniya neyronov v nervnom tsentre.* – L.: Nauka, 1974. – S. 6–12./
- Михайлова Е.А., Поварещенкова Ю.А. Изменение параметров нейромышечного статуса спортсменов в течение соревновательного сезона // *Педагогико-психологические и медико-биологические проблемы физической культуры и спорта.* – 2010. – №2 (15). – С. 1–7. /Mikhaylova Ye.A., Povareshhenkova Yu.A. Izmeneniye parametrov neyromyshechnogo statusa sportstmenov v techeniye sorevnovatel'nogo sezona // *Pedagogiko-psikhologicheskkiye i mediko-biologicheskkiye problemy fizicheskoy kul'tury i sporta.* – 2010. – No. 2 (15). – S. 1–7./
- Поварещенкова Ю.А., Петров Д.А. Изучение возбудимости эфферентов мышц нижних конечностей у спортсменов // *Проблемы развития физической культуры и спорта в странах Балтийского региона: Сборник статей Всероссийской с межд. участием научно-практ. конф.* – Великие Луки: ВЛГАФК, 2009. – С. 493–496. /Povareshhenkova, Yu.A., Petrov D.A. Izucheniye vozbudimosti efferentov myshts nizhnikh konechnostey u sportstmenov // *Problemy razvitiya fizicheskoy kul'tury i sporta v stranakh Baltiyskogo regiona: Sbornik statey Vserossiyskoy s mezhd. uchastiyem nauchno-prakt. konf.* – Velikiye Luki: VLGAFK, 2009. – S. 493–496./
- Уилмор Д.Х., Костилл Д.Л. Физиология спорта: учебник: Пер. с англ. – К.: Олимпийская литература, 2001. – 503с. /Wilmor D.Kh., Kostill D.L. Fiziologiya sporta: uchebnik: Per. s angl. – K.: Olimpiyskaya literatura, 2001. – 503s./
- Цветков М.С. Н-рефлекс и М-ответ в связи с особенностями свойств мышц и их резервных возможностей у бегунов на короткие и длинные дистанции // *Вестн. Новгород. гос. ун-та. Сер. Мед. науки.* – 1998. – №7. – С. 19–21. /Tsvetkov M.S. N-refleks i M-otvet v svyazi s osobennostyami svoystv myshts i ikh rezervnykh vozmozhnostey u begunov na korotkiye i dlinnyye distantsii // *Vestn. Novgorod. gos. un-ta. Ser. Med. nauki.* – 1998. – No. 7. – S. 19–21./
- Schantz P., Randall-Fox E., Hutchison W. et al. Muscle fibre type distribution, muscle cross-sectional area and maximal voluntary strength in humans // *Acta Physiologica Scandinavica.* – 1983. – Vol.117. – P. 219–226.

Представлено: Т.В.Куценко / Presented by: T.V.Kutsenko
Рецензент: В.В.Мартиненко / Reviewer: V.V.Martylenko
Подано до редакції / Received: 01.11.2017

УДК: 796.015.132

**Факторна структура функціональних можливостей спортсменок
17–22 років впродовж оваріально-менструального циклу**
Н.А.Орлик, А.І.Босенко

*ДЗ «Південноукраїнський національний педагогічний університет імені К.Д.Ушинського» (Одеса,
Україна)*
OrlikN@ukr.net, bosenco@ukr.net

Вивчено факторну структуру функціональних можливостей спортсменок 17–22 років протягом оваріально-менструального циклу. Отримано модель взаємозв'язків компонентів фізичного розвитку, енергетичного рівня і загальної працездатності організму, функціонального стану мозку, серцево-судинної і дихальної систем, що пояснює природу причинно-наслідкових зв'язків наведених факторів, взаємну кореляцію вихідних ознак і основну частину їх дисперсій. Так, в менструальну, постовуляторну і передменструальну фази до складу генерального уніполярного фактора увійшли показники фізичної працездатності і енергетичного рівня організму з масовою часткою від загальної дисперсії вибірки 13,8, 13,9 і 13,7% відповідно. Такий високий кореляційний зв'язок показників підтверджує важливість функціонального стану як аеробних, так і анаеробних систем для досягнення високих результатів при виконанні фізичних навантажень. У овуляторну фазу оваріально-менструального циклу в генеральному факторі до показників фізичної працездатності і енергетичного рівня організму приєдналися антропометричні і ваго-зростові показники з часткою впливу 15,8% від загальної дисперсії вибірки. Найбільш вагомий внесок в факторну структуру роблять показники фізичної працездатності і енергетичного рівня організму, потім показники варіаційної пульсометрії та фізичного розвитку, менш впливовими є показники серцево-судинної і центральної нервової системи.

Ключові слова: *функціональні можливості, факторна структура, оваріально-менструальний цикл, спортсменки.*

**Factor structure of functional abilities of sportswomen aged 17–22 during
the ovarian-menstrual cycle**
N.A.Orlyk, A.I.Bosenko

The factor structure of functional abilities of sportswomen of 17–22 years during the ovarian-menstrual cycle has been studied. A model of correlation of the components of physical development, energetic level and general efficiency of organism, functional state of brain, cardio-vascular and respiratory systems has been worked out, which explains the nature of cause-effect relationships of the factors mentioned, mutual correlation of initial indicators and major part of their dispersion. That is, in menstrual, post-ovarian and pre-menstrual phases, the general unipolar factor included the indicators of physical efficiency and energetic level of organism with a contribution to the sample total dispersion of 13.8, 13.9 and 13.7% respectively. Such close correlation of indicators proves the important role of functional state of both aerobic and anaerobic systems in achieving high results while physical loading performing. In ovarian phase of ovarian-menstrual cycle, in the general factor to the indicators of physical efficiency and energetic level of organism added anthropo-physiometric and weight-growth indicators with a contribution to the sample total dispersion of 15.8%. The most contribution into the factor structure is done by the indicators of physical effectiveness and energetic level of organism, the second place occupy the indicators of variational pulsometry and physical development, the indicators of cardio-vascular and nervous system have the least influence.

Key words: *functional abilities, factor structure, ovarian-menstrual cycle, sportswomen.*

**Факторная структура функциональных возможностей спортсменок
17–22 лет на протяжении оваріально-менструального цикла**
Н.А.Орлик, А.И.Босенко

Изучена факторная структура функциональных возможностей спортсменок 17–22 лет в течение оваріально-менструального цикла. Получена модель взаимосвязей компонентов физического развития, энергетического уровня и общей работоспособности организма, функционального состояния мозга, сердечно-сосудистой и дыхательной систем, объясняющая природу причинно-следственных связей приведенных факторов, взаимную корреляцию исходных признаков и основную часть их

дисперсий. Так, в менструальную, постовуляторную и предменструальную фазы в состав генерального униполярного фактора вошли показатели физической работоспособности и энергетического уровня организма с массовой долей от общей дисперсии выборки 13,8, 13,9 и 13,7% соответственно. Такая высокая корреляционная связь показателей подтверждает важность функционального состояния как аэробных, так и анаэробных систем для достижения высоких результатов при выполнении физических нагрузок. В овуляторную фазу овариально-менструального цикла в генеральном факторе к показателям физической работоспособности и энергетического уровня организма присоединились антропо-физиометрические и весо-ростовые показатели с долей влияния 15,8% от общей дисперсии выборки. Наиболее весомый вклад в факторную структуру имеют показатели физической работоспособности и энергетического уровня организма, затем показатели вариационной пульсометрии и физического развития, менее влиятельными являются показатели сердечно-сосудистой и центральной нервной системы.

Ключевые слова: функциональные возможности, факторная структура, овариально-менструальный цикл, спортсменки.

Вступ

Досягнення високих спортивних результатів, у першу чергу, залежить від функціональних можливостей спортсменок. Особливості функціонального стану, працездатності і реакції на численні подразники знаходяться у залежності від специфічних ритмічних змін гормонального статусу організму жінки. Підвищення рівня функціональних можливостей базується на адаптивних змінах у низці фізіологічних систем організму, зростанні продуктивності аеробного і анаеробного енергозабезпечення. У практиці сучасного спорту, для контролю рівня функціонального стану використовують аналіз показників зовнішнього дихання, гемодинаміки, варіаційної пульсометрії, сенсомоторних реакцій, стану систем енергозабезпечення тощо (Босенко, 1986; Вовканич, Дунець-Лесько, 2012; Давиденко, 2011; Міхалюк, 2007; Самокиш, 2010; Shakhlina, 2000).

У сучасній науковій літературі наявна лише невелика кількість публікацій щодо показників функціонального стану систем організму спортсменок протягом менструального циклу. Нами було виконане дослідження взаємозв'язків між показниками функціонального стану ряду фізіологічних систем.

Метою дослідження було вивчення факторної структури функціональних можливостей спортсменок 17–22 років протягом овариально-менструального циклу.

Матеріали і методи дослідження

Було обстежено 30 студенток 17–22 років факультету фізичної культури педагогічного ВНЗ. Дослідження проводились в індивідуально визначені календарним методом фази менструального циклу: менструальна, постменструальна, овуляторна, постовуляторна і передменструальна фази, виокремлені згідно з класифікацією лабораторії ендокринології Інституту геронтології АМН України (Шахлина, Футорний, 2003). Дівчата належали до основної медичної групи, не приймали гормональні препарати та мали регулярний менструальний цикл. Тестування проводилось у стандартних умовах. Статистичний аналіз отриманих результатів проводили з використанням стандартних методів статистики (SPSS v. 16.0).

Факторний аналіз проводився методом головних компонентів з варімаксним обертанням факторної матриці. До факторного аналізу функціональних можливостей спортсменок 17–22 років увійшли 94 змінних, що характеризували антропо-фізіометричні параметри, дані оцінки загального функціонального стану мозку, варіаційної пульсометрії та оцінки функціональних можливостей організму при використанні навантаження за замкнутим циклом (з реверсом) (Босенко, 1986; Давиденко, 2011).

Дослідження виконано відповідно до плану науково-дослідної роботи кафедри біології і основ здоров'я ДЗ «Південноукраїнський національний педагогічний університет імені К.Д.Ушинського» (м. Одеса) «Системна адаптація до фізичних і розумових навантажень на окремих етапах онтогенезу людини» (номер державної реєстрації 0109U000206), «Адаптація дітей і молоді до навчальних та фізичних навантажень (юнаки 17–21 років)» (номер державної реєстрації 011U007158).

Результати та обговорення

В результаті дослідження було отримано модель взаємозв'язків компонентів фізичного розвитку, енергетичного рівня та загальної працездатності організму, функціонального стану мозку, серцево-судинної і дихальної систем, які пояснюють природу причинно-наслідкових зв'язків наведених факторів, взаємну кореляцію вихідних ознак і основну частину їх дисперсій (Босенко, 1986; Лясота, 2012; Самокиш, 2010).

У ході дослідження 94 розглянутих показників у кожен фазу менструального циклу (МЦ) були виокремлені провідні фактори: у менструальну фазу – 12 факторів, постменструальну – 10 факторів, овуляторну – 9 факторів, постовуляторну – 11 факторів, передменструальну – 12 факторів, які пояснюють 82,9, 75,9, 76,1, 80,5 і 83,5 відсотків загальної дисперсії відповідно (табл. 1–5).

Згідно з результатами дослідження у дівчат в менструальну фазу МЦ у генеральному факторі, який є найбільш суттєвим, насамперед виділяються показники, що характеризують фізичну працездатність та енергетичний рівень організму (табл. 1).

Таблиця 1.

Факторна структура функціонального стану спортсменок 17–22 років у менструальну фазу ОМЦ

Фактор	Показники	Внесок у загальну дисперсію, %
I	Показники фізичної працездатності (Тзаг, Азаг, PWC170, МСК, пульсова вартість виконаної велоергометричної роботи) та енергетичного рівня організму (Wрев, Wмакс, A1,dWp)	13,8
II	Показники варіаційної пульсометрії в кінці велоергометричного навантаження (АМо, dX, ІН, ІВР, ВПР, АГКР, ПАПР)	9,5
III	Показники варіаційної пульсометрії в момент реверсу (АМо, dX, ІН, ІВР, ВПР, АГКР, ПАПР)	7,5
IV	Витрати потужності організму на навантаження і показники ефективності регуляції серцевої діяльності (швидкість перерозподілу навантаження при зменшенні навантаження, коефіцієнти інерції, ефективності, швидкості перерозподілу потужності серцевих скорочень та час інерції)	7,0
V	Показники варіаційної пульсометрії у стані відносного спокою (dX, ІН, ІВР, ВПР, АГКР)	6,9
VI	ОГК у трьох вимірах, індекс гармонійності тілобудови, МСК та PWC170	6,3
VII	Показники загального функціонального стану мозку до та після навантаження (СР, ФРС, РФМ)	6,1
VIII	Динамометрія правої і лівої руки та відповідні силові індекси	5,8
IX	ЧСС виходу з навантаження, швидкість перерозподілу потужності в період зменшення навантаження, індекс стомлення	5,5
X	Показники варіаційної пульсометрії на 5-й хвилині відновлення (ІН, ІВР, АГКР)	5,4
XI	Показники функціонування серцево-судинної системи (ЧСС спокою, індекси Баєвського і Робінсона)	5,1
XII	Тип саморегуляції кровообігу, індекс Кердо	4
Загальний відсоток впливу факторів		82,9

В уніполярному факторі I з часткою у загальній дисперсії вибірки 13,8% об'єдналися показники фізичної працездатності спортсменок ($r=0,92-0,95$ при $p<0,05$) та енергетичного рівня організму ($r=0,86-0,91$ при $p<0,05$) з однаковим знаком на полюсі, що свідчить про зростання значення енергетичного рівня організму у збільшенні фізичної працездатності. Навантаження фактора II з масовою часткою 9,5% від загальної дисперсії вибірки формується з показників

варіаційної пульсометрії, визначених по закінченню виконання велоергометричного тестування ($r=0,88-0,94$, $p<0,05$), та має значущий від'ємний зв'язок з dX ($r=-0,7$, $p<0,05$), а фактора III (7,5%) – в момент реверсу ($r=0,7-0,96$, $p<0,05$) та має від'ємний зв'язок з dX ($r=-0,91$, $p<0,05$), що свідчить про збільшення адаптованості ССС до навантаження при зменшенні різниці між максимальним і мінімальним значеннями кардіоінтервалів. Показники ефективності регуляції серцевої діяльності ($r=0,75-0,94$, $p<0,05$) та показник витрат потужності організму на навантаження ($r=0,85$, $p<0,05$) об'єдналися в уніполярному факторі IV з часткою у загальній дисперсії 7,0%, що вказує на підвищення витрат потужності організму на навантаження при збільшенні часу інерції і більш високій швидкості перерозподілу потужності серцевих скорочень.

У факторі V з часткою 6,9% від загальної дисперсії виокремилися показники варіаційної пульсометрії, визначені у стані відносного спокою ($r=0,77-0,87$, $p<0,05$). Фактор VI з вагою 6,3% вміщує такі фізіологічні показники, як окіл грудної клітки, виміряної у стані відносного спокою, при вдиху і видиху, а також індекс гармонійності тілобудови ($r=0,75-0,76$, $p<0,05$), що вказує на зростання показника гармонійності тілобудови при збільшенні показників околу грудної клітки. До складу уніполярного фактора VII увійшли показники загального функціонального стану мозку до та після навантаження з масовою часткою 6,1% ($r=0,77-0,92$, $p<0,05$). Фактор VIII з часткою 5,8% від загальної дисперсії вибірки характеризувався показниками динамометрії станової і правої руки та відповідними силовими індексами ($r=0,84-0,88$, $p<0,05$). Фактор IX (5,5%) визначається частотою серцевих скорочень виходу з навантаження, індексом стомлення та показником швидкості перерозподілу потужності серцевих скорочень в період зменшення навантаження ($r=0,7-0,87$, $p<0,05$). Фактор X (5,4%) обумовлюється показниками варіаційної пульсометрії, визначеними на 5 хвилині відновлення ($r=0,7-0,8$, $p<0,05$). Системоутворюючими у факторі XI, який пояснює 5,1% загальної дисперсії, є показники функціонування системи кровообігу ($r=0,74-0,93$, $p<0,05$). Даний фактор є уніполярним і показує, що при більш високій ЧСС у стані спокою збільшуються індекси Баєвського і Робінсона, а отже зменшується економічність функціонування ССС, знижується адаптаційний потенціал системи кровообігу. Структура фактора XII, який пояснює 4% загальної дисперсії, показує його біполярність. На одному його полюсі – тип саморегуляції кровообігу ($r=-0,92$, $p<0,05$), а на іншому – вегетативний індекс Кердо ($r=0,92$, $p<0,05$), що свідчить про переважання симпатичних впливів при серцевому типі кровообігу і парасимпатичних при судинному типі кровообігу. На підставі встановлених причинно-наслідкових зв'язків наведених факторів з функціональними можливостями дівчат 17–22 років у менструальну фазу слід відмітити, що найбільший внесок у факторну структуру роблять дані фізичної працездатності та енергетичного рівня організму, які характеризують здатність людини до виконання м'язового навантаження різної потужності.

При проведенні факторного аналізу виокремлених показників у постменструальну фазу менструального циклу було визначено 9 основних факторів із загальним відсотком впливу 75,9 (табл. 2).

У постменструальну фазу ОМЦ визначальним є фактор I, до якого увійшли показники варіаційної пульсометрії, обчислені в кінці навантаження та на 5-й хвилині відновлення ($r=0,77-0,9$, $p<0,05$), що відповідають 17,2% від загальної дисперсії. Другий фактор поєднує показники фізичної працездатності та енергетичного рівня організму ($r=0,75-0,96$, $p<0,05$), які становлять 11,4 відсотки від загальної дисперсії. До третього фактора (8,4%) увійшли показники варіаційної пульсометрії, визначені у стані спокою ($r=0,77-0,93$, $p<0,05$). Фактор IV – зростаюча вага (8,1%) антропометричних та ваго-зростових показників ($r=0,74-0,92$, $p<0,05$). Фактор V – збільшилась масова частка (6,1%) уніполярних взаємозв'язків між ЧСС спокою та показниками функціонування системи кровообігу ($r=0,73-0,89$, $p<0,05$). До фактора VI (6,1%) віднесено показники динамометрії правої руки і станової та відповідних силових індексів ($r=0,7-0,87$, $p<0,05$). Фактор VII (5,4%) склали показники варіаційної пульсометрії, визначені в момент реверсу ($r=0,83-0,96$, $p<0,05$), фактор VIII (4,9%) – показники ефективності регуляції серцевої діяльності ($r=0,85-0,8$, $p<0,05$). Фактор IX і X з масовою часткою 4,1% і 4% склали показники загального функціонального стану мозку після ($r=0,94-0,96$, $p<0,05$) та до навантаження ($r=0,86-0,9$, $p<0,05$) відповідно.

Отже, у постменструальну фазу ОМЦ на функціональні можливості спортсменок більший вплив мають показники варіаційної пульсометрії, визначені в кінці навантаження та на 5-й хвилині відновлення. У певні фактори виокремлюються показники загального функціонального стану мозку, що свідчить про підвищення впливу ЦНС на функціональні можливості спортсменок.

Факторний аналіз показників, визначених в овуляторну фазу МЦ, дозволив виокремити 9 факторів із загальним відсотком впливу 76,1 (табл. 3).

Таблиця 2.
Факторна структура функціонального стану спортсменок 17–22 років у постменструальну фазу ОМЦ

Фактор	Показники	Внесок у загальну дисперсію, %
I	Показники варіаційної пульсометрії в кінці велоергометричного навантаження та на 5-й хвилині відновлення (АМо, dX, ІН, ІВР, ВПР, АГКР, ПАПР)	17,2
II	Показники фізичної працездатності (Тзаг, Азаг, РWC170, МСК, РWC170/кг, МСК/кг, пульсова вартість виконаної велоергометричної роботи) та енергетичного рівня організму (Wрев, Wмакс, А1)	11,4
III	Показники варіаційної пульсометрії у стані відносного спокою (АМо, ІН, ІВР, ВПР, АГКР, ПАПР)	8,4
IV	Антропо-фізіометричні і ваго-зростові показники (маса тіла, ОГК у трьох вимірах, індекс Пінье, ІМТ ГТ)	8,1
V	Показники функціонування серцево-судинної системи (ЧСС спокою, індекс Баєвського та Робінсона, РФС)	6,1
VI	Динамометрії правої руки та станової, відповідні силові індекси	6,1
VII	Показники варіаційної пульсометрії в момент реверсу (dX, ІН, ІВР, ВПР, АГКР)	5,4
VIII	Показники ефективності регуляції серцевої діяльності (швидкість перерозподілу навантаження при зменшенні навантаження, коефіцієнти інерційності, швидкості перерозподілу потужності серцевих скорочень)	4,9
IX	Показники загального функціонального стану мозку після навантаження (СР, РФМ, ФРС)	4,1
X	Показники загального функціонального стану мозку до навантаження (СР, РФМ, ФРС)	4,0
Загальний відсоток впливу факторів		75,9

Таблиця 3.
Факторна структура функціонального стану спортсменок 17–22 років в овуляторну фазу ОМЦ

Фактор	Показники	Внесок у загальну дисперсію, %
I	Антропо-фізіометричні і ваго-зростові показники (маса тіла, ОГК у трьох вимірах, індекс Пінье, ІМТ ГТ), показники фізичної працездатності (Тзаг, Азаг, РWC170, МСК, пульсова вартість виконаної велоергометричної роботи) та енергетичного рівня організму (Wрев, Wмакс, А1, dWp)	15,8
II	Показники варіаційної пульсометрії у стані відносного спокою (dX, ІН, ІВР, ВПР, АГКР) та на 5-й хвилині відновлення (АМо, ІН, ІВР, ВПР, АГКР, ПАПР)	11,8
III	Показники варіаційної пульсометрії в кінці навантаження (АМо, dX, ІН, ІВР, ВПР, АГКР, ПАПР)	10,1
IV	Показники варіаційної пульсометрії в момент реверсу (АМо, dX, ІН, ІВР, ВПР, ПАПР)	6,7
V	ЧСС порог., ЧСС вих. і ЧСС серед.	8,2
VI	Витрати потужності організму на навантаження і показники ефективності регуляції серцевої діяльності (швидкість перерозподілу навантаження при зменшенні навантаження, коефіцієнти інерції, швидкості перерозподілу потужності серцевих скорочень та час інерції)	6,3
VII	Показники загального функціонального стану мозку до та після навантаження (СР, ФРС, РФМ)	6,3
VIII	Показники функціонування серцево-судинної системи (індекс Баєвського і Робінсона)	5,6
IX	Показники динамометрії правої, лівої руки і станової, відповідні силові індекси	5,3
Загальний відсоток впливу факторів		76,1

Навантаження генерального фактора I з масовою часткою 15,8% від загальної дисперсії вибірки формується з антропо-фізіометричних, ваго-зростових показників та показників фізичної працездатності і енергетичного рівня організму ($r=0,73-0,91$ при $p<0,05$). Про біполярність даного фактора свідчить сильна від'ємна кореляція з індексом Пінье ($r=-0,74$ при $p<0,05$), тобто при збільшенні показника міцності тілобудови, природно, зменшуються антропо-фізіометричні і ваго-зростові дані обстежених, енергетичний рівень їх організму і фізична працездатність. Менш вагомими в загальній дисперсії вибірки у дану фазу є показники варіаційної пульсометрії у стані відносного спокою ($r=0,7-0,8$, $p<0,05$) та на 5-й хвилині відновлення ($r=0,71-0,93$, $p<0,05$) – фактор II (11,8%), в кінці велоергометричного навантаження ($r=0,81-0,94$, $p<0,05$) – фактор III (10,1%) та в момент реверсу навантаження ($r=0,76-0,97$, $p<0,05$) – фактор IV (6,7%). В окремий фактор V з відсотком впливу 8,2 віднесено ЧСС порогову, виходу з навантаження та її середні значення ($r=0,75-0,83$, $p<0,05$). Збільшився вплив показників ефективності регуляції серцевої діяльності і витрат потужності організму на навантаження ($r=0,77-0,93$, $p<0,05$) – фактор VI (6,3%). Фактор VII – сильний уніполярний зв'язок визначено між показниками загального функціонального стану мозку з 6,3% впливу ($r=0,78-0,87$, $p<0,05$). Фактор VIII (5,6%) склали показники функціонування системи кровообігу ($r=0,7-0,8$, $p<0,05$). Зменшився, відносно попередньої фази ОМЦ, вплив показників динамометрії та її відповідних силових індексів ($r=0,7-0,86$, $p<0,05$) – фактор IX (5,3%).

Факторний аналіз, проведений на основі показників, отриманих в постувальторну фазу МЦ, виокремив 9 факторів із загальною часткою впливу 80,5% (табл. 4).

Таблиця 4.
Факторна структура функціонального стану спортсменок 17–22 років в постувальторну фазу ОМЦ

Фактор	Показники	Внесок у загальну дисперсію, %
I	Показники фізичної працездатності (Тзаг, Азаг, PWC170, МСК, PWC170/кг, МСК/кг, пульсова вартість виконаної велоергометричної роботи) та енергетичного рівня організму (Wрев, Wвих, Wмакс, A1, dWp)	13,9
II	Показники функціонування серцево-судинної системи (ЧСС поч., ЧСС порог., ЧСС вих., ЧСС серед., тип саморегуляції кровообігу, і. Кердо, Мо спок., Мо кін., I втомл.)	10,6
III	Показники варіаційної пульсометрії на 5-й хвилині відновлення (АМо, dX, ІН, ІВР, ВПР, АГКР, ПАПР)	9,2
IV	Антропо-фізіометричні і ваго-зростові показники (маса тіла, ОГК у трьох вимірах, індекс Пінье, ІМТ ГТ)	7,6
V	Показники варіаційної пульсометрії в момент реверсу (dX, ІН, ІВР, ВПР, АГКР)	7,5
VI	Витрати потужності організму на навантаження, показники ефективності регуляції серцевої діяльності (швидкість перерозподілу навантаження при зменшенні навантаження, коефіцієнти інерції, ефективності, швидкості перерозподілу потужності серцевих скорочень та час інерції)	6,9
VII	Показники варіаційної пульсометрії у стані відносного спокою (АМо, ІН, ІВР, ПАПР)	5,5
VIII	Показники варіаційної пульсометрії в кінці навантаження (ІН, ІВР, ВПР, АГКР)	5,4
IX	Показники динамометрії правої, лівої руки і станової, відповідні силові індекси	5,2
X	Показники загального функціонального стану мозку до навантаження (СР, РФМ, ФРС)	4,4
XI	ЧСС реверсу та ЧСС макс.	4,2
Загальний відсоток впливу факторів		80,5

Збільшилась вагова частка фактора I (13,9%), що містить показники фізичної працездатності та енергетичного рівня ($r=0,74-0,95$, $p<0,05$). Фактор II (10,6%) склали показники функціонування ССС ($r=0,7-0,85$, $p<0,05$). До фактора III (9,2%) віднесено показники варіаційної пульсометрії, що визначені на 5-й хвилині відновлення ($r=0,8-0,9$, $p<0,05$). Фактор IV (7,6%) містив антропо-фізіометричні і ваго-зростові показники ($r=0,81-0,92$, $p<0,05$). Системоутворюючими фактора V (7,5%) є показники варіаційної пульсометрії, визначені в момент реверсу навантаження ($r=0,86-0,96$, $p<0,05$). Фактор VI (6,9%) описується індикаторами, що характеризують ефективність

регуляції серцевої діяльності, має достовірні кореляційні зв'язки з показником витрат потужності організму на навантаження ($r=0,77-0,9$, $p<0,05$).

Фактор VII та VIII виявив статистично значимі кореляційні зв'язки з показниками варіаційної пульсометрії у стані відносного спокою ($r=0,82-0,88$, $p<0,05$) та в кінці виконання навантаження ($r=0,86-0,92$, $p<0,05$), їх відсоток впливу від загальної дисперсії вибірки становив 5,5 і 5,4 відповідно. Фактор IX (5,1%) має позитивну кореляцію з показниками динамометрії правої, лівої руки і станової та їх відповідних силових індексів ($r=0,7-0,9$, $p<0,05$). До факторів X увійшли показники загального функціонального стану мозку до навантаження ($r=0,9-0,94$, $p<0,05$), його масова частка становила 4,4% від загальної дисперсії вибірки. Масову частку 4,2% фактора XI склали максимальна ЧСС і ЧСС реверсу ($r=0,88-0,92$, $p<0,05$).

Факторна структура отриманих в передменструальну фазу ОМЦ даних спортсменок складалася з 12 факторів з масовою часткою від загальної дисперсії вибірки 83,5% (табл. 5).

Таблиця 5.

Факторна структура функціонального стану спортсменок 17–22 років в передменструальну фазу ОМЦ

Фактор	Показники	Внесок у загальну дисперсію, %
I	Показники фізичної працездатності (Тзаг, Азаг, PWC170, МСК, PWC170/кг, МСК/кг, пульсова вартість виконаної велоергометричної роботи) та енергетичного рівня організму ($W_{рев}$, $W_{вих}$, $W_{макс}$, A_1 , dW_p)	13,7
II	Показники варіаційної пульсометрії у стані відносного спокою (M_o , A_{M_o} , dX , IH , IBP , $ВПР$, $АГКР$), індекси Робінсона і Баєвського та ЧСС виходу з навантаження і середнє	13,7
III	Показники варіаційної пульсометрії в кінці навантаження (A_{M_o} , dX , IH , IBP , $ВПР$, $АГКР$, $ПАПР$)	8,5
IV	Антропо-фізіометричні і ваго-зростові показники (маса тіла, ОГК у трьох вимірах, індекс Пінье, ІМТ ГТ)	8,1
V	Показники варіаційної пульсометрії на 5-й хвилині відновлення (A_{M_o} , dX , IH , IBP , $ВПР$, $АГКР$, $ПАПР$)	7,8
VI	Динамометрії лівої, правої руки та станової, відповідні силові індекси	5,3
VII	Показники ефективності регуляції серцевої діяльності (швидкість перерозподілу навантаження при зменшенні навантаження, коефіцієнти ефективності, швидкості перерозподілу потужності серцевих скорочень та час інерції)	5,2
VIII	Показники варіаційної пульсометрії на реверсі навантаження (dX , $ВПР$, $АГКР$)	4,4
IX	Тип саморегуляції кровообігу, індекс Кердо	4,3
X	Показники загального функціонального стану мозку до навантаження (CP , $РФМ$, $ФРС$)	4,3
XI	Показники загального функціонального стану мозку після навантаження (CP , $РФМ$, $ФРС$)	4,1
XII	Показники варіаційної пульсометрії на реверсі навантаження (A_{M_o} , IH , IBP , $ПАПР$)	4,1
Загальний відсоток впливу факторів		83,5

До першого фактора (13,7%) увійшли показники фізичної працездатності та енергетичного рівня організму ($r=0,75-0,93$, $p<0,05$). Фактор II та III з масовою часткою 13,7 і 8,5% відповідно становили показники варіаційної пульсометрії у стані відносного спокою ($r=0,72-0,86$, $p<0,05$) та в кінці виконання навантаження ($r=0,73-0,9$, $p<0,05$). Фактор IV склали антропо-фізіометричні і ваго-зростові показники ($r=0,83-0,88$, $p<0,05$), їх вагова частка від загальної дисперсії вибірки збільшилась до 8,1% відносно відповідного фактора попередньої фази МЦ. Фактор V (7,8%) містив значення показників варіаційної пульсометрії, визначених на 5 хвилині відновлення ($r=0,8-0,92$, $p<0,05$). До фактора VI (5,3%) увійшли показники динамометрії і відповідних силових індексів ($r=0,74-0,8$, $p<0,05$). Фактор VII (5,2%) становили показники ефективності регуляції серцевої діяльності ($r=0,75-0,87$, $p<0,05$). Системоутворюючими фактора VIII стали показники варіаційної пульсометрії, визначені на реверсі навантаження ($r=0,93-0,95$, $p<0,05$), їх вагова частка зменшилась до 4,4% відносно відповідного фактора, визначеного в постовуляторну фазу ОМЦ. Біполярний фактор IX склали індекс Кердо ($r=-0,93$, $p<0,05$) і тип саморегуляції кровообігу

($r=0,93$, $p<0,05$) з масовою часткою 4,3%. У фактори X і XI увійшли показники загального функціонального стану мозку до ($r=0,88-0,93$, $p<0,05$) та після ($r=0,73-0,77$, $p<0,05$) навантаження відповідно. Фактор XII з часткою впливу 4,1% від загальної дисперсії вибірки склали значення варіаційної пульсометрії на реверсі навантаження ($r=0,82-0,88$, $p<0,05$).

Узагальнюючи інтерпретацію факторного аналізу функціональних можливостей спортсменок 17–22 років протягом ОМЦ, необхідно відмітити, що найбільш вагомий внесок обумовлюють фізична працездатність і енергетичний рівень організму, потім показники варіаційної пульсометрії і фізичного розвитку, менш впливовими є показники серцево-судинної та центральної нервової системи (рис. 1).

Отже, в результаті проведеного дослідження було виявлено 9–12 факторів, які характеризують внутрішню структуру компонентів функціональних можливостей спортсменок 17–22 років протягом ОМЦ. Найбільшу кількість факторів відзначено в менструальну та передменструальну фази, що свідчить про більш гнучку адаптивну систему реакцій, а найменшу – в овуляторну і постменструальну фази МЦ, що вказує на жорсткість реактивної відповіді на стресові навантаження.

Факторний аналіз дозволив визначити генеральні фактори у кожній з фаз МЦ. Так, в менструальну, постовуляторну і передменструальну фази до складу генерального уніполярного фактора увійшли показники фізичної працездатності та енергетичного рівня організму з масовою часткою від загальної дисперсії вибірки 13,8, 13,9 і 13,7% відповідно. Такий високий кореляційний зв'язок показників підтверджує важливість функціонального стану як аеробних, так і анаеробних систем для досягнення високих результатів при виконанні фізичних навантажень. В овуляторну фазу ОМЦ у генеральному факторі до показників фізичної працездатності і енергетичного рівня організму приєдналися антропо-фізіометричні і ваго-зростові показники з часткою впливу 15,8% від загальної дисперсії вибірки.

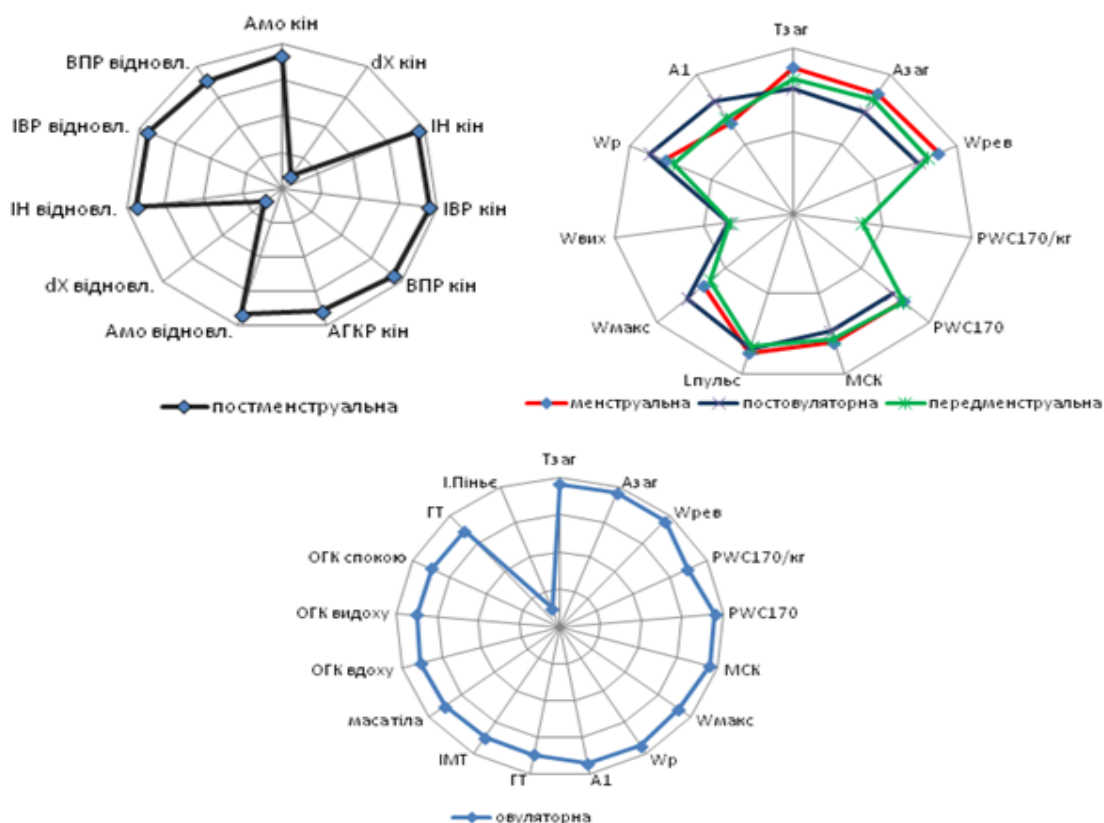


Рис. 1. Функціональний профіль спортсменок 17–22 років впродовж менструального циклу за даними фактора I

У постменструальну фазу до першого фактора увійшли низка показників варіаційної пульсометрії, визначених в кінці виконання велоергометричного навантаження та на 5 хвилині відновлення з ваговою часткою 17,2% від загальної дисперсії вибірки. Аналіз коефіцієнтів кореляції вказує на збільшення впливу рівня напруженості регуляторних систем організму і балансу симпатичного і парасимпатичного відділів вегетативної нервової системи. В менструальній і овуляторній фазах МЦ показники загального функціонального стану мозку, визначені до та після навантаження, виокремленні в один уніполярний фактор з масовою часткою 6,1 і 6,3% відповідно, що свідчить про сильні взаємозв'язки зміни стійкості реакції, рівня функціональних можливостей і функціонального рівня системи. В постменструальну і предменструальну фази ОМЦ ці показники увійшли до складу різних факторів.

Визначена факторна структура функціонального стану спортсменок 17–22 років може бути використана для контролю адаптаційних можливостей дівчат з урахуванням біологічних особливостей жіночого організму.

Перспективи подальших досліджень полягають у розробці принципів прогнозування фаз МЦ з більш оптимальними і адекватними адаптаційними реакціями жіночого організму на тренувальні і змагальні навантаження.

Список літератури

Босенко А.И. Выявление функциональных возможностей сердечно-сосудистой и центральной нервной систем у подростков при напряженной мышечной деятельности. Автореф. дис. ... канд. биол. наук / 14.00.17. – Тарту, 1986. – 25с. /Bosenko A.I. Vyyavleniye funktsional'nykh vozmozhnostey serdechno-sosudistoy i tsentral'noy nervnoy sistem u podrostkov pri napryazhennoy myshechnoy deyatel'nosti. Avtoref. dis. ... kand. biol. nauk / 14.00.17. – Tartu, 1986. – 25s./

Вовканич Л.С., Дунець-Лесько А.В. Факторний аналіз структури спеціальної підготовленості спортсменів-каратистів // Теорія та методика фізичного виховання. – 2012. – №3. – С. 36–40. /Vovkanych L.S., Dunets'-Les'ko A.V. Faktornyy analiz struktury spetsial'noi pidgotovlenosti sportsmeniv-karatystiv // Teoriya ta metodyka fizychnogo vykhovannya. – 2012. – No. 3. – S. 36–40./

Давиденко Д.Н. Методика оценки мобилизации функциональных резервов организма по его реакции на дозированную нагрузку // Научно-теоретический журнал «Ученые записки университета имени П.Ф.Лесгафта». – 2011. – №12 (70). – С. 52–57. /Davidenko D.N. Metodika otsenki mobilizatsii funktsional'nykh rezervov organizma po yego reaktsii na dozirovannuyu nagruzku // Nauchno-teoreticheskiy zhurnal «Uchenyye zapiski universiteta imeni P.F.Lesgafta». – 2011. – No. 12 (70). – S. 52–57./

Лясота Т.І. Факторна структура взаємозв'язку показників фізичного стану та адаптації до навчання молодших школярів // Педагогіка, психологія та медико-біологічні проблеми фізичного виховання і спорту. – 2012. – №3. – С. 71–74. /Lyasota T.I. Faktorna struktura vzayemozv'yazku pokaznykiv fizychnogo stanu ta adaptatsii do navchannya molodshykh shkolyariv // Pedagogika, psykholohiya ta medyko-biologichni problemy fizychnogo vykhovannya i sportu. – 2012. – No. 3. – S. 71–74./

Михалюк Е.Л. Диагностика пограничных и патологических состояний при предельных физических нагрузках в олимпийском и профессиональном спорте. Дис. ... докт. мед. наук / 14.01.24. – Днепропетровск, 2007. – 430с. /Mikhalyuk Ye.L. Diagnostika pogranychykh i patologicheskikh sostoyaniy pri predel'nykh fizicheskikh nagruzkakh v olimpiyskom i professional'nom sporte. Dis. ... dokt. med. nauk / 14.01.24. – Dnepropetrovsk, 2007. – 430s./

Самокиш І.І. Факторна структура функціональних можливостей дівчаток молодшого шкільного віку // Педагогіка, психологія та медико-біологічні проблеми фізичного виховання і спорту. – Харків: ХДАДМ (ХХПІ), 2010. – №1. – С. 105–108. /Samokysh I.I. Faktorna struktura funktsional'nykh mozhlyvostey divchatok molodshogo shkil'nogo viku // Pedagogika, psykholohiya ta medyko-biologichni problemy fizychnogo vykhovannya i sportu. – Kharkiv: KhDADM (KhKhPI), 2010. – No. 1. – S. 105–108./

Шахлина Л.Г., Футорний С.М. Здоровье спортсменок – один из актуальных вопросов современной медицины // Спортивная медицина. – 2003. – №1. – С. 5–12. /Shakhlina L.G., Futorny S.M. Zdorov'e sportshenok – odin iz aktual'nykh voprosov sovremennoy meditsiny // Sportivnaya meditsina. – 2003. – No. 1. – S. 5–12./

Shakhlina L. The physical work capacity of female athletes and its determining factors // IAAF. New Studies in Athletics. – 2000. – 15F, no. 1. – P. 37–47.

Представлено: Л.І.Сьомік / Presented by: L.I.Syomik

Рецензент: В.В.Мартиненко / Reviewer: V.V.Martynenko

Подано до редакції / Received: 23.10.2017

••• ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН ••• PLANT PHYSIOLOGY •••

УДК: 58.02:582.683.2:577.152

Активність β-глюкозидази в проростках *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh при дії іонізуючого випромінювання
С.М.Романчук

Інститут ботаніки імені М.Г.Холодного НАН України (Київ, Україна)
Державний науково-дослідний експертно-криміналістичний центр МВС України (Київ, Україна)
rrsm@ukr.net

Вивчено вплив рентгенівських променів в дозах 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 та 12 Гр на активність β-глюкозидази в проростках *Arabidopsis thaliana*. Проростки були досліджені через дві години (3-добові проростки) та десять діб (13-добові проростки) після опромінення. Для контролю використовували проростки того ж віку, які не були опромінені. Показано, що рентгенівське випромінювання змінює активність β-глюкозидази в проростках *A. thaliana*. Через дві години після рентгенівського опромінення в різних дозах активність β-глюкозидази в 3-добових проростках була вищою від контролю більш ніж в два рази. Найбільш реактивною була доза 8 Гр, ефект від якої зберігався впродовж десяти діб від моменту опромінення. Активність β-глюкозидази в 13-добових проростках за цієї дози була в 1,5 рази більшою від контролю. Припускається, що β-глюкозидаза, як фермент, що належить до класу гідролаз, посилює гідролітичні процеси, які спрямовуються на відновлення клітини після впливу рентгенівських променів. Розглянуто показники активності β-глюкозидази як молекулярний маркер на дію іонізуючої радіації в клітинах проростків *A. thaliana*.

Ключові слова: рентгенівське опромінення, *Arabidopsis thaliana*, активність β-глюкозидази.

The β-glucosidase activity in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh seedlings under exposure to ionizing radiation
S.M.Romanchuk

The effect of X-ray radiation in doses of 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 Gy on the activity of β-glucosidase in *Arabidopsis thaliana* seedlings has been investigated. Treated seedlings were examined two hours (3-day-old seedlings) and ten days (13-day-old seedlings) after the irradiation. Untreated seedlings of the same age were used as control samples. It was shown that X-ray radiation changed the β-glucosidase activity in *A. thaliana* seedlings. At two hours after X-ray radiation of different doses β-glucosidase activity demonstrated more than two-fold increase compared to control in 3-day-old seedlings. The most reactive was the dose of 8 Gy. Its effect lasted for ten days after irradiation. β-glucosidase activity of 13-day-old seedlings irradiated by this dose was 1.5 times higher than that of the control samples. It is assumed that β-glucosidase as hydrolyzing ferment catalyzes hydrolytic processes of cell regeneration after irradiation with X-rays. A role of the of β-glucosidase activity, as a molecular marker of ionizing radiation impact on *A. thaliana* seedlings is considered.

Key words: X-ray irradiation, *Arabidopsis thaliana*, β-glucosidase activity.

Активность β-глюкозидазы в проростках *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh при воздействии ионизирующего излучения
С.М.Романчук

Изучено влияние рентгеновских лучей в дозах 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 и 12 Гр на активность β-глюкозидазы в проростках *Arabidopsis thaliana*. Проростки были исследованы через два часа (3-суточные проростки) и десять суток (13-суточные) после облучения. Для контроля использовали проростки того же возраста, которые не были облучены. Показано, что рентгеновское излучение изменяет активность β-глюкозидазы в проростках *A. thaliana*. Через два часа после рентгеновского облучения в различных дозах активность β-глюкозидазы в 3-суточных проростках была выше контроля более чем в два раза. Наиболее реактивной была доза 8 Гр, эффект от которой сохранялся на протяжении десяти суток с момента облучения. Активность β-глюкозидазы в 13-суточных проростках при этой дозе была в 1,5 раза больше контроля. Предполагается, что β-глюкозидаза, как фермент, который относится к классу гидролаз, усиливает гидролитические процессы, которые направляются на восстановление клетки

после воздействия рентгеновских лучей. Рассмотрены показатели активности β-глюкозидазы как молекулярный маркер на действие ионизирующей радиации в клетках проростков *A. thaliana*.

Ключевые слова: рентгеновское облучение, *Arabidopsis thaliana*, активность β-глюкозидазы.

Вступ

В довгострокових космічних польотах рослини виступають головним компонентом автотрофної ланки біорегенеративних систем життєзабезпечення, оскільки вони є джерелом кисню, води та поживних речовин, а також позитивно впливають на психологічний стан екіпажу (Drysdale et al., 2003; Paradiso et al., 2014; Wheeler, 2010). Критерії вибору видів рослин для вирощування в космічних оранжереях включають високі показники фотосинтезу, поживну цінність і співвідношення їстівної маси до сумарної маси рослини, низький рівень відходів, а також короткий вегетаційний період від насіння до насіння та стійкість до патогенів (Salisbury, 1997; Stutte et al., 1999; Tibbitts, Henninger, 1997). Крім того, рослинні культури повинні відповідати певним дієтичним вимогам, таким як вміст білків, жирів, вуглеводів, вітамінів та мінералів (Molders et al., 2012; Stasiak et al., 2012). Ще одним важливим аспектом є радіорезистентність видів, які є менш чутливими до іонізуючого випромінювання в космосі (De Micco et al., 2011; Doucet-Chabeaud et al., 2001). У світлі цих міркувань зрозуміло, що виявлення видів, які мають всі бажані характеристики, є дуже складним.

Види родини Brassicaceae мають стійкість до різноманітних біологічних, хімічних та фізичних стресових впливів, в тому числі до радіаційного опромінення (Kuhlmann, Muller, 2009; Ogasawara et al., 2001; Porova, Gollack, 2007). Серед представників родини Brassicaceae значну харчову цінність мають капуста, редиска, ріпа, гірчиця, ріпак тощо. В лабораторних умовах як модельний об'єкт широко використовують *Arabidopsis thaliana*.

Наявність в клітинах білкових тілець, що є похідними гранулярного ендоплазматичного ретикулуму (ГЕР) і тому отримали назву ЕР-тілець, є характерною рисою видів цієї родини. Вони утворюються як локальні розширення ГЕР, в яких накопичується білок β-глюкозидаза, що є головним компонентом ЕР-тілець (Hayashi et al., 2001; Matsushima et al., 2003). β-глюкозидаза (КФ 3.2.1.21) належить до класу гідролаз та каталізує гідроліз β-глюкозидних зв'язків в аріл- та алкіл-β-D-глюкозидах, глюкотеїнах, глюколіпідах та в β-подібних олігосахаридних зв'язках (Xu et al., 2004).

Як відомо, в межах кабіни Міжнародної космічної станції дози іонізуючої радіації, які впливають на живі організми, коливаються в діапазоні від 5 до 12 Гр (International space station internal radiation monitoring). Вплив цих доз на рослини достовірно невідомий, тому метою нашої роботи було дослідити вплив рентгенівських променів на ріст проростків *A. thaliana* та активність β-глюкозидази.

Об'єкти та метод дослідження

Об'єктом дослідження були проростки *A. thaliana* (L.) Heynh екотипу Columbia (Col-0), які вирощували з насіння, що було попередньо стерилізоване «білизою» та 70°-ним спиртом, на агаризованому мінеральному середовищі MS (Murashige, Skoog, 1962) в чашках Петрі діаметром 12 см; в кожній чашці було по 200 проростків. Проростки росли за освітлення 12000 лк (з фотоперіодом 16 годин освітлення та 8 годин темряви) при температурі 23±1°C та відносній вологості повітря 67±1 %.

В досліді 3-добові проростки опромінювали рентгенівськими променями на приладі РУМ-17 (потужність дози 0,43 сГр/сек), в дозах 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 та 12 Гр в окремих чашках Петрі для кожної дози. Опромінені проростки досліджували через 2 години (3-добові проростки) та 10 діб (13-добові проростки) після опромінення. Всього в досліді мали 16 чашок Петрі: 8 – для 3-добових проростків та 8 – для 13-добових проростків.

Для контролю використовували проростки того ж віку, які не були опромінені. Всього в контролі мали 2 чашки Петрі: 1 – для 3-добових проростків та 1 – для 13-добових проростків.

Активність β-глюкозидази визначали за методом Matsuura (Matsuura et al., 1989). 100 мг проростків *A. thaliana* гомогенізували в 1,5 мл 0,05 М фосфатного буферу (рН 7,0) та лишали на одну годину. Потім центрифугували протягом 10 хв при 8000 г. Відбирали по 200 мкл супернатанту, додавали до нього 200 мкл 0,1 М розчину 4-нітрофеніл-β-D-глюкопіранозиду на 0,1 М фосфатному буфері (рН 7,0). Інкубували в термостаті при 37°C протягом 40 хв. Реакцію зупиняли додаванням 0,25 М Na₂CO₃ (рН 9,0). Визначення оптичної густини проводили на спектрофотометрі (СФ2000, Україна) при довжині хвилі 420 нм. Концентрацію білку визначали за

методом Бредфорд (Bradford, 1976). Активність β -глюкозидази визначали за кількістю 4-нітрофенолу, який утворюється під час реакції. Отримані одиниці вимірювання виражали як нМ 4-нітрофенолу/год/мг білку (далі – одиниці активності).

Усі досліди проводили в трьох біологічних та трьох аналітичних повторах. Одержані результати були статистично достовірні при $p < 0,05$. Розрахунки та побудови діаграм виконували за допомогою прикладної програми Microsoft Excel 2006.

Результати

У контролі 3-добові проростки *A. thaliana* мали темно-зелені сім'ядольні листки з цільною листовою пластинкою, овальні за формою. Головний корінь мав зачатки бічних коренів. 13-добові проростки мали розетку правильної форми, тобто чотири листки розетки були більшими за 1 мм (цит. за Козеко, 2015). Овальні за формою, зубчасті по краях листки розетки мали насичений зелений колір. Коренева система складалася із головного кореня та розгалужених бічних коренів. Після опромінення рентгенівськими променями в дозах від 0,5 до 12 Гр морфологія 3- та 13-добових проростків *A. thaliana*, включаючи розмір, колір і тургистентність листків розетки та головного кореня, були подібні до контролю.

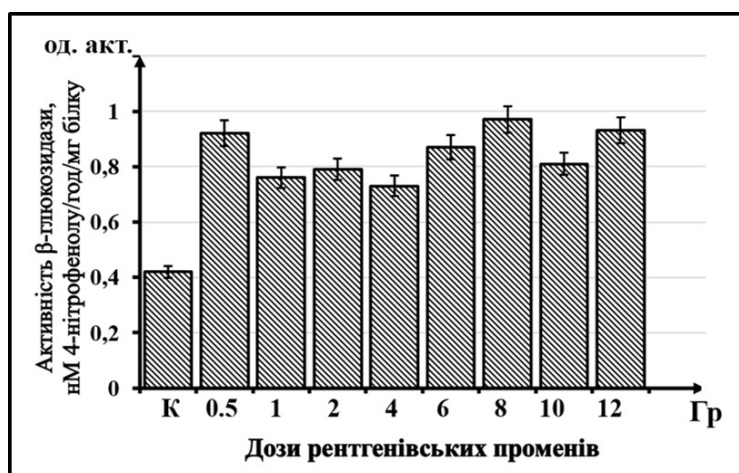


Рис. 1. Активність β -глюкозидази в 3-добових проростках *A. thaliana* в контролі (к) та після опромінення різними дозами рентгенівських променів, де Гр – Грей; од. акт. – одиниці активності

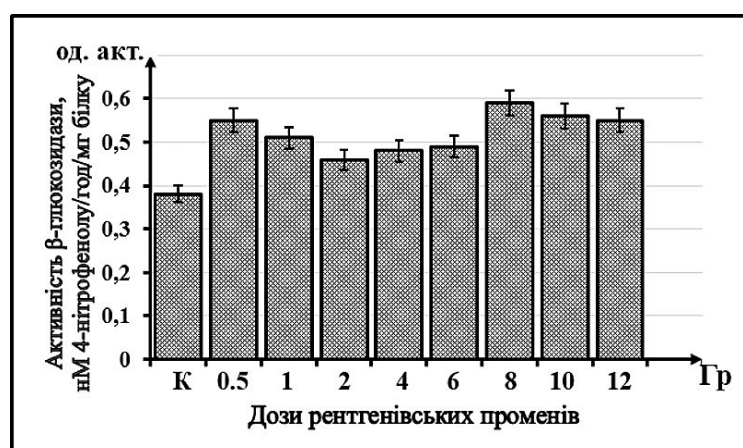


Рис. 2. Активність β -глюкозидази в 13-добових проростках *A. thaliana* в контролі (к) та після опромінення різними дозами рентгенівських променів, де Гр – Грей; од. акт. – одиниці активності

Активність β-глюкозидази в 3-добових проростках в контролі становила 0,42 од. акт. β-глюкозидазна активність через 2 години після опромінення рентгенівськими променями в дозах від 0,5 до 12 Гр змінювалась та була вищою від контролю більш ніж у два рази. Ці зміни показані на рис. 1. Збільшення дози опромінення сприяло нелінійному підвищенню активності ферменту.

У контрольних 13-добових проростків β-глюкозидазна активність становила 0,38 од. акт. Результати дослідження показали, що на 10-ту добу після опромінення рентгенівськими променями в дозах від 0,5 до 12 Гр зміна активності β-глюкозидази в проростках по відношенню до контролю мала неоднаковий характер (рис. 2).

Обговорення

Клітини рослин активно реагують на вплив іонізуючої радіації. Однією з таких реакцій є зміна активності ферментів, зокрема гідролітичних. Було встановлено залежність підвищення рибонуклеазної активності від доз іонізуючої радіації в онтогенезі *Linum usitatissimum*. 15-добові рослини *L. usitatissimum* піддавали дії різних доз гострого рентгенівського опромінення (1, 3, 5 та 15 Гр). Показано, що із поступовим підвищенням дози опромінення на різних стадіях онтогенезу та в процесі старіння відбувалося підвищення активності рибонуклеази в листках *L. usitatissimum*, як відповідь на дію рентгенівського опромінення (Берестяна, Гродзинський, 2014). Також було вивчено динаміку α-амілазної активності в коренях рослин *Pisum sativum* при дії гамма-променів. Насіння *P. sativum* опромінювали гамма-променями в дозах 2, 5, 10, 50 Гр. Через 12 та 18 годин, від початку пророщування насіння, визначали активність α-амілази в головних коренях цитохімічним методом. Із збільшенням дози опромінення активність α-амілази зменшувалась по відношенню до контролю. При цьому зменшення активності даного ферменту на 18-ту годину від початку замочування насіння було помітнішим, ніж на 12-ту годину. Показано, що функціонування α-амілази входить до комплексу механізмів, які беруть участь у протидії на вплив іонізуючої радіації (Міхєєв та ін., 2016). У наших дослідженнях збільшення активності β-глюкозидази через 2 години після опромінення рентгенівськими променями в дозах від 0,5 до 12 Гр порівняно з контролем може свідчити про участь цього ферменту в реакціях клітин на дію іонізуючої радіації, як і на інші стреси. Так, збільшення кількості ЕР-тілець, головним компонентом яких є β-глюкозидаза, порівняно з контролем, спостерігалось при механічному пошкодженні рослин, поїданні травоядними комахами, дії патогенів, обробці хімічними речовинами та за умов кліностатування (Matsushima et al., 2002; Nagano et al., 2008; Ogasawara et al., 2009; Romanchuk, 2013).

Показано, що при обробці кінетином та епібрасинолідом за умов короткострокового (до однієї доби) дефіциту кисню активність β-глюкозидази в листках проростків *P. sativum* зростала в 1,5–3 рази від 5- до 10-добового віку, а потім різко знижувалась (Еремина, 2007). Як нами досліджено, через 2 години після опромінення рентгенівськими променями в дозах від 0,5 до 12 Гр активність β-глюкозидази в 3-добових проростках *A. thaliana* піднімалась більш ніж в 2 рази порівняно з контролем, а на 10-ту добу після опромінення падала. Це може свідчити про те, що за такий період захисні реакції рослинних клітин *A. thaliana* на дію іонізуючої радіації набувають адаптивного характеру, ключову роль в яких виконує β-глюкозидаза. За даними літератури при дозі 0,5 Гр кількість пошкоджень ДНК у тридобових проростках *A. thaliana* досягала певного порогового значення, яке клітини сприймали як сигнал до індукції та реалізації адаптивних реакцій, в тому числі до активації репаративних систем (Данильченко, 2005). Оскільки в наших дослідженнях активність β-глюкозидази в 3-добових проростках *A. thaliana* через 2 години після опромінення при дозі 0,5 Гр була вищою від контролю в 2,5 рази, а при інших дозах (від 1 Гр до 12 Гр) виходила на плато, ми можемо припустити, що така доза є сигнальною для активації підвищення активності β-глюкозидази. Найбільш реактивною була доза 8 Гр, ефект від якої зберігався впродовж 10 діб від моменту опромінення. Активність β-глюкозидази в 13-добових проростках за цієї дози була в 1,5 рази більшою від контролю. Ми можемо припустити, що β-глюкозидаза, як фермент, що належить до класу гідролаз, посилює гідролітичні процеси, які спрямовуються на відновлення клітини після впливу рентгенівськими променями.

Раніше було показано, що при опроміненні проростків *A. thaliana* дозами від 0,1 Гр до 10 Гр видимих змін у морфології та темпах росту цих рослин не спостерігалось (Kovalchuk et al., 2000; Kurimoto et al., 2010). Тоді як при дозах 50 гр, 150 Гр та 300 Гр значно гальмувався ріст рослин (Tsyusko et al., 2006; Wi et al., 2007). У наших дослідженнях ми обрали діапазон доз рентгенівських

променів від 0,5 до 12 Гр, оскільки в межах кабіни космічного корабля дози, які впливають на живі організми, коливаються в межах від 5 Гр до 12 Гр. Незважаючи на те, що за зовнішнім виглядом опромінені проростки не відрізнялись від контролю, на молекулярному рівні зміни відбувались, які проявились в зміні активності β -глюкозидази, що може бути молекулярним маркером на дію іонізуючої радіації. Як нами показано, вплив рентгенівських променів призводить до збільшення активності β -глюкозидази. Тому ми можемо вважати, що цей фермент, як головний компонент ER-тілець, виконує захисну функцію в клітинах *A. thaliana*, який належить до родини Brassicaceae.

Залежність активності β -глюкозидази від дози опромінення є нерівнозначною, тому питання про відповідь рослин *A. thaliana* на дозу рентгенівських променів залишається відкритим.

Список літератури

- Берестяна А.М., Гродзинський Д.М. Зміни рибонуклеазної активності опромінених УФ-В та рентгенівською радіацією сім'ядольних листків *Linum usitatissimum* у процесі старіння // Доп. НАН України. – 2014. – №12. – С. 142–151. /Berestyana A.M., Grodzyns'kyy D.M. Zminy rybonukleaznoi aktyvnosti oprominenykh UF-V ta rentgeniv's'koyu radiatsiyeyu sim'yadol'nykh lystkiv *Linum usitatissimum* u protsesi starinnya // Dop. NAN Ukrainy. – 2014. – No. 12. – S. 142–151./
- Данильченко О.О. Радіоадаптивна відповідь, індукована ультрафіолетовим випроміненням, у рослин. Автореф. дис. ... канд. біол. наук / 03.00.01 – радіобіологія. – К., 2005. – 24с. /Danil'chenko O.O. Radioadaptivna vidpovid', indukovana ul'trafiol'etovym vyprominennyam, u rosllyn. Avtoref. dis. ... kand. biol. nauk / 03.00.01 – radiobiologiya. – K., 2005. – 24s./
- Еремина Н.А. Влияние гипоксии и повышенных концентраций диоксида углерода на внутриклеточную компартментацию свободных аминокислот и активность β -глюкозидазы растений. Дис. ... канд. биол. наук / 03.00.12. – Воронеж, 2007. – 281с. /Yeremina N.A. Vliyanie gipoksii i povyshennykh kontsentratsiy dioksida ugleroda na vnutrikletochnuyu kompartmentatsiyu svobodnykh aminokislot i aktivnost' β -glyukozidazy rasteniy. Dis. ... kand. biol. nauk / 03.00.12. – Voronezh, 2007. – 281s./
- Козеко Л.Є. Вплив радіціколу, інгібітору шаперонів HS90, на ріст проростків *Arabidopsis thaliana* після гамма-опромінення // Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія біологія. – 2015. – №1 (34). – С. 14–21. /Kozeko L.Ye. Vplyv raditsikolu, ingibitoru shaperoniv HS90, na rist prorostkiv *Arabidopsis thaliana* pislya gamma-oprominennya // Visnyk Kharkiv's'kogo natsional'nogo agrarnogo universitetu. Seriya biologiya. – 2015. – No.1 (34). – S. 14–21./
- Міхєєв О.М., Овсяннікова Л.Г., Войтенко Л.В. та ін. Системність механізмів радіогермесисних ефектів у рослин // Доп. НАН України. – 2016. – №4. – С. 106–110. /Mikheev O.M., Ovsyannikova L.G., Voytenko L.V. ta in. Systemnist' mekhanizmv radiogermezysnykh efektiv u rosllyn // Dop. NAN Ukrainy. – 2016. – No. 4. – S. 106–110./
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analytical Biochemistry. – 1976. – Vol.72. – P. 248–254.
- De Micco V., Arena C., Pignalosa D., Durante M. Effects of sparsely and densely ionizing radiation on plants // Radiation and Environmental Biophysics. – 2011. – Vol.50 (1). – С. 1–19.
- Hayashi Y., Yamada K., Shimada T. et al. A proteinase-storing body that prepares for cell death or stresses in the epidermal cells of *Arabidopsis* // Plant Cell Physiol. – 2001. – Vol.42. – P. 894–899.
- Doucet-Chabeaud G., Godon C., Brutesco C. et al. Ionising radiation induces the expression of PARP-1 and PARP-2 genes in *Arabidopsis* // Molecular Genetics and Genomics. – 2001. – Vol.265 (6). – P. 954–963.
- Drysdale A. E., Ewert M.K., Hanford A.J. Life support approaches for Mars missions // Advances in Space Research. – 2003. – Vol.31 (1). – P. 51–61.
- International space station internal radiation monitoring (<http://www.nasa.gov/missionpages/station/research/experiments/1043.htm>)
- Kovalchuk O., Arkhipov A., Barylyak I. et al. Plants experiencing chronic internal exposure to ionizing radiation exhibit higher frequency of homologous recombination than acutely irradiated plants // Mutation Res. – 2000. – Vol.449. – P. 47–56.
- Kuhlmann F., Muller C. Independent responses to ultraviolet radiation and herbivore attack in broccoli // J. Exp. Bot. – 2009. – Vol.60. – P. 3467–3475.
- Kurimoto T. J., Constable V. H., Huda A. Effects of ionizing radiation exposure on *Arabidopsis thaliana* // Health Phys. – 2010. – Vol.99 (1). – P. 49–57.
- Matsushima R., Kondo M., Nishimura M., Hara-Nishimura I. A novel ER-derived compartment, the ER body, selectively accumulates a β -glucosidase with an ER retention signal in *Arabidopsis* // Plant. J. – 2003. – Vol.33. – P. 493–502.

- Matsushima R., Hayashi Y., Kondo M. et al. An endoplasmic reticulum derived structure that is induced under stress conditions in *Arabidopsis* // Plant Physiol. – 2002. – Vol.130. – P. 1807–1814.
- Matsuura M., Obata A., Fukushima D. Objectionable flavor of soymilk developed during the soaking of soybeans and its control // Journal Food Science, Chicago. – 1989. – Vol.54 (3). – P. 602–605.
- Molders K., Quinet M., Decat J. et al. Selection and hydroponic growth of potato cultivars for bioregenerative life support systems // Adv. Space Res. – 2012. – Vol.50. – P. 156–165.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – Vol.15 (13). – P. 473–497.
- Nagano A.J., Fukao Y., Fujiwara M. et al. Antagonistic jacalin-related lectins regulate the size of ER body-type β-glucosidase complexes in *Arabidopsis thaliana* // Plant Cell Physiol. – 2008. – Vol.49. – P. 969–980.
- Ogasawara K., Yamada K., Christeller J.T. et al. A proteinase-storing body that prepares for cell death or stresses in the epidermal cells of *Arabidopsis* // Plant Cell Physiol. – 2001. – Vol.42. – P. 894–899.
- Ogasawara K., Yamada K., Christeller J.T. et al. Constitutive and inducible ER bodies of *Arabidopsis thaliana* accumulate distinct β-glucosidases // Plant Cell Physiol. – 2009. – Vol.50 (3). – P. 480–488.
- Popova O.V., Golladack D.J. In the halotolerant *Lobularia maritima* (Brassicaceae) salt adaptation correlates with activation of the vacuolar H(+)-ATPase and the vacuolar Na+/H+ antiporter // J. Plant Physiol. – 2007. – Vol.164 (10). – P. 1278–1288.
- Paradiso R., De Micco V., Buonomo R. et al. Soilless cultivation of soybean for Bioregenerative Life-Support Systems: a literature review and the experience of the MELiSSA project – Food characterisation Phase I // Plant Biol. – 2014. – Vol.16. – P. 69–78.
- Romanchuk S. ER bodies in *Arabidopsis thaliana* root apices under clinorotation and after X-ray irradiation // 9th International Conference “Plant Functioning Under Environmental Stress”. – Institute of Plant Physiology, PAS, Cracow, Poland, 2013. — P. 185–192.
- Salisbury F.B. Growing Super-Dwarf wheat in space station MIR // Life Support and Biosphere Science. – 1997. – Vol.4 (3–4). – P. 155–166.
- Stasiak M., Gidzinski D., Jordan M., Dixon M. Crop selection for advanced life support systems in the ESA MELiSSA program: Durum wheat (*triticum turgidum* var durum) // Adv. Space Res. – 2012. – Vol.49. – P. 1684–1690.
- Stutte G.W., Mackowiak C.L., Yorio N.C., Wheeler R.M. Theoretical and practical considerations of staggered crop production in a BLSS // Life Support and Biosphere Science. – 1999. – Vol.6 (4). – P. 287–291.
- Tibbitts T.W., Henninger D.L. Food production in space: Challenges and perspectives / In: E.Goto et al. (eds.) Plant production in closed systems. – Netherlands: Kluwer Acad. Publ., 1997. – P. 189–203.
- Tsyusko O.V., Smith M.H., Oleksyk T.K. et al. Genetics of cattails in radioactively contaminated areas around Chernobyl // Molecular Ecol. – 2006. – Vol.15. – P. 2611–2625.
- Wheeler R.M. Plants for human life support in space: From Myers to Mars // Gravitational and Space Biology. – 2010. – Vol.23. – P. 25–35.
- Wi S.G., Chung B.Y., Kim J.S. et al. Effects of gamma irradiation on morphological changes and biological responses in plants // Micron. – 2007. – Vol.38. – P. 553–564.
- Xu Z., Escamilla-Trevino L., Zeng L. et al. Functional genomic analysis of *Arabidopsis thaliana* glycoside hydrolase family 1 // Plant Mol. Biol. – 2004. – Vol.55. – P. 343–367.

Представлено: А.А.Дуніч / Presented by: A.A.Dunich

Рецензент: В.В.Жмурко / Reviewer: V.V.Zhmurko

Подано до редакції / Received: 18.09.2017

... ФАУНА УКРАЇНИ НА МЕЖІ ХХ–ХХІ СТ. НОВІ КОНЦЕПЦІЇ
ЗООЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ...
FAUNA OF UKRAINE AT THE TURN OF XX–XXI CENTURIES.
NEW CONCEPTS OF ZOOLOGICAL RESEARCH ...

УДК: 598.22/.27:591.553 (282.247.326.5)

Структура угруповань гніздових водоплавних і водно-болотяних птахів
Приорелля та її зміни за останні десятиліття
М.В.Банік¹, О.Л.Пономаренко², А.А.Атемасов¹

¹НДІ біології, Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна (Харків, Україна)

²Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара (Дніпро, Україна)

mikbanik@ukr.net, aponomar@ua.fm, atemasov@gmail.com

Долина Орелі, лівої притоки Дніпра, є одним із найважливіших осередків гніздування негоробиних водоплавних і водно-болотяних птахів у континентальній Україні. Склад і структуру їх угруповань у Приореллі вивчали за даними обліків гніздових пар та виводків на 48 ділянках у 2005–17 рр. Зміни складу і структури угруповань оцінювали у порівнянні із літературними даними для періодів 1910–20 та 1970–80-х рр. За результатами обліків найчисленнішими видами виявилися лиска (*Fulica atra*) (середня щільність гніздування – 36,2 пари/км²), звичайний мартин (*Larus ridibundus*) (17,3), чорний крячок (*Chlidonias niger*) (11,7), велика чепура (*Egretta alba*) (6,7), крижень (*Anas platyrhynchos*) (4,5), кулик-довгоніг (*Himantopus himantopus*) (4,5) і попелюх (*Aythya ferina*) (4,3). Порівняно із першою половиною минулого століття значно зросло різноманіття гніздових видів мартинів і крячків. Зміни складу і структури угруповань за останні три десятиліття відбилися у суттєвому зменшенні чисельності пірникоз, сірої гуски (*Anser anser*), куликів і болотяних крячків, а також у зникненні великих колоній звичайного мартина і чорношиїї пірникози (*Podiceps nigricollis*). Зменшення чисельності більшості видів частково пояснюється сукупним впливом падіння рівню води у водоймах та зменшення пасовищного навантаження в угіддях, що їх оточують. Попри все, долина Орелі зберігає суттєве значення для популяції сірої гуски і попелюха.

Ключові слова: водоплавні і водно-болотяні птахи, чисельність, склад угруповань, структура угруповань, долина ріки Орелі.

The structure of the communities of breeding waterfowl and waterbirds of
Orel' river valley and its changes in last decades
M.V.Banik, O.L.Ponomarenko, A.A.Atemasov

The valley of Orel' river, a left bank tributary of Dnieper river, is an important breeding ground for waterfowl and waterbirds in the continental part of Ukraine. The composition and structure of waterfowl and waterbirds communities in Orel' valley was estimated by the data of counts of breeding pairs and broods on 48 plots in 2005–2017 years. The changes of composition and structure of the communities were revealed by comparison with literature data for the periods of 1910–1920s and 1970–1980s. According to the counts data Coot (*Fulica atra*) (mean breeding density is 36,2 pairs/km²), Black-headed Gull (*Larus ridibundus*) (17,3), Black Tern (*Chlidonias niger*) (11,7), Great Egret (*Egretta alba*) (6,7), Mallard (*Anas platyrhynchos*) (4,5), Black-winged Stilt (*Himantopus himantopus*) (4,5), and Common Pochard (*Aythya ferina*) (4,3) are the most numerous species. The diversity of breeding species of gulls and terns has grown considerably since early XX century. The numbers of grebes, Greylag Goose (*Anser anser*), waders and marsh terns have declined for the last three decades. Besides, great colonies of Black-headed Gull and Black-necked Grebe (*Podiceps nigricollis*) have disappeared. The decline of the majority of species can be partly explained by cumulative negative impact of the fall of water level in lakes and the reduction of grazing pressure around them. However, Orel' valley retains its important role in supporting populations of Greylag Goose and Common Pochard.

Key words: waterfowl and waterbirds, numbers, composition of communities, structure of communities, Orel' river valley.

Структура сообществ гнездящихся водоплавающих и водно-болотных птиц Приорелья и её изменения за последние десятилетия

М.В.Банник, А.Л.Пономаренко, А.А.Атемасов

Долина Орели, левого притока Днепра, служит одним из главнейших очагов гнездования неворобьиных водоплавающих и водно-болотных птиц в континентальной Украине. Состав и структуру их сообществ в Приорелье изучали по данным учётов гнездящихся пар и выводков на 48 участках в 2005–17 гг. Изменения состава и структуры сообществ оценивали в сравнении с литературными данными для периодов 1910–20 и 1970–80 гг. По результатам учётов наиболее многочисленными видами оказались лысуха (*Fulica atra*) (средняя плотность гнездования – 36,2 пар/км²), озёрная чайка (*Larus ridibundus*) (17,3), чёрная крачка (*Chlidonias niger*) (11,7), большая белая цапля (*Egretta alba*) (6,7), кряква (*Anas platyrhynchos*) (4,5), ходулочник (*Himantopus himantopus*) (4,5) и красноголовый нырок (*Aythya ferina*) (4,3). В сравнении с первой половиной прошлого столетия существенно увеличилось разнообразие гнездящихся видов чаек и крачек. Изменения состава и структуры сообществ в последние три десятилетия выразились в ощутимом уменьшении численности поганок, серого гуся (*Anser anser*), куликов и болотных крачек, а также в исчезновении больших колоний озёрной чайки и черношейной поганки (*Podiceps nigricollis*). Уменьшение численности большинства видов частично объясняется совокупным влиянием падения уровня воды в водоёмах и уменьшения пастбищной нагрузки в угодьях, которые их окружают. Тем не менее, долина Орели сохраняет существенное значение для популяций серого гуся и красноголового нырка.

Ключевые слова: водоплавающие и водно-болотные птицы, численность, состав сообществ, структура сообществ, долина реки Орели.

Вступ

Долина Орелі (Орілі), лівої притоки Дніпра, є одним із найважливіших місць гніздування водоплавних і водно-болотяних негоробиних птахів у континентальній частині України (Булахов та ін., 1999а, б; Банік та ін., 2013). Для Приорелля (Приорілля) історично були характерні високі показники різноманіття і чисельності видів цих груп (Гавриленко, 1929), що пов'язано із природним розмаїттям водойм – значним числом заплавлених озер, унікальних озероподібних розширень річища (так званих орельських лиманів), мілководних ефемерних озер у пониженнях третьої тераси долини тощо (Банік та ін., 2013; Барановський та ін., 2013). Ймовірно, Приорелля разом із іншими долинами лівих допливів Дніпра на Дніпровській низовині завжди відіграло роль центру, з якого низка видів птахів розселялася у північному і північно-східному напрямках, зокрема до басейну Сіверського Донця, де різноманіття водно-болотяних угідь є значно меншим (Банік, Коршунов, 2014). Угруповання гніздових водоплавних і водно-болотяних птахів у Приореллі можна вважати еталонними, а за їх станом визначати загальні тенденції змін чисельності і поширення цих груп у Центральній і Східній Україні.

Вивчення птахів басейну Орелі триває, фактично, з самого початку орнітологічних досліджень в Україні. Приорелля у межах колишніх Полтавської і Катеринославської губерній відвідували К.Ф.Кесслер та О.В.Чернай (Кесслер, 1853; Чернай, 1853), а долину верхньої течії річки обстежував на початку 1890-х років М.М.Сомов (1897). Але відомості, які містяться у працях згаданих авторів, є суто фрагментарними.

Першими детальними зведеннями, у яких зібрані матеріали стосовно поширення і чисельності птахів у долині Орелі, є праці полтавського орнітолога М.І.Гавриленка (1917, 1929). Його дослідження у 1910–1920-ті роки охоплювали, переважно, середню течію Орелі, характеризувалися надзвичайною повнотою і підтверджені значними колекційними зборами. За даними М.І.Гавриленка можна охарактеризувати стан угруповань гніздових водоплавних і водно-болотяних птахів у Приореллі ще до кардинального перетворення водно-болотяних угідь долини Орелі людиною у другій половині ХХ століття.

З кінця 1950-х років фауну птахів понизь Орелі вивчали дніпровські орнітологи, завдяки чому вдалося зібрати важливі відомості про гніздування низки видів чапель, сивкоподібних тощо (Булахов, 1973; Булахов, Мясоєдова, 1975а, б; Губкин, Барабаш, 1977). Наприкінці 1970-х та у 1980-ті роки, у період інтенсивної трансформації долини Орелі під час будівництва каналу Дніпро-Донбас, у середній течії річки працювали харківські орнітологи (Лисецкий и др., 1982). Зокрема, О.М.Гудина (1984, 1995) вивчав угруповання гніздових водоплавних і водно-болотяних птахів із застосуванням методу обліку гнізд на постійних площах. У його працях подано докладні дані про структуру угруповань, щоправда, вони були зібрані лише на чотирьох постійних пробних ділянках

площею 5–52 га у середній течії Орелі. Відомості про поширення окремих видів у Приореллі викладені О.М.Гудиною у зведенні по рідкісних птахів Східної України (Гудина, 2007).

Пізніше, у 1990-ті роки, гніздову фауну Приорелля вивчали дніпровські і харківські орнітологи: в результаті дві території (Цибульківські озера у нижній течії річки та ділянка долини у місці впадіння двох правих приток Орелі, Берестової і Орчика) отримали статус глобально важливих для збереження птахів (Булахов и др., 1999а, б).

Перетворення ландшафту долини Орелі внаслідок гідробудівництва (Барановський та ін., 2013), а також зміни клімату, які позначаються на наповненості водойм (Звіт про науково-дослідну роботу..., 2013), спонукають до оцінки сучасного стану угруповань гніздових водоплавних і водно-болотяних птахів Приорелля. Особливо актуальні такі оцінки на тлі підготовки до створення національного природного парку «Приорільський» (Барановський та ін., 2013).

Нами вивчення фауни гніздових водоплавних і водно-болотяних птахів долини Орелі проводилося епізодично у 1991–93 рр. (у місці впадіння до Орелі річки Орчик) та детальніше, із ширшим просторовим охопленням, – з середини 2000-х років. У 2012–2017 рр. обліки птахів були проведені на всіх основних відрізках долини на території Харківської, Полтавської і Дніпропетровської областей. На основі попереднього узагальнення зібраних даних були проаналізовані зміни видового складу і структури угруповань водоплавних і водно-болотяних птахів з початку регулярних досліджень в регіоні, охарактеризовані сучасні тенденції змін чисельності окремих видів і груп та їх ймовірні причини, подані оцінки значення долини Орелі для підтримання популяцій деяких видів птахів.

Методика

Дані щодо чисельності і поширення водоплавних і водно-болотяних негоробиних птахів (представників рядів Podicipediformes, Pelecaniformes, Ciconiiformes, Anseriformes, Gruiformes та Charadriiformes) у Приореллі збирали упродовж весняних і літніх сезонів у період з 2005 до 2017 рр., найбільш інтенсивно – у 2012 р. та у 2015–17 рр. Для цього проводили обстеження пробних ділянок, що їх виділяли за помітними природними орієнтирами, наприклад смугами надводної рослинності уздовж берегів озер або за границями заплавної тераси. Обліки птахів вели, за можливістю, використовуючи підвищення, наприклад гребні корінного берегу долини, як оглядові пункти. Для кожної пробної ділянки отримували показники площі за топографічними мапами і космічними знімками. В середньому площа ділянки становила 70 га, медіанне значення – 52 га ($n=48$), із коливаннями від 5 до 350 га. Найбільші за площею ділянки було закладено на великих озерах і урочищах, як-от на Займанському лимані (Харківська область), де було важко виділити менші та зручніші для обліку пробні площі.

На пробних ділянках проводили обліки водоплавних і водно-болотяних птахів із використанням методу картування з наступною категоризацією зустрічей, тобто обліку гніздових пар із просторовою прив'язкою всіх реєстрацій на ділянці (Dzubin, 1969; Inventory methods..., 1999). Категоризація означає віднесення кожної зустрічі до певного типу, що вказує на стадію життєвого циклу, в якій перебуває птах, та дає змогу виявити, чи можна зарахувати його до складу гніздової популяції (Dzubin, 1957; McKinney, 1965; Inventory methods..., 1999). Для частини ділянок дані з чисельності качок, пірникоз і лиски (*Fulica atra*), які були отримані навесні, корегували за результатами обліків виводків, що їх проводили наприкінці червня та на початку липня. Виводки обліковували у ранішній ранковий час та/або ввечері, коли вони проявляють найбільшу активність (Банік, Джамирзоев, 2004). За результатами обліків гніздових пар та виводків для кожної ділянки розраховували показники щільності гніздування виявлених видів.

Усього оцінки щільності гніздування водоплавних і водно-болотяних птахів отримані у 2005–2017 рр. для 48 водойм та урочищ на всіх головних відрізках долини Орелі від с. Мар'івка Сахновщинського району Харківської області до с. Ревушине Кобеляцького району Полтавської області (рис. 1). Найпильніше був обстежений відрізок середньої течії Орелі від м. Перещепине Новомосковського району Дніпропетровської області до с. Шедієве Новосанжарського району Полтавської області.

Для аналізу змін співвідношення у складі угруповань основних груп видів за типами живлення використовували власну класифікацію, що її було розроблено для оцінки уразливості видів птахів фауни України до змін клімату (Банік, Атемасов, 2010). Домінанти (>10% участі у складі населення) і звичайні види (>1%) виділялися згідно з класифікацією О.П.Кузякіна (1962).



Рис. 1. Розташування ділянок, на яких проводили обліки водоплавних і водно-болотяних птахів у Приореллі у 2005–2017 рр.

Результати і обговорення

Зміни у складі угруповань гніздових водоплавних і водно-болотяних птахів Приорелля

Усього у 2005–17 рр. у Приореллі було виявлено 44 достовірно і ймовірно гніздові види водоплавних і водно-болотяних негоробиних птахів. Зміни у видовому складі і представленості окремих систематичних груп аналізували шляхом порівняння із даними досліджень М.І.Гавриленка (1917, 1929) у 1910–20-ті роки та О.М.Гудини (1984, 1995) у 1970–80-ті роки (табл. 1). До списку не були внесені види (з груп, що їх взяли до аналізу), які не пов'язані у своєму поширенні із водно-болотяними угіддями як такими, наприклад, лежень (*Burhinus oedicnemus*) і слуква (*Scolopax rusticola*).

Дані О.М.Гудини, вочевидь, потребували корекції, оскільки були зібрані лише у кількох пунктах середньої течії Орелі (2007). Тому список, що характеризує стан угруповань водоплавних і водно-болотяних птахів у 1970–80-ті роки, був відкоригований у відповідності до наших власних даних, які були зібрані на початку 1990-х років, фактично, у той самий період із високим рівнем наповненості водойм. Попри це, список все ж таки лишається неповним, оскільки деякі види, які, найімовірніше, входили до складу угруповань, наприклад, декотрі види качок і водяний пастушок (*Rallus aquaticus*), не були у ті часи зареєстровані ані О.М.Гудиною, ані нами. Слід також додати, що нами не взято до уваги вказівку О.М.Гудини (2007) на випадок гніздування чубатої черні (*Aythya fuligula*). Ми вважаємо дані, що їх наводить автор, недостатніми для певного визначення знахідки.

Таблиця 1.
 Зміни у складі угруповань гніздових водоплавних і водно-болотяних птахів
 Приорелля за період з 1920-х до 2010-х рр.

Вид	Період		
	1910–1920-ті роки (Гавриленко, 1917, 1929)	1970–1980-ті роки (Гудина, 1984, 1995, із доповненнями)	2000–2010-ті роки (наші дані)
<i>Podiceps cristatus</i>	+++	++	++
<i>Podiceps grisegena</i>	+++	++	+
<i>Podiceps nigricollis</i>	+++	+++	+
<i>Tachybaptus ruficollis</i>	+	+	+
<i>Phalacrocorax carbo</i>	–	–	+
<i>Botaurus stellaris</i>	++	++	++
<i>Ixobrychus minutus</i>	+++	+	++
<i>Nycticorax nycticorax</i>	+++	+	+
<i>Egretta alba</i>	+	+++	+++
<i>Egretta garzetta</i>	+	+	+
<i>Ardea cinerea</i>	++	++	++
<i>Ardea purpurea</i>	+++	+++	++
<i>Anser anser</i>	++	+++	++
<i>Cygnus olor</i>	–	+	+
<i>Tadorna ferruginea</i>	–	–	+
<i>Anas platyrhynchos</i>	+++	+++	++
<i>Anas crecca</i>	++	–	+
<i>Anas strepera</i>	++	–	+
<i>Anas acuta</i>	+	–	–
<i>Anas querquedula</i>	+++	+++	+++
<i>Anas clypeata</i>	++	+	+
<i>Aythya ferina</i>	+++	+++	+++
<i>Aythya nyroca</i>	+++	–	+
<i>Netta rufina</i>	–	–	+?
<i>Rallus aquaticus</i>	++	–	++
<i>Porzana porzana</i>	++	–	–
<i>Porzana parva</i>	+++	+	++
<i>Porzana pusilla</i>	+	–	–
<i>Crex crex</i>	++	+*	+
<i>Gallinula chloropus</i>	+++	+	++
<i>Fulica atra</i>	+++	+++	+++
<i>Grus grus</i>	++	+*	+
<i>Glareola nordmanni</i>	++	–	–
<i>Charadrius dubius</i>	++	+	+
<i>Vanellus vanellus</i>	+++	+++	+
<i>Tringa totanus</i>	+++	++	+
<i>Tringa ochropus</i>	++?	–	–
<i>Tringa stagnatilis</i>	++	+*	+?
<i>Actitis hypoleucos</i>	++	–	+
<i>Himantopus himantopus</i>	–	++	++
<i>Limosa limosa</i>	++	+	+
<i>Numenius arquata</i>	+	–	–
<i>Gallinago gallinago</i>	++	+*	+
<i>Larus ridibundus</i>	–	+++	++
<i>Larus cachinnans</i>	–	–	+

Продовження таблиці 1.

<i>Sterna hirundo</i>	–	+	+
<i>Sterna albifrons</i>	–	–	+?
<i>Chlidonias niger</i>	+++	+++	++
<i>Chlidonias leucopterus</i>	++	+++	+
<i>Chlidonias hybrida</i>	–	+++	++

Умовні позначки: +++ – численний вид; ++ – звичайний вид; + – рідкісний, нечисленний вид; * – вид, про присутність якого у складі угруповань не згадується у працях О.М.Гудини, проте він гніздився у Приореллі на початку 1990-х років за нашими даними; ? – вид присутній у гніздовий та/або у післягніздовий час, проте його розмноження не доведене або малоімовірне; – – вид відсутній на гніздуванні.

За результатами аналізу можна назвати низку видів, які не змінили свій статус у Приореллі з початку ХХ століття до теперішнього часу. Це мала пірникоза (*Tachybaptus ruficollis*), бугай (*Botaurus stellaris*), мала чепура (*Egretta garzetta*), сіра чапля (*Ardea cinerea*), велика чирянка (*Anas querquedula*), попелюх (*Aythya ferina*) та лиска. З високою ймовірністю до цієї ж групи можна також віднести велику пірникозу (*Podiceps cristatus*), руду чаплю (*Ardea purpurea*), сіру гуску (*Anser anser*), широконоську (*Anas clypeata*), деркача (*Crex crex*), сірого журавля (*Grus grus*) і чорного крячка (*Chlidonias niger*). Більшість цих видів – звичайні та навіть масові, зміни чисельності яких, якщо і відбувалися, то майже не міняли їх статусу. Інші, як-от, мала чепура і сірий журавель, перебуваючи у Приореллі на межі поширення, лишаються рідкісними, а проте й досі входять до складу гніздової фауни.

З часів М.І.Гавриленка у Приореллі достовірно з'явилося на гніздуванні 8 видів водоплавних і водно-болотяних птахів. У 1970–80-ті роки (для деяких видів і дещо раніше) вперше було зареєстроване розмноження лебедя-шипуну (*Cygnus olor*), кулика-довгонога (*Himantopus himantopus*), звичайного мартина (*Larus ridibundus*), річкового (*Sterna hirundo*) і білощого (*Chlidonias hybrida*) крячків, пізніше – розмноження великого баклана (*Phalacrocorax carbo*), огара (*Tadorna ferruginea*), жовтоногого мартина (*Larus cachinnans*). Ймовірно, хоча і не доведене, гніздування в останні роки червонодзьобої черні (*Netta rufina*) і малого крячка (*Sterna albifrons*). Порівняно із першою половиною минулого століття значно зросло різноманіття гніздових видів мартинів і крячків. Нові види, що увійшли до складу гніздових угруповань в останні часи, пов'язані, передовсім, із штучними водоймами. Зокрема, великий баклан і жовтоногий мартин були знайдені на гніздуванні на Орельківському водосховищі, на відстані кількох кілометрів від долини Орелі (Надточий, Черников, 2015; Баник и др., 2016).

На даний час у нас немає відомостей про ймовірність розмноження у Приореллі 6 видів, які М.І.Гавриленко вважав гніздовими у перші десятиліття минулого століття, а саме шилохвоста (*Anas acuta*), звичайного погонича (*Porzana porzana*), погонича-крихітки (*Porzana pusilla*), лісового коловодника (*Tringa ochropus*), великого кульона (*Numenius arquata*) і степового дерихвоста (*Glaucolani nordmanni*). На початку 1980-тих років самців шилохвоста спостерігав наприкінці травня і на початку червня О.М.Гудина (2007). Гніздування великого кульона востаннє було зареєстроване у середній течії р. Орелі біля с. Чернеччина у 1936 р. (Кістяківський, 1957). Степовий дерихвіст був численним у 1960-ті роки (усн. повідомл. В.Л.Булахова). Зникнення цих трьох видів на гніздуванні не викликає сумнівів, але для остаточного з'ясування статусу решти необхідні додаткові дослідження. Це стосується як пастушкових, для пошуку яких слід застосовувати спеціальні методи, так і лісового коловодника, придатні для гніздування якого біотопи не обстежувались нами.

Сучасний стан угруповань водоплавних і водно-болотяних птахів Приорелля та зміни їх структури

За нашими даними, найчисленнішими видами водоплавних і водно-болотяних птахів у Приореллі у період 2000–2010-х років були лиска (середня щільність гніздування – 36,2 пари/км²), звичайний мартин (17,3), чорний крячок (11,7), велика чепура (*Egretta alba*) (6,7), крижень (*Anas platyrhynchos*) (4,5), кулик-довгоніг (4,5) і попелюх (4,3). Порівняння із даними О.М.Гудини (1995) свідчить про суттєве падіння чисельності більшості гніздових видів, а також про часткову зміну

домінантів у складі населення (табл. 2). Безперечно, значно зменшилася чисельність чорношиїї пірникози (*Podiceps nigricollis*), сірої гуски, чайки (*Vanellus vanellus*), мартинових птахів. Для чайки, зокрема, нами отримані неспростовні дані про достовірний негативний тренд змін чисельності у регіоні (Банік, 2016). Слід, щоправда, зауважити, що у даних для періоду 1970–80-х років показники чисельності для кількох видів найімовірніше, є завищеними. По-перше, вони були отримані для невеликого числа стаціонарів. По-друге, ці стаціонари закладалися в урочищах, де чисельність птахів була надвисокою: у місцях розташування колоній звичайного мартина і болотяних крячків, які приваблюють на гніздування багато інших видів водоплавних і водно-болотяних птахів (Гудина, 1995, 2007).

Таблиця 2.

Чисельність домінантів і звичайних видів в угрупованнях гніздових водоплавних і водно-болотяних птахів Приорелля у 1970–1980-ті та 2000–2010-ті роки

Вид	Чисельність, пар/км ²	
	1970–1980-ті роки (Гудина, 1995)	2000–2010-ті роки (наші дані)
<i>Podiceps nigricollis</i>	97	1
<i>Egretta alba</i>	15	7
<i>Ardea purpurea</i>	21	0,5
<i>Anser anser</i>	20	1
<i>Anas platyrhynchos</i>	–	5
<i>Aythya ferina</i>	9	4
<i>Fulica atra</i>	145	36
<i>Vanellus vanellus</i>	12	1
<i>Himantopus himantopus</i>	6	5
<i>Larus ridibundus</i>	230	17
<i>Chlidonias niger</i>	40	12
<i>Chlidonias leucopterus</i>	8	2
<i>Chlidonias hybrida</i>	65	3

Примітка: напівжирним шрифтом позначено види, які в обидва періоди були або домінантами, або звичайними видами в угрупованнях водоплавних і водно-болотяних птахів.

Порівняння представленості окремих трофічних груп серед домінантів населення та звичайних видів свідчить, що у 1970–80-ті роки, у фазу високої водності водойм, переважали твариноїдні види, зокрема ті, що здатні добувати безхребетних і хребетних тварин у воді (рис. 2). У цей час для структури угруповань водно-болотяних птахів середнього Приорелля характерним було чисельне переважання колоніальних видів ефемерних степових водойм – чорношиїї пірникози, звичайного мартина, білощокого і чорного крячків. З падінням рівню води у водоймах, яке тривало впродовж останніх двох десятиліть, структура угруповань водоплавних і водно-болотяних птахів у Приореллі змінилася. У наш час на тлі тривалих процесів заростання водойм у складі угруповань найповніше представлені групи споживачів водних рослин і частково рослиноїдних видів (качині і пастушки).

Загальні зміни складу і структури угруповань в останні десятиліття відбилися у суттєвому зменшенні чисельності пірникози, сірої гуски, куликів і болотяних крячків, а також у зникненні великих колоній звичайного мартина і чорношиїї пірникози, сірої і рудої чапель. Причини цих змін пов'язані із чинниками як природного, так і антропогенного походження. Період другої половини 1970-х років і першої половини 1980-х років характеризувався значним підвищенням річного стоку Орелі (Звіт про науково-дослідну роботу..., 2013), і тому у 1980-ті і у першій половині 1990-х років у водоймах Приорелля спостерігався високий рівень води. Це створювало сприятливі умови для гніздування чорношиїї пірникози, дрібних мартинових птахів і куликів. Падіння чисельності цих та інших видів в останні десятиліття, ймовірно, було пов'язане із зменшенням рівня наповненості водойм на тлі змін клімату, із відкладеними наслідками будівництва каналу Дніпро-Донбас та із зменшенням пасовищного навантаження в угіддях, що оточують водойми (Барановський та ін., 2013).

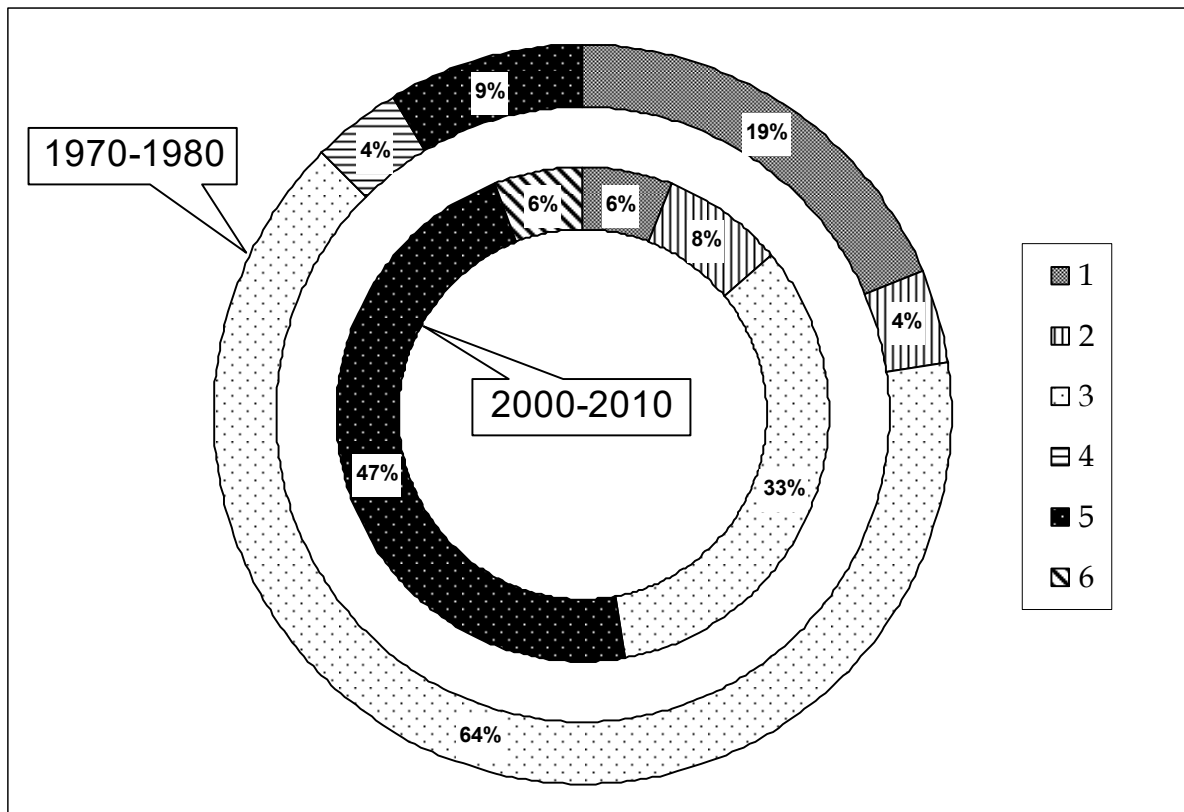


Рис. 2. Зміни представленості трофічних груп серед домінантів і звичайних видів в угрупованнях водоплавних і водно-болотяних птахів Приорелля

Умовні позначки: 1 – споживачі водних безхребетних у воді; 2 – споживачі водних хребетних та безхребетних у воді та/або на землі; 3 – споживачі водних та наземних безхребетних, водних та наземних хребетних у повітрі, у воді та/або на землі; 4 – споживачі зелених надземних частин трав'янистих рослин; 5 – споживачі водних рослин; 6 – споживачі водних та наземних безхребетних, зелених частин надземних та водних рослин та/або насіння у воді та на землі.

Значення Приорелля як осередку гніздування водоплавних і водно-болотяних птахів

Багатство Приорелля і долин інших лівих приток Дніпра на Дніпровській низовині водно-болотяними угіддями та, відповідно, водоплавними і водно-болотяними птахами пояснюється історією їх ландшафтів. Обриси долин лівих допливів Дніпра від Сули до Самари мають одну спільну рису – вони різко розширюються у напрямку від верхів'їв до пригирлових частин, а ширина палеорічищ згаданих долин прямо залежить від відстані до гирла (Пазинич, 2009а). Ширина пригирлових частин долин лівих допливів Дніпра, зокрема Ворскли, Орелі, Самари, говорить про те, що вони через незначну пропускну здатність Дніпрової долини у надпоріжжі і блокування стоку Дніпра заповнювалися його водами (Пазинич, 2009б). Знахідки озерних молюсків у стінці річища Орелі свідчать також, що у голоцені, приблизно 6 тисяч років тому, значна частина її долини перетворювалася на озеро (Пазинич, 2009а). Отже, маємо всі підстави припустити, що у долині Орелі, ймовірно неодноразово, річковий режим мінявся на озерний, що упродовж тривалого часу створювало привабливі умови для гніздування водоплавних і водно-болотяних птахів.

За даними М.І.Гавриленка (1929), на початку ХХ століття територія Приорелля мала особливе значення для гніздування малої та великої чепур, сірої гуски, попелюха, погонича-крихітки, степового дерихвоста, великого грицика (*Limosa limosa*), білокрилого крячка (*Chlidonias leucopterus*). Можна зазначити, що, попри значне погіршення стану водно-болотяних угідь долини Орелі в останні два десятиліття, вона лишається одним з найважливіших осередків гніздування

водоплавних і водно-болотних птахів у континентальній Україні, зокрема зберігає своє суттєве значення для популяції сірої гуски і попелюха (Banik et al., 2008; Fox et al., 2016).

Подяки

Автори дослідження висловлюють щирі подяки всім, хто брав участь в експедиціях і допомагав у проведенні обліків, а саме Р.І.Барабашу, Т.М.Дев'ятко, Г.Л.Гончарову, О.В.Коршунову, І.Мальцеву, Є.В.Скоробогатову.

Список літератури

- Банік М.В. Катастрофічний стан популяції чайки *Vanellus vanellus* у Харківській області // Troglodytes. Праці Західноукраїнського орнітол. товариства. – 2016. – Вип.7. Регіональна орнітофауністика: історія, сучасний стан та актуальність. – С. 130–139. /Banik M.V. Katastrofichnyy stan populyatsiyi chayki *Vanellus vanellus* u Kharkivs'kiy oblasti // Troglodytes. Pratsi Zakhidnoukrains'kogo ornitol. tovarystva. – 2016. – Vyp.7. Regional'na ornitofaunistyka: istoriya, suchasnyy stan ta aktual'nist'. – S. 130–139./
- Банік М.В., Атемасова Т.А., Атемасов А.А. и др. Восточный регион. Харьковская область // Большой баклан (*Phalacrocorax carbo*) в Украине: численность, территориальное распределение и их изменения / Под ред. В.А.Костюшина, П.И.Горлова и В.Д.Сиохина. – Киев, 2016. – С. 232–235. (Вестн. зоол. Отд. вып. №34. 2016). /Banik M.V., Atemasova T.A., Atemasov A.A. i dr. Vostochnyy region. Khar'kovskaya oblast' // Bol'shoi baklan (*Phalacrocorax carbo*) v Ukraine: chislennost', territorial'noye raspredeleniye i ikh izmeneniya / Pod red. V.A.Kostyushina, P.I.Gorlova i V.D.Siohina. – Kiev, 2016. – S. 232–235. (Vestn. zool. Otd. vyp. No. 34. 2016)./
- Банік М.В., Атемасов А.А. Опыт оценки уязвимости гнездящихся видов птиц Украины к изменениям климата // Бранта. – 2010. – Вып.13. – С. 9–20. /Banik M.V., Atemasov A.A. Opyt otsenki uyazvimosti gnezdyashihhsya vidov ptits Ukrainy k izmeneniyam klimata // Branta. – 2010. – Vyp.13. – S. 9–20./
- Банік М.В., Атемасов А.А., Гончаров Г.Л. та ін. Ключові водно-болотні угіддя Харківської області: сучасний стан та відповідність критеріям Рамсарської угоди // Заповідна справа в Україні. – 2013. – Т.19, вип.1. – С. 1–5. /Banik M.V., Atemasov A.A., Goncharov G.L. ta in. Klyuchovi vodno-bolotni ugiddya Kharkivs'koi oblasti: suchasnyy stan ta vidpovidnist' kryteriyam Ramsars'koi ugody // Zapovidna sprava v Ukraini. – 2013. – T.19, vyp.1. – S. 1–5./
- Банік М.В., Джамірзоев Г.С. К методике учета водоплавающих птиц по выводкам на крупных водоемах // Облік птахів: підходи, методики, результати (Зб. наук. статей другої міжнар. наук.-практ. конф.). – Житомир, 2004. – С. 31–34. /Banik M.V., Dzhampirzoyev G.S. K metodike ucheta vodoplavayushchikh ptits po vyvodkam na krupnykh vodoyemakh // Oblik ptakhiv: pidkhody, metodyky, rezul'taty (Zb. nauk. stately drugoi mizhnar. nauk.-prakt. konf.). – Zhytomyr, 2004. – S. 31–34./
- Банік М.В., Коршунов А.В. Наземные позвоночные украинской части бассейна Северского Донца: современное состояние, тенденции изменения численности и проблемы охраны // Вісн. Харківського нац. ун-ту імені В.Н.Каразіна. Сер. «Біологія». – 2014. – №1100, вип.20 – С. 91–103. /Banik M.V., Korshunov A.V. Nazemnyye pozvonochnyye ukrainskoy chasti basseyna Severskogo Dontsa: sovremennoye sostoyaniye, tendentsii izmeneniya chislennosti i problemy okhrany // Visn. Kharkivs'kogo nats. un-tu imeni V.N.Karazina. – Ser. «Biologiya». – 2014. – No. 1100, vyp.20. – S. 91–103./
- Барановський Б.О., Манюк В.В., Дем'янов В.В. та ін. Сучасний екологічний стан басейну річки Оріль у контексті створення національного природного парку «Приорільський» // Вісн. Дніпр. держ. аграрн. ун-ту. – 2013. – №2 (32). – С. 55–60. /Baranovskyy B.O., Manyuk V.V., Dem'yanov V.V. ta in. Suchasnyy ekologichnyy stan baseynu richky Oril' u konteksti stvorenniya natsional'nogo pryrodnogo parku «Pryoril's'kyy» // Visn. Dnopr. derzh. agrarn. un-tu. – 2013. – No. 2 (32). – S. 55–60./
- Булахов В.Л. Фауна куликов Днепродзержинского водохранилища и придаточных рек по левобережью // Фауна и экология куликов. Материалы совещ. Вып.2. – М.: МГУ, 1973. – С. 14–17. /Bulakhov V. L. Fauna kulikov Dneprodzerzhynskogo vodokhranilishha i pridatochnykh rek po levoberezh'yu // Fauna i ekologiya kulikov. Materialy soveshh. Vyp.2. – M.: MGU, 1973. – S. 14–17./
- Булахов В.Л., Мясоедова О.М. Колониальные поселения цапель Днепродзержинского и Запорожского водохранилищ // Колониальные гнездовья околоводных птиц и их охрана. – М.: Наука, Главн. редакция вост. лит-ры, 1975а. – С. 27–28. /Bulakhov V. L., Myasoyedova O. M. Kolonial'nyye poseleniya tsapel' Dneprodzerzhinskogo i Zaporozhskogo vodokhranilishh // Kolonial'nyye gnezdov'ya okolovodnykh ptits i ikh okhrana. – M.: Nauka, Glavn. redaktsiya vost. lit-ry, 1975a. – S. 27–28./
- Булахов В.Л., Мясоедова О.М. К характеристике колониальных поселений чаек на Днепродзержинском и Запорожском водохранилищах // Колониальные гнездовья околоводных птиц и их охрана. – М.: Наука, Главн. редакция вост. лит-ры, 1975б. – С. 60–61. /Bulakhov V.L., Myasoyedova O.M. K kharakteristike kolonial'nykh poseleniy chayek na Dneprodzerzhinskom i Zaporozhskom vodokhranilishchakh // Kolonial'nyye gnezdov'ya okolovodnykh ptits i ikh okhrana. – M.: Nauka, Glavn. redaktsiya vost. lit-ry, 1975b. – S. 60–61./

- Булахов В., Губкін А., Тарасенко С. та ін. Долина р. Оріль // ІВА-території України: території, важливі для збереження видового різноманіття та кількісного багатства птахів / За ред. О.Микитюка. – Київ: вид-во «СофтАРТ», 1999а. – С. 88–89. /Bulakhov V., Gubkin A., Tarasenko S. ta in. Dolyna r. Orii' // IBA-terytorii Ukrainy: terytorii, vazhlyvi dlya zberezhennya vydivogo riznomanittya ta kil'kisnogo bagatstva ptakhiv / Za red. O.Mykityuka. – Kyiv: vyd-vo «SoftART», 1999a. – S. 88–89./
- Булахов В., Губкін А., Обухова К., Чегорка П. Цибульківські озера // ІВА-території України: території, важливі для збереження видового різноманіття та кількісного багатства птахів / За ред. О.Микитюка. – Київ: вид-во «СофтАРТ», 1999б. – С. 78–79. /Bulakhov V., Gubkin A., Obukhova K., Chegorka P. Tsibul'kivs'ki ozera // IBA-terytorii Ukrainy: terytorii, vazhlyvi dlya zberezhennya vydivogo riznomanittya ta kil'kisnogo bagatstva ptakhiv / Za red. O.Mykityuka. – Kyiv: vyd-vo «SoftART», 1999b. – S. 78–79./
- Гавриленко Н. Предварительные сведения о птицах Полтавской губ. // Ежегодн. Музея Полтав. губ. земства. – 1917. – № 3–4 за 1914–1915 гг. – С. 55–95. /Gavrilenko N. Predvaritel'nyye svedeniya o ptitsakh Poltavskoy gub. // Ezhegodn. Muzeya Poltav. gub. zemstva. – 1917. – No. 3–4 za 1914–1915 gg. – S. 55–95./
- Гавриленко Н.І. Птицы Полтавщины. – Полтава: Издание Полтав. союза охотников, 1929. – 133с. /Gavrilenko N. I. Ptitsy Poltavshchiny. – Poltava: Izdaniye Poltav. soyuza okhotnikov, 1929. – 133s./
- Губкін А.А., Барабаш І.П. Серый гусь на Днепропетровщине // Фауна и биология гусеобразных птиц. – М.: Наука, 1977. – С. 54–55. /Gubkin A.A., Barabash I.P. Seryy gus' na Dnepropetrovshchине // Fauna i biologiya guseobraznykh ptits. – M.: Nauka, 1977. – S. 54–55./
- Гудина А.Н. Пойма Орели – резерват водоплавающих птиц // Соврем. состояние ресурсов водоплавающих птиц. – М.: Наука, 1984. – С. 55–56. /Gudina A. N. Poyma Oreli – rezervat vodoplavayushchikh ptits // Sovrem. sostoyaniye resursov vodoplavayushchikh ptits. – M.: Nauka, 1984. – S. 55–56./
- Гудина А.Н. Сохранить уникальные орнитокомплексы озёр бассейна Орели // Проблемы сохранения разнообразия природы степных и лесостепных регионов (Мат. Росс.-Укр. научн. конф., посвящ. 60-летию Центрально-Чернозёмного заповедника). – М.: КМК Scientific Press Ltd., 1995. – С. 198–199. /Gudina A.N. Sokhranit' unikal'nyye ornitokompleksy ozyor basseyna Oreli // Problemy sokhraneniya raznoobraziya prirody stepnykh i lesostepnykh regionov (Mat. Ross.-Ukr. nauchn. konf., posvyashch. 60-letiyu Tsentral'no-Chernozomyomnogo zapovednika). – M.: KMK Scientific Press Ltd., 1995. – S. 198–199./
- Гудина А.Н. Редкие и малоизученные птицы Восточной Украины. Т.1. (Gaviiformes – Galliformes). Изд. 2-е, испр. и доп. – Запорожье: Днепропетровский металлург, 2007. – 232с. /Gudina A.N. Redkiye i maloizuchennyye ptitsy Vostochnoy Ukrainy. T.1. (Gaviiformes – Galliformes). Izd. 2-ye, ispr. i dop. – Zaporozh'ye: Dneprovskiy metallurg, 2007. – 232s./
- Звіт про науково-дослідну роботу «Проведення просторового аналізу змін водного режиму басейнів поверхневих водних об'єктів на території України внаслідок зміни клімату». – К.: Український гідрометеорологічний інститут, 2013. – 228с. (<http://uhmi.org.ua/project/rvndr/avr.pdf>) /Zvit pro naukovodoslidnu robotu «Provedennya prostorovogo analizu zmin vodnogo rezhimu baseyniv poverkhnivykh vodnykh ob'yektiv na terytorii Ukrainy vnaslidok zminy klimatu». – K.: Ukrayins'kyi gidrometeorologichnyy instytut, 2013. – 228s./
- Кесслер К. Птицы голенастые и водяные. IV. Птицы голенастые // Труды Комиссии, высочайше учрежденной, при Императорском университете Св. Владимира для описания губерний Киевского учебного округа: Подольской, Волынской, Киевской, Черниговской и Полтавской. Т.II. – Киев: Унив. тип., 1853. – С. 1–101. /Kessler K. Ptitsy golenastyye i vodyanyye. IV. Ptitsy golenastyye // Trudy Komissii, vysochayshe uchrezhdyonnoy, pri Imperatorskom universitete Sv. Vladimira dlya opisaniya guberniy Kievskogo uchebnogo okruga: Podol'skoy, Volynskoy, Kievskoy, Chernigovskoy i Poltavskoy. T.II. – Kiev: Univ. tip., 1853. – S. 1–101./
- Кістяківський О.Б. Фауна України в сорока томах. Т.4. Птахи. Загальна характеристика птахів. Курні. Голуби. Рябки. Пастушки. Журавлі. Дрофи. Кулики. Мартини. – Київ: Вид-во АН УРСР, 1957. – 432с. /Kisijakivs'kiy O. B. Fauna Ukrainy v soroka tomakh. T.4. Ptakhy. Zagal'na kharakterystyka ptakhiv. Kurni. Goluby. Ryabky. Pastushky. Zhuravlii. Drofy. Kulyky. Martyny. – Kyiv: Vyd-vo AN URSR, 1957. – 432s./
- Кузякин А.П. Зоогеография СССР // Уч. зап. Моск. обл. пед. ин-та. – 1962. – Т.109, вып.1. Биogeография. – С. 3–182. /Kuzyakin A. P. Zoogeografiya SSSR // Uch. zap. Mosk. obl. ped. in-ta. – 1962. – T.109, vyp.1. Biogeografiya. – S. 3–182./
- Лисецкий А.С., Кривицкий И.А., Ведмедеря В.И. и др. Урочище «Орчик» – уникальный фаунистический комплекс Харьковщины // Вестн. Харьк. ун-та. – 1982. – №226. Новые исследования по возрастной физиологии и биохимии, природе гетерозиса и экологии животных. – С. 86–91. /Lisetskiy A.S., Krivitskiy I.A., Vedmederya V.I. i dr. Urochishche «Orchik» – unikal'nyy faunisticheskiy kompleks Khar'kovshchiny // Vestn. Khar'k. un-ta. – 1982. – No. 226. Novye issledovaniya po vozrastnoy fiziologii i biokhimii, prirode heterozisa i ekologii zhivotnykh. – S. 86–91./
- Надточий А.С., Черников В.Ф. Гнездование хохотуны (*Larus cachinnans* Pall.) в Харьковской области // Бранта. – 2015. – Вып.18. – С. 140–146. /Nadtochiy A.S., Chernikov V.F. Gnezdovaniye khokhotun'i (*Larus cachinnans* Pall.) v Khar'kovskoy oblasti // Branta. – 2015. – Vyp.18. – S. 140–146./

- Пазинич В.Г. До проблеми генетично-вікових визначень утворень долинно-терасового комплексу басейну середнього Дніпра // Фіз. географія та геоморфологія – 2009а. – Вип.56. – С. 230–238. /Pazinich V. G. Do problemy genetychno-vikovykh vyznachen' utvoren' dolynno-terasovogo kompleksu baseynu seredn'ogo Dnipra // Fiz. geografiya ta geomorfologiya – 2009a. – Vyp.56. – S. 230–238./
- Пазинич В.Г. До проблеми походження Самарської луки // Гідрологія, гідрохімія і гідроекологія. – 2009б. – Т.17. – С. 229–232. /Pazinich V.G. Do problemy pokhodzhennya Samars'koyi luki // Hidrologiya, gidrokhimiya i gidroekologiya. – 2009b. – T.17. – S. 229–232./
- Сомов Н.Н. Орнитологическая фауна Харьковской губернии. – Харьков: Тип. А.Дарре, 1897. – 689с. /Somov N. N. Ornitologicheskaya fauna Khar'kovskoy gubernii. – Khar'kov: Tip. A.Darre, 1897. – 689s./
- Чернай А. Фауна Харьковской губернии и прилежащих к ней мест составленная, преимущественно по наблюдениям сделанным во время учёной экспедиции, совершённой в 1848 и 1849 годах Э. О. профессором А.Чернаем. Выпуск II. Фауна млекопитающих и птиц. – Харьков: Унив. тип., 1853. – 44с. /Chernay A. Fauna Khar'kovskoy gubernii i prilozhashhikh k ney mest sostavlyennaya, preimushhestvenno po nablyudeniym sdelannym vo vremya uchyonoy ekspeditsii, sovershyonnoy v 1848 i 1849 godakh E. O. professorom A.Chernayem. Vypusk II. Fauna mlekopitayushchikh i ptits. – Khar'kov: Univ. tip., 1853. – 44s./
- Banik M.V., Nadtochiy A.S., Vergeles Y.I. The status of the Greylag Goose *Anser anser* breeding population in the Kharkiv region, Ukraine // Vogelwelt. – 2008. – Bd.129. – S. 360–362.
- Dzubin A. Pairing display and spring and summer flights of the Mallard // Blue jay. – 1957. – Vol.15. – P. 10–13.
- Dzubin A. Assessing breeding populations of ducks by ground counts // Saskatoon Wetlands Seminar. Canadian Wildlife Service Report Series. – 1969. – No. 6. – P. 178–237.
- Fox A.D., Caizergues A., Banik M.V. et al. Recent changes in the abundance of Common Pochard *Aythya ferina* breeding in Europe // Wildfowl. – 2016. – Vol.66. – P. 22–40, S1–S33.
- Inventory Methods for Waterfowl and Allied Species: Loons, Grebes, Swans, Geese, Ducks, American Coot and Sandhill Crane. Standards for Components of British Columbia's Biodiversity No. 18. – Resources Inventory Committee of the Province of British Columbia, 1999. – 90p.
- McKinney F. Spacing and chasing in breeding ducks // Wildfowl. – 1965. – Vol.16. – P. 92–106.

Представлено: М.Н.Гаврилюк / Presented by: M.N.Gavrilyuk
Рецензент: Т.А.Атемасова / Reviewer: T.A.Atemasova
Подано до редакції / Received: 04.11.2017

УДК: 577.1(262.5)

Добова динаміка просторового розподілу рухливих безхребетних угруповання обростання Одеської затоки Чорного моря
О.Ю.Варігін*Інститут морської біології НАН України (Одеса, Україна)*
sealife_1@email.ua

Показана добова мінливість кількісних показників чотирьох масових видів рухомих безхребетних на різній глибині в межах угруповання обростання берегоукріплювальних споруд Одеської затоки Чорного моря. В якості модельних об'єктів для дослідження обрані два види еррантних поліхет *Platynereis dumerilii* (Audouin et M.-Ed., 1834) і *Nereis zonata* Malmgren, 1867, і два види рівноногих ракоподібних *Lekanesphaera monodi* (Arcangeli, 1934) і *Idotea balthica basteri* (Pallas, 1772). Відзначено протилежний характер зміни кількісних параметрів поліхет і ракоподібних протягом доби на різних горизонтах угруповання обростання. У денний час чисельність поліхет була максимальна на нижньому горизонті угруповання на глибині 2 м. Максимальні кількісні параметри ракоподібних були відзначені в кінці світлового дня в межах верхнього горизонту угруповання на глибині 0,5 м. Протягом доби більша частина ракоподібних була зосереджена в межах верхнього горизонту угруповання, а поліхет – нижнього. Відзначено, що добова мінливість просторового розподілу поліхет і ракоподібних в межах угруповання обростання Одеської затоки зв'язана з їх харчовою поведінкою. Розглянуто розподіл молоді та дорослих тварин на різних горизонтах угруповання обростання в світлий і темний час доби.

Ключові слова: угруповання обростання, рухливі безхребетні, добова динаміка, Одеська затока, Чорне море.

Daily dynamics of the spatial distribution of mobile invertebrates in the fouling community of the Odessa Bay, Black Sea
A.Yu.Varigin

The daily variability of the quantitative indices of four mass species of mobile invertebrates at different depths within the fouling community of the shore protection structures of the Odessa Bay, Black Sea was shown. Two species of errant polychaetes *Platynereis dumerilii* (Audouin et M.-Ed., 1834) and *Nereis zonata* Malmgren, 1867 and two species of isopod crustaceans *Lekanesphaera monodi* (Arcangeli, 1934) and *Idotea balthica basteri* (Pallas, 1772) were selected as model objects for the study. The opposite character of the change in the quantitative parameters of polychaetes and crustaceans during the day on different horizons of the community was noted. In the daytime the abundance of polychaetes was maximal on the lower horizon of the community at a depth of 2 m. The maximum quantitative parameters of crustaceans were noted at the end of daylight hours on the upper horizon of the community at a depth of 0.5 m. During the day most of the crustaceans were concentrated on the upper horizon, and polychaetes – the lower one. It was noted that daily variability of the spatial distribution of invertebrates within the fouling community was related to their trophic behavior. The distribution of juveniles and adult animals on different horizons during the light and dark hours of the day was considered.

Key words: fouling community, mobile invertebrates, daily dynamics, Odessa Bay, Black Sea.

Суточная динамика пространственного распределения подвижных беспозвоночных сообщества обрастания Одесского залива Черного моря
А.Ю.Варигин

Показана суточная изменчивость количественных показателей четырех массовых видов подвижных беспозвоночных на разной глубине в пределах сообщества обрастания берегоукрепительных сооружений Одесского залива Черного моря. В качестве модельных объектов для исследования выбраны два вида эррантных полихет *Platynereis dumerilii* (Audouin et M.-Ed., 1834) и *Nereis zonata* Malmgren, 1867, и два вида равноногих ракообразных *Lekanesphaera monodi* (Arcangeli, 1934) и *Idotea balthica basteri* (Pallas, 1772). Отмечен противоположный характер изменения количественных параметров полихет и ракообразных в течение суток на разных горизонтах сообщества обрастания. В дневное время численность полихет была максимальна на нижнем горизонте сообщества на глубине 2 м. Максимальные количественные параметры ракообразных были отмечены в конце светового дня в пределах верхнего горизонта сообщества на глубине 0,5 м. В течение суток большая часть

ракообразных была сосредоточена в пределах верхнего горизонта сообщества, а полихет – нижнего. Отмечено, что суточная изменчивость пространственного распределения полихет и ракообразных в пределах сообщества обрастания Одесского залива связана с их пищевым поведением. Рассмотрено распределение молодежи и взрослых животных на разных горизонтах сообщества обрастания в светлое и темное время суток.

Ключевые слова: сообщество обрастания, подвижные беспозвоночные, суточная динамика, Одесский залив, Черное море.

Введение

Известно, что в прибрежной зоне Черного моря, расположенной от уреза воды до глубины 5 м, биологическое разнообразие, численность и биомасса растений и животных по крайней мере вдвое превышают таковые для организмов, обитающих на большей глубине (Zaitsev, 2006). Причем одним из наиболее продуктивных морских сообществ, развивающихся здесь на твердом субстрате, является сообщество обрастания, играющее существенную роль в процессах обмена вещества и энергии в прибрежной зоне Черного моря (Александров, 2008). При этом данное сообщество не обладает уникальным видовым составом, в связи с чем обычно не рассматривается как самостоятельная экологическая группировка такого же ранга, как, например, бентос (Халаман, 2009). Все организмы, входящие в состав сообщества обрастания, обычно в той или иной степени представлены в бентосе близлежащего района моря. Однако условия обитания на твердом субстрате, приподнятом над дном, для этих видов более благоприятны, что существенно отражается на их количественных показателях, значительно превышающих таковые у тех же организмов в донных поселениях (Раилкин, 1998).

Основу сообщества обрастания составляют прикрепленные животные, в первую очередь двусторчатые моллюски *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819. Среди подвижных организмов сообщества выделяются бентопелагические беспозвоночные, для которых в течение суток характерны регулярные вертикальные миграции (Анохина, 2013). Эти виды, относящиеся, в основном, к ракообразным и многощетинковым червям, обитают также и в зарослевых сообществах (Маккавеева, 1979; Taylor, 1998). Причем на разных участках макрофитов в светлое и темное время суток изменяется не только их количество, но и размерный состав (Маккавеева и др., 1993).

Суточные вертикальные миграции бентопелагических животных отмечены не только в Черном море (Апоkhina, 2005), но и в других морях, например в Азовском (Грезе, 1965; Закутский, 1965а, б), Балтийском (Jansson, Kallander, 1968), а также у побережья Мексиканского залива (Stearns, Dardeau, 1990). Все эти работы посвящены изучению миграционного поведения животных, днем обитающих на дне, а ночью поднимающихся к поверхности моря. Сведения о подобном поведении организмов, входящих в состав прибрежного сообщества обрастания, крайне малочисленны. Целью работы было определение суточной динамики количественных показателей массовых подвижных беспозвоночных на разной глубине в пределах сообщества обрастания Одесского залива Черного моря.

Объекты и методы исследования

Материалом для работы послужили пробы, взятые в мае 2015 г. на вертикальной подводной поверхности берегозащитных сооружений, расположенных в прибрежной зоне Одесского залива. Глубина у стенки этих сооружений не превышала 2,5 м. Пробы отбирали с двух горизонтов, отстоящих от поверхности на 0,5 и 2,0 м. Отбор производили четыре раза в сутки: в полночь, на восходе Солнца, в полдень и на закате Солнца. Материал собирали с помощью металлической рамки, размером 20×20 см, обтянутой мельничным газом. Содержимое каждой рамки промывали через систему почвенных сит с минимальным размером ячеи 0,5 мм. Отобранных беспозвоночных идентифицировали, подсчитывали, измеряли их длину с точностью 0,1 мм и массу (предварительно обсушив животных на фильтровальной бумаге) с точностью 0,001 г. При описании динамики количественных параметров беспозвоночных использовали общепринятые показатели численности (N) экз.·м⁻² и биомассы (B) г·м⁻².

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований в сообществе обрастания Одесского залива было обнаружено 37 видов беспозвоночных, принадлежащих к следующим таксонам: Anthozoa – 1 вид, Polychaeta – 8, Cirripedia – 1, Decapoda – 5, Isopoda – 3, Amphipoda – 7, Gastropoda – 4, Bivalvia – 6, Chironomidae – 2. Основу сообщества составляли прикрепленные организмы, среди которых

максимальними кількісними параметрами отличались двустворчатые моллюски *M. galloprovincialis* и *Mytilaster lineatus* (Gmelin, 1791).

Среди подвижных обитателей сообщества обрастания самыми массовыми видами со стопроцентной встречаемостью были многощетинковые черви *Platynereis dumerilii* и *Nereis zonata*, а также равноногие ракообразные *Lekanesphaera monodi* и *Idotea balthica basteri*. Эти представители сообщества обрастания получили массовое развитие не только в пределах мелководной северо-западной части Черного моря (Воробьева, Синегуб, 2000), но и у берегов Крыма (Гринцов, Мурина, 2002, Лисицкая, 2012) и Кавказа (Яхонтова, 2008). Кроме того, эти беспозвоночные в силу своего анатомического строения хорошо приспособлены к активному передвижению в толще воды. Так, *P. dumerilii* и *N. zonata* могут преодолевать значительные расстояния за счет волнообразных движений тела. Эта способность наиболее ярко проявляется у них во время размножения (Киселева, 2004).

У двух видов равноногих ракообразных хорошо развит локомоторный аппарат, позволяющий им быстро перемещаться в воде. Так, *I. balthica basteri* могут плавать со скоростью до 22 см·сек⁻¹ за счет интенсивного биения плеоподов (Хмелева, 1973). Другой вид *L. monodi* передвигается немного медленнее из-за менее обтекаемой формы тела (Куракин, 1979). В связи с выше изложенным эти четыре вида были выбраны в качестве модельных объектов для изучения суточной изменчивости количественных показателей подвижных беспозвоночных на разной глубине в пределах сообщества обрастания Одесского залива Черного моря.

Наиболее многочисленным представителем эррантных полихет в сообществе был *P. dumerilii*. Максимальная численность этого вида была отмечена в дневное время суток на глубине 2 м. Так, в полдень она достигала 4800 экз./м², затем ближе к закату Солнца снижалась более чем вдвое, оставаясь примерно на этом же уровне в течение всего темного времени суток. При этом в полдень в пределах нижнего горизонта было сосредоточено примерно в 8 раз больше экземпляров *P. dumerilii*, чем на уровне верхнего. В полночь эта разница сокращалась до двух раз (рис. 1).

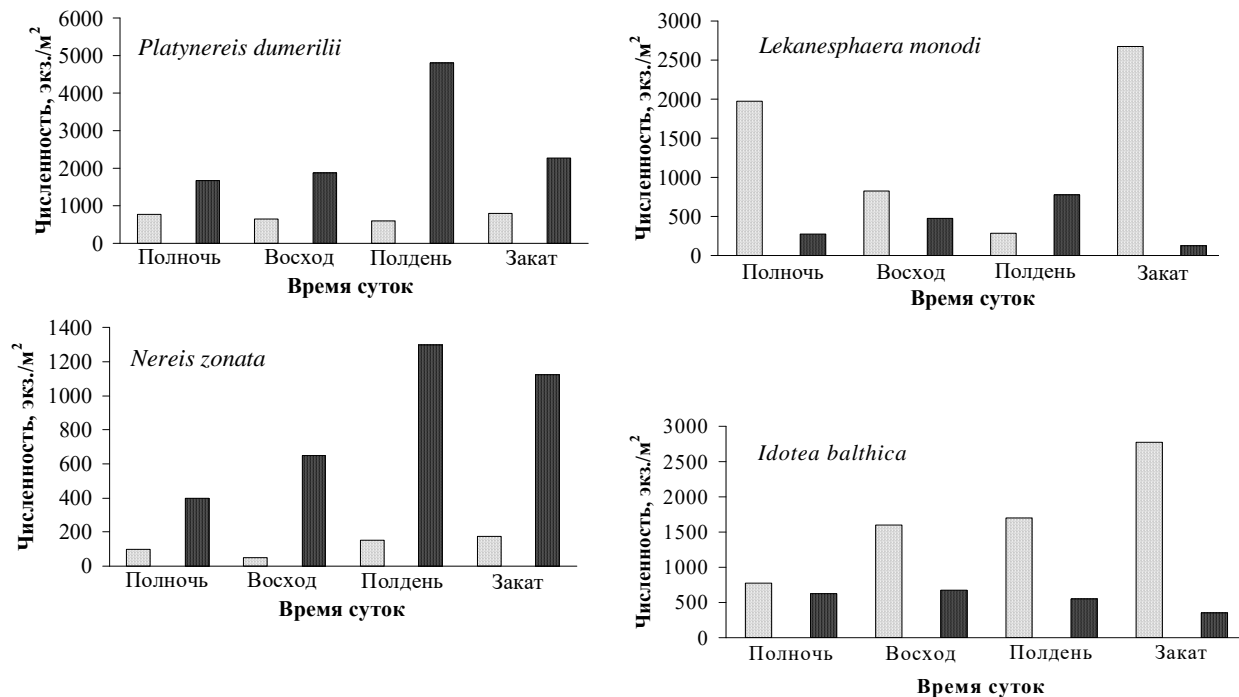


Рис. 1. Суточная динамика численности массовых подвижных беспозвоночных сообщества обрастания Одесского залива на глубине 0,5 м (светлая штриховка) и 2,0 м (темная штриховка)

Суточная динамика биомассы подвижных видов сообщества обрастания зависит не только от изменения количества особей, но и от их размеров. Удобным показателем, характеризующим размерную и, соответственно, возрастную структуру популяции подвижных беспозвоночных,

является средняя масса особи. В период массового преобладания в популяции молодых особей этот показатель снижается, а при количественном превосходстве взрослых – повышается (Заика, 1983).

Анализ суточной изменчивости биомассы и средней массы особи *P. dumerilii* показал, что в светлое время суток в пределах нижнего горизонта сообщества находилась в основном молодь полихет. В начале светового дня биомасса *P. dumerilii* на глубине 2 м достигала суточного минимума и составляла 16,1 г·м⁻². В полдень этот показатель возрастал до 28,9 г·м⁻². При этом средняя масса особи колебалась от 0,006 до 0,008 г, что также составляло суточный минимум. В темный период суток биомасса этого вида на обоих исследованных горизонтах возрастала в основном за счет взрослых особей. Причем более интенсивно этот процесс протекал в верхнем горизонте сообщества обрастания. Так, на глубине 2 м в конце светового дня по сравнению с предыдущим периодом биомасса *P. dumerilii* увеличивалась лишь на 15%, а на глубине 0,5 м – в 2,4 раза. Средняя масса особи достигала своего максимума в темный период суток, составляя от 0,014 до 0,016 г (рис. 2).

Другой изученный вид эррантных полихет *N. zonata* был представлен в сообществе обрастания не так обильно, как *P. dumerilii*. Максимальная численность его была ниже в 3,7 раза, а биомасса – почти вдвое. Однако характер суточной изменчивости количественных показателей у этих видов на разных горизонтах сообщества обрастания Одесского залива в общих чертах совпадал. Так, наибольшие показатели численности для *N. zonata* также зафиксированы в дневное время суток на нижнем горизонте сообщества. В полдень численность этого вида составляла 1300 экз.·м⁻², снижаясь к полуночи более чем в три раза. При этом в пределах нижнего горизонта было сосредоточено примерно в 9 раз больше экземпляров *N. zonata*, чем на уровне верхнего (рис. 1). Биомасса этого вида на глубине 2 м в начале светового дня составляла 3,35 г·м⁻², достигая в полдень 10,15 г·м⁻² и увеличиваясь к вечеру до 16,75 г·м⁻². При этом средняя масса особи на нижнем горизонте сообщества в светлое время суток была вдвое ниже, чем в темное (рис. 2).

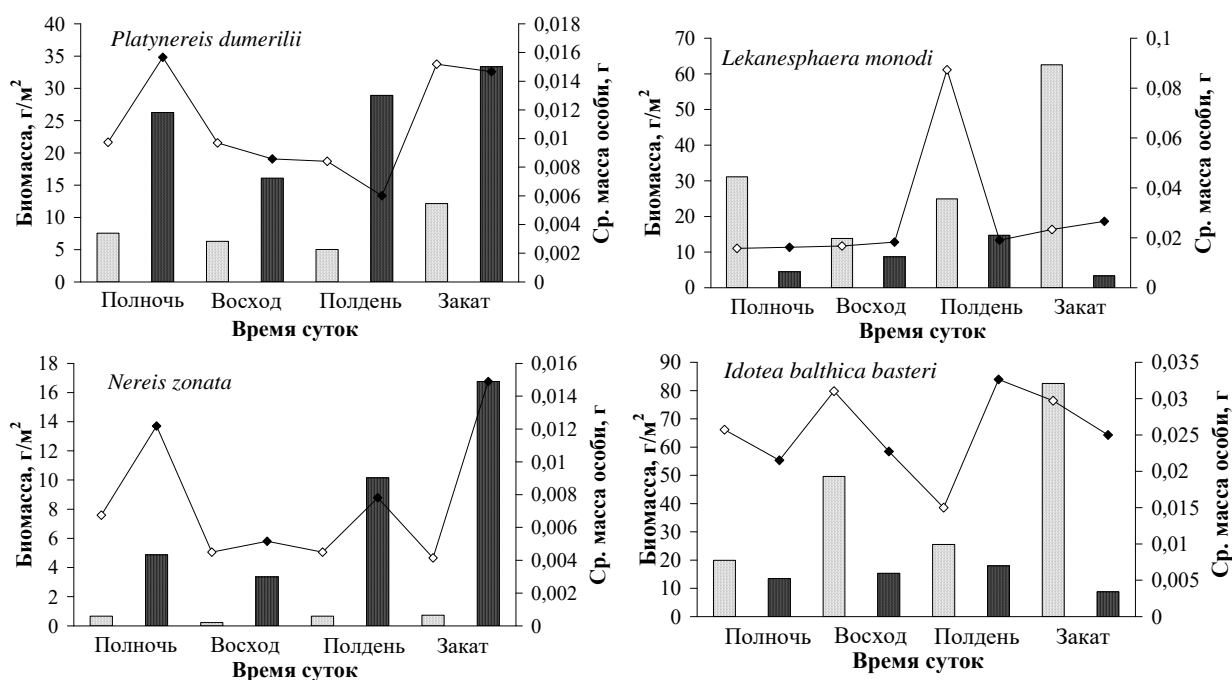


Рис. 2. Суточная динамика биомассы (столбцы) и средней массы особи (ромбы) массовых подвижных беспозвоночных сообщества обрастания Одесского залива на глубине 0,5 м (светлая штриховка) и 2,0 м (темная штриховка)

Таким образом, в светлое время суток на глубине 2 м, как и в случае *P. dumerilii*, в основном были сосредоточены молодые особи *N. zonata*, а в темное – взрослые. Однако на глубине 0,5 м во все изученные периоды находились молодые особи *N. zonata*, средняя масса которых составляла 0,004–0,006 г (рис. 2).

Суточная динамика пространственного распределения равноногих ракообразных на разных горизонтах сообщества обрастания носила несколько иной характер. В темное время суток максимальная численность *L. monodi* была отмечена на глубине 0,5 м. В конце светового дня численность этого вида в пределах верхнего горизонта сообщества достигала 2675 экз.·м⁻², что на порядок выше, чем на глубине 2 м. Такой же характер соотношения численности на разных горизонтах зафиксирован в полночь и на рассвете. В дневное время отмечена противоположная тенденция распределения этих ракообразных. В полдень их численность на нижнем горизонте была 775 экз.·м⁻², а на верхнем – 285 экз.·м⁻² (рис. 1). При этом биомасса *L. monodi* в ночное время возрастала в соответствии с изменением численности. Однако в дневное время это соотношение нарушалось. Так, в полдень численность этого вида в пределах верхнего горизонта была в 2,7 раза ниже, чем на глубине 2 м, а биомасса, наоборот – в 1,7 раза выше (рис. 2). Таким образом, в полуденное время суток в верхнем горизонте сообщества обрастания были сосредоточены взрослые особи *L. monodi*, средняя масса которых составляла 0,09 г. В остальные изученные периоды этот показатель колебался в пределах от 0,016 до 0,026 г.

Другой вид ракообразных *I. balthica basteri* проявлял в дневное время противоположный характер распределения молоди и взрослых особей на разных горизонтах сообщества. В полдень в пределах верхнего горизонта были сосредоточены молодые экземпляры этого вида, средняя масса которых составляла 0,015 г, а на глубине 2 м – взрослые особи со средней массой 0,032 г. В ночное время ближе к поверхности поднимались в основном взрослые представители *I. balthica basteri* (рис. 2). Численность этого вида, так же как и *L. monodi*, была максимальна в конце светового дня в пределах верхнего горизонта сообщества обрастания и составляла 2775 экз.·м⁻² (рис. 1).

Суточная изменчивость пространственного распределения полихет и ракообразных в пределах сообщества обрастания, по-видимому, связана с их пищевым поведением. По способу питания эти беспозвоночные являются полифагами. При этом полихеты для обнаружения пищевых объектов используют, в основном, органы хеморецепции, расположенные на пальцах и брюшных усиках. Глаза у них слабо развиты и представляют собой лишь светочувствительные органы (Киселева, 2004). Ракообразные в поисках пищи больше используют хорошо развитые сложные фасеточные глаза (Кусакин, 1979). Таким образом, для обнаружения и захвата пищи эти беспозвоночные нуждаются в разной степени освещенности водной толщи. В связи с этим в течение суток ракообразные предпочитают, в основном, держаться в верхнем горизонте сообщества, а полихеты – в нижнем.

Выводы

Анализ суточной динамики пространственного распределения четырех массовых видов подвижных беспозвоночных в пределах сообщества Одесского залива Черного моря показал, что их количественные параметры изменяются на разной глубине в зависимости от времени суток и степени освещенности водной толщи. В дневное время численность полихет *P. dumerilii* и *N. zonata* была максимальна на нижнем горизонте сообщества, в основном, за счет молодых особей. В темный период суток биомасса этих видов наиболее интенсивно возрастала на глубине 2 м, куда устремлялись взрослые животные. Суточная динамика распределения ракообразных носила несколько иной характер. Если полихеты в течение суток были сосредоточены, в основном, в нижнем горизонте сообщества, то ракообразные – в верхнем. Максимальные количественные параметры изопод *L. monodi* и *I. balthica basteri* были отмечены в конце светового дня в пределах верхнего горизонта сообщества. В полуденное время на глубине 0,5 м *L. monodi* были представлены взрослыми особями, а *I. balthica basteri* – молодыми.

Список литературы

- Александров Б.Г. Гидробиологические основы управления состоянием прибрежных экосистем Черного моря. – Киев: Наук. думка, 2008. – 343с. /Aleksandrov B.G. Hidrobiologicheskiye osnovy upravleniya sostoyaniyem pribrezhnykh ekosistem Chernogo morya. – Kiev: Nauk. dumka, 2008. – 343s./
- Анохина Л.Л. Состав, динамика численности и биомассы беспозвоночных бентопелагических животных и их роль в прибрежной экосистеме Черного моря (на примере Голубой бухты). Автореф. дис... канд. биол. наук. – М, 2013. – 25с. /Anokhina L.L. Sostav, dinamika chislennosti i biomassy bespozvonochnykh bentopelagicheskikh zhivotnykh i ikh rol' v pribrezhnoy ekosisteme Chernogo morya (na primere Goluboy bukhty). Avtoref. dis... kand. biol. nauk. – M, 2013. – 25s./
- Воробьева Л.В., Синегуб И.А. Структура и количественные показатели зообентоса обрастания берегоукрепительных сооружений у берегов Одессы // Глобальная система наблюдений Черного моря: фундаментальные и прикладные аспекты. – Севастополь, 2000. – С. 132–137. /Vorob'eva L.V.,

- Sinegub I.A. Struktura i kolichestvennyye pokazateli zoobentosa obrastaniya beregoukrepitel'nykh sooruzheniy u beregov Odessy // Global'naya sistema nablyudeniya Chernogo morya: fundamental'nyye i prikladnyye aspekty. – Sevastopol', 2000. – S. 132–137./
- Грезе И.И. О суточных вертикальных миграциях некоторых бокоплавов в Черном и Азовском морях // Бентос. – Киев: Наук. думка, 1965. – С. 9–14. /Greze I.I. O sutochnykh vertikal'nykh migratsiyakh nekotorykh bokoplavov v Chernom i Azovskom moryakh // Bentos. – Kiev: Nauk. dumka, 1965. – S. 9–14./
- Гринцов В.А., Мурина В.В. Некоторые вопросы экологии полихет – обитателей искусственного рифа прибрежного района Севастополя // Экология моря. – 2002. – Вып.61. – С. 45–48. /Grintsov V.A., Murina V.V. Nekotoryye voprosy ekologii polikhet – obitateley iskusstvennogo rifa pribrezhnogo rayona Sevastopolya // Ekologiya morya. – 2002. – Vyp.61. – S. 45–48./
- Заика В.Е. Сравнительная продуктивность гидробионтов. – Киев: Наук. думка, 1983. – 208с. /Zaika V.Ye. Sravnitel'naya produktivnost' gidrobiontov. – Kiev: Nauk. dumka, 1983. – 208s./
- Закутский В.П. К изучению вертикальных миграций некоторых бентических и нектобентических организмов Жебриянской бухты и акватории порта г. Геническ // Гидробиол. журн. – 1965а. – Т.1, №4. – С. 63–67. /Zakutskiy V.P. K izucheniyu vertikal'nykh migratsiy nekotorykh benticheskikh i nektobenticheskikh organizmov Zhebriyanskoj bukhty i akvatorii porta g. Genichesk // Gidrobiol. zhurn. – 1965a. – T.1, no. 4. – S. 63–67./
- Закутский В.П. О концентрации некоторых донных и придонных организмов в приповерхностном слое Черного и Азовского морей // Океанология. – 1965б. – Т.5, №3. – С. 495–497. /Zakutskiy V.P. O kontsentratsii nekotorykh donnykh i pridonnykh organizmov v pripoverkhnostnom sloye Chernogo i Azovskogo morey // Okeanologiya. – 1965b. – T.5, no. 3. – S. 495–497./
- Киселева М.И. Многощетинковые черви (Polychaeta) Черного и Азовского морей. – Апатиты, 2004. – 409с. /Kiseleva M.I. Mnogoshhetinkovyye chervi (Polychaeta) Chernogo i Azovskogo morey. – Apatity, 2004. – 409s./
- Кусакин О.Г. Морские и солоноватоводные равноногие ракообразные (Isopoda) холодных и умеренных вод северного полушария. Подотряд Flabellifera. – Л.: Наука, 1979. – 742с. /Kusakin O.G. Morskiye i solonovatovodnyye ravnogoye rakoobraznyye (Isopoda) kholodnykh i umerennykh vod severnogo polushariya. Podotryad Flabellifera. – L.: Nauka, 1979. – 742s./
- Лисицкая Е.В. Видовое разнообразие Polychaeta в обрастании мидийных коллекторов (Крым, Черное море) // Современные рыбохозяйственные и экологические проблемы Азово-Черноморского региона: Материалы VII Междунар. конф. – Керчь: ЮГНИРО, 2012. – Т.2. – С. 104–106. /Lisitskaya E.V. Vidovoye raznoobrazie Polychaeta v obrastanii midiynykh kollektorov (Krym, Chernoye more) // Sovremennyye rybokhozyaystvennyye i ekologicheskiye problemy Azovo-Chernomorskogo regiona: Materialy VII Mezhdunar. konf. – Kerch': JugNIRO, 2012. – T.2. – S. 104–106./
- Маккавеева Е.Б. Беспозвоночные зарослей макрофитов Черного моря. – Киев: Наук. думка, 1979. – 228с. /Makkaveyeva Ye.B. Bespozvonochnyye zarosley makrofitov Chernogo morya. – Kiev: Nauk. dumka, 1979. – 228s./
- Маккавеева Е.Б., Мусихина Г.Б., Просвиоров Ю.В. и др. Особенности распределения ракообразных и полихет на цистозире в прибрежной зоне Черного моря // Экология моря. – 1993. – Вып.44. – С. 42–45. /Makkaveyeva Ye.B., Musikhina G.B., Prosvirov Yu.V. i dr. Osobennosti raspredeleniya rakoobraznykh i polikhet na tsistozire v pribrezhnoy zone Chernogo morya // Ekologiya morya. – 1993. – Vyp.44. – S. 42–45./
- Раилкин А.И. Процессы колонизации и защита от биообрастания. – СПб.: Изд-во С.-Петербург. ун-та, 1998. – 271с. /Raikin A.I. Processy kolonizatsii i zashhita ot bioobrastaniya. – SPb.: Izd-vo S.-Peterburg. un-ta, 1998. – 271s./
- Халаман В.В. Обрастания: терминология и определения // Журн. общ. биол. – 2009. – Т.70, №6. – С. 495–503. /Khalaman V.V. Obrastaniya: terminologiya i opredeleniya // Zhurn. obshh. biol. – 2009. – T.70, no. 6. – S. 495–503./
- Хмелева Н.Н. Биология и энергетический баланс морских равноногих ракообразных (Idotea baltica basteri). – Киев: Наук. думка, 1973. – 183с. /Khmeleva N.N. Biologiya i energeticheskiy balans morskikh ravnogogikh rakoobraznykh (Idotea baltica basteri). – Kiev: Nauk. dumka, 1973. – 183s./
- Яхонтова И.В. Сообщество обрастания мидийных коллекторов в восточной части Черного моря. Автореф. дисс... канд. биол. наук – М., 2008. – 25 с. /Yakhontova I.V. Soobshhestvo obrastaniya midiynykh kollektorov v vostochnoy chasti Chernogo morya. Avtoref. diss... kand. biol. nauk – M., 2008. – 25s./
- Anokhina L.L. Seasonal dynamics of diel changes in inshore benthopelagic communities of the Black Sea by the example of the Golubaya Bay (Gelendzhik Town) // Biol. Bull. – 2005. – Vol.32, no. 3. – P. 288–300.
- Jansson B.O., Kallander C. On the diurnal activity of some littoral peracarid crustaceans in the Baltic Sea // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. – 1968. – Vol.2, no. 1. – P. 24–36.
- Stearns D.E., Dardeau M.R. Nocturnal and tidal vertical migrations of “benthic” crustaceans in an estuarine system with diurnal tides // Northeast Gulf Science. – 1990. – Vol.11, no. 2. – P. 93–104.
- Taylor R.B. Shot-term dynamics of a seaweed epifaunal assemblage // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. – 1998. – Vol.227. – P. 67–82.
- Zaitsev Yu. Littoral concentration of life in the Black Sea area and coastal management requirements // J. Black Sea/Medit. Environ. – 2006. – Vol.12. – P. 113–128.

Представлено: О.К.Виноградов / Presented by: A.K.Vinogradov
Рецензент: С.Ю.Утевський / Reviewer: S.Yu.Utevsky
Подано до редакції / Received: 04.11.2017

УДК: 597.2/.5 (262.5)

**Іхтіоцени прибережної акваторії бухти Кругла
(Севастополь, Чорне море)
Т.П.Гетьман**

*Інститут біології південних морів імені А.О.Ковалевського Національної академії наук України
(Севастополь, Україна)
divescience@gmail.com*

Моніторинг іхтіофауни прибережної акваторії Криму є важливою частиною комплексних спостережень за сучасним станом екосистеми Чорного моря. Критичні зміни були викликані зростаючим протягом останніх десятиліть ХХ століття антропогенним пресингом, в результаті чого спостерігалася істотна деградація фіто- і зооценозів. Подібні зміни спостерігалися і в співтоваристві риб. У статті представлена карта-схема з детальним описом рельєфу дна і особливостями підводного ландшафту бухти і прилеглих до неї відкритих ділянок акваторії. У роботі розглядаються особливості просторового розподілу і сезонна динаміка трьох екологічних груп риб: пелагічних, придонних і донних, які населяють пелагіаль, тверді і пухкі ґрунти. За період спостережень було зареєстровано 57 видів риб з 43 родів, що належать до 36 сімейств. У іхтіоцені твердих ґрунтів переважають придонні риби, які представлені 14 видами з 7 родин (Labridae, Syngnathidae та Sparidae). Донні риби представлені 8 видами з 5 родин (Blenniidae). З 20 видів риб, відзначених на пухких ґрунтах, придонні – 6, донні – 14, серед яких найбільшою різноманітністю відрізнялися бичкові Gobidae, 9 родин представлених одним видом. Особливо варто відзначити появу в червні 2005 р. в акваторії бухти сальпи *Sarpa salpa* (L., 1758). Результати досліджень, представлені в даній роботі, дають розуміння про сучасний стан співтовариства морських риб чорноморського узбережжя Криму і можуть бути використані для порівняння з даними, отриманими на інших ділянках акваторії Чорного моря.

Ключові слова: співтовариство риб, прибережна акваторія, пелагічні, донні і придонні риби, Чорне море, бухта Кругла.

**Ichthyocenes of the coastal aquatic complex of the Kruglaya Bay
(Sevastopol, Black Sea)
T.P.Hetman**

Ichthyofauna monitoring of the Crimean coastal water area is one of the most important parts in the research of the current condition of the Black Sea ecosystem. In last 10 years of XX century anthropogenic impact caused significant critical changes, resulted in essential degradation of phyto- and zoocenoses. Similar situation was observed in fish populations. The article presents a schematic chart with the detailed bottom relief description, features of underwater landscape of the Kruglaya Bay and adjacent open water areas. The paper deals with spatial distribution and seasonal dynamics of three ecological groups of fish: pelagic, benthopelagic and benthic, that inhabits pelagic, solid and soft grounds. 57 species that belong to 36 families were found during the research period. In the ichthyocen of solid ground the benthopelagic fishes prevailed, presented by 14 species of 7 families (Labridae, Syngnathidae and Sparidae). Benthic fishes were presented by 8 species from 5 families. Among 20 species from the soft ground area 6 were benthopelagic species and 14 – benthic species. The most diversity was observed in Gobiidae family. It should be noted appearance of *Sarpa salpa* (L., 1758) in June 2005 in the bay water area. The results may give an assessment of current condition of sea fish populations of sea coast of Crimea and may be useful at comparison with other parts of water areas of the Black Sea.

Key words: fish community, coastal area, pelagic, benthic and benthopelagic fishes, Black Sea, Kruglaya bay.

**Ихтиоцены прибрежной акватории бухты Круглая
(Севастополь, Чёрное море)
Т.П.Гетьман**

Мониторинг ихтиофауны прибрежной акватории Крыма является важной частью комплексных наблюдений за современным состоянием экосистемы Чёрного моря. Критические изменения были вызваны возрастающим на протяжении последних десятилетий ХХ века антропогенным пресингом, в результате чего наблюдалась существенная деградация фито- и зооценозов. Подобные изменения наблюдались и в сообществе рыб. В статье представлена карта-схема с детальным описанием рельефа дна и особенностями подводного ландшафта бухты и прилегающих к ней открытых участков

акватории. В работе рассматриваются особенности пространственного распределения и сезонная динамика трёх экологических групп рыб: пелагических, придонных и донных, которые населяют пелагиаль, твердые и рыхлые грунты. За период наблюдений было зарегистрировано 57 видов рыб из 43 родов, относящихся к 36 семействам. В ихтиоценое твёрдых грунтов преобладают придонные рыбы, которые представлены 14 видами из 7 семейств (Labridae, Syngnathidae и Sparidae). Донные рыбы представлены 8 видами из 5 семейств (Blenniidae). Из 20 видов рыб, отмеченных на рыхлых грунтах, придонные – 6, донные – 14, среди которых наибольшим разнообразием отличались бычковые Gobidae, 9 семейств представлены одним видом. Отдельно стоит отметить появление в июне 2005 г. в акватории бухты сальпы *Sarpa salpa* (L., 1758). Результаты исследований, представленные в данной работе, дают понимание о современном состоянии сообщества морских рыб черноморского побережья Крыма и могут быть использованы для сравнения с данными, полученными на других участках акватории Чёрного моря.

Ключевые слова: сообщество рыб, прибрежная акватория, пелагические, донные и придонные рыбы, Черное море, бухта Круглая.

Введение

Анализ ретроспективных данных показал, что возростающий на протяжении второй половины XX века антропогенный прессинг привел к ухудшению состояния прибрежной экосистемы Крыма. Физическое уничтожение биотопов, бытовое и техногенное загрязнение, нерациональный промысел, недостаток внимания к охране редких и исчезающих видов животных и растений, интродукция и инвазия новых видов – далеко не полный список факторов, приводящих к деградации сообществ растений и животных прибрежной зоны (Болтачев, 2003). Исходя из вышеизложенного, можно констатировать уменьшение видового богатства фауны рыб в бухтах Севастополя в конце 80-х годов прошлого века (Шевченко, 1993; Гордина и др., 2004). С начала этого десятилетия отмечена тенденция к увеличению видового богатства и численности рыб (Болтачев и др., 2001, 2003, 2012). Согласно актуальным данным ихтиофауна юго-западного Крыма насчитывает 120 видов, из которых непосредственно в акватории бухты Круглая зарегистрировано 42 (Болтачев, Карпова, 2012).

Исследование морских прибрежных экосистем с использованием методов подводных визуальных наблюдений широко используется в мировой практике. Данные, полученные при погружениях, позволяют получить новую информацию о распределении гидробионтов *in situ*.

Цель работы – мониторинг сообщества рыб прибрежной акватории б. Круглая. Задачи – определение видового богатства, обилия и встречаемости рыб в прибрежной акватории бухты для оценки современного состояния ихтиофауны.

Объекты и методы исследования

Материалом для выполнения работы послужили результаты наблюдений и учётов рыб, фото- и видеосъемок, которые были получены во время научных водолазных спусков. Для получения достоверных данных спуски организовывались круглогодично, в разное время суток и при разных погодных условиях, что позволило проследить сезонную динамику, а также некоторые особенности биологии и этологии рыб.

Сбор материала основывался на методиках подводных визуальных наблюдений и учётов рыб, адаптированных для Чёрного моря (Гетьман 2007, 2015; Пашков, Круглов, 1994). Подготовительным этапом исследований было проведение погружений для определения структуры подводного ландшафта и особенностей рельефа дна. Описание рельефа и его компонентов проводилась по методикам ландшафтных исследований морской прибрежной зоны, разработанной ВНИРО (Блинова и др., 2005). Планирование и выполнение погружений проводились согласно стандартам Global Underwater Explorers (GUE). Для учета был выбран метод визуальных разрезов, за стандарт принималась трансекта размером 100×3 м. Трансекты прокладывались вдоль береговой линии каждые 3 м глубины по изобатам от 3 до 24 м. На больших глубинах применялся метод стандартных площадок, полигонов и круговой обзор.

Район исследований включал в себя акваторию б. Круглая и прилегающие к ней открытые участки побережья с границами 44°36'N 33°25'E, 44°36'N 33°27'E (рис. 1). Для навигации был использован программный пакет Navionics Europe для Android, куда вносились данные координат GPS о местах погружений и всплывтий. Исследования проводились в период с мая 2005 по октябрь 2011 года, за это время было проведено более 600 погружений.

При расчёте обилия рыб использовались усреднённые данные о численности (количество особей на 1 га проекционной площади). Для анализа видового разнообразия использовались индексы биологического разнообразия Симпсона и Шеннона, а также индекс выравненности по Пиелу (Одум, 1986).

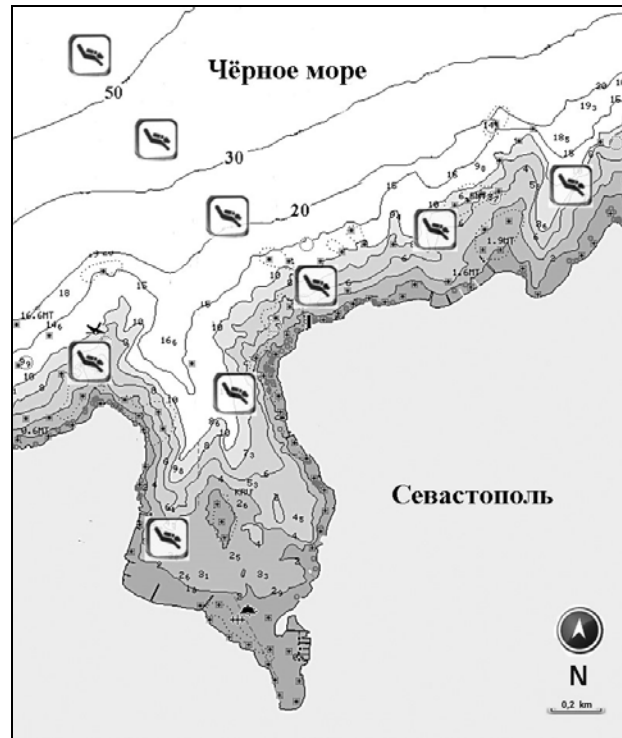


Рис. 1. Карта-схема района исследований



– места проведения научных спусков.

Результаты и обсуждение

Характеристика и особенности ландшафта. Рельеф дна побережья бухты представляет собой сочетание различных типов твёрдых (ТГ) и рыхлых (РГ) грунтов. ТГ образованы выходом скальной породы, что определяет характер ландшафта. Ступенчатые террасы, характерные для открытых участков береговой линии побережья, продолжаются в подводном ландшафте бухты. У основания террас проходит пояс, сформированный валунами и гравием. На некоторых участках акватории нами отмечены навалы крупных валунов и глыб. Блочно-ячеистые и ячеистые формы рельефа, покрытые зарослями макрофитов, создают множество естественных укрытий для рыб.

РГ весьма разнообразны – дно в центральной части бухты песчаное с примесью ракушки, в угловой южной части – заиленный песок. На траверзе бухты песок с осколками ракушек покрыт илом. При удалении от берега толщина слоя ила заметно увеличивается с глубиной. По данным С.А.Зернова, в начале прошлого века на границе ТГ проходила устричная гряда, которая переходила в зону мидийного ила (Зернов, 1913).

Граница между ТГ и РГ на открытых участках побережья проходит на западе в 200–250 м от берега со свалом глубины до 21 м, а на востоке в 300–350 м и глубинами 13–17 м. В бухте у западного берега ТГ простираются на 50–70 м в море, а на восточном – на 25–40 м до глубин 3–8 м. Вдоль береговой линии находится большое количество гидротехнических сооружений: пирсы, причалы, бетонные массивы, которые образуют «искусственные рифы».

Ихтиофауна. За весь период наблюдений нами было зарегистрировано 57 видов рыб из 43 родов, относящихся к 36 семействам (табл. 1).

Таблица 1.

Таксономический состав и встречаемость рыб в акватории б. Круглая

Семейство	Вид	Экологическая группа	Биотоп	Встречаемость
Squalidae	<i>Squalus acanthias</i> L., 1758	П	П	+
Rajidae	<i>Raja clavata</i> L., 1758	ПД	РГ	+
Dasyatidae	<i>Dasyatis pastinaca</i> (L., 1758)	ПД	РГ	+
Engraulidae	<i>Engraulis encrasicolus</i> (L., 1758)	П	П	++++
Clupeidae	<i>Sprattus sprattus phalericus</i> (L., 1758)	П	П	++++
Phycidae	<i>Gaidropsarus mediterraneus</i> (L., 1758)	Д	ТГ	++
Gadidae	<i>Merlangius merlangus euxinus</i> (Nordmann, 1840)	ПД	РГ	+++
Ophidiidae	<i>Ophidion rochei</i> Müller, 1845	Д	РГ	+
Mugilidae	<i>Liza aurata</i> (Risso, 1810)	П	П	++
	<i>L. haematocheila</i> (Temminch et Schlegel, 1845)	П	П	++
	<i>L. saliens</i> (Risso, 1810)	П	П	+
	<i>Mugil cephalus</i> L., 1758	П	П	+
Atherinidae	<i>Atherina hepsetus</i> L., 1758	П	П	++
	<i>A. pontica</i> (Eichwald, 1831)	П	П	+++
Belonidae	<i>Belone belone euxini</i> Günther, 1866	П	П	+++
Gasterosteidae	<i>Gasterosteus aculeatus</i> L., 1758	ПД	ТГ	+
Syngnathidae	<i>Hippocampus hippocampus</i> (Cuvier, 1829)	ПД	ТГ	+
	<i>Syngnathus abaster</i> Risso, 1827	ПД	ТГ	+
	<i>S. typhle</i> L., 1758	ПД	РГ	+
Scorpaenidae	<i>Scorpaena porcus</i> L., 1758	Д	ТГ, РГ	+++
Triglidae	<i>Chelidonichthys lucernus</i> (L., 1758)	Д	РГ	+
Moronidae	<i>Dicentrarchus labrax</i> (L., 1758)	П	ТГ,	+
Serranidae	<i>Serranus scriba</i> (L., 1758)	ПД	ТГ	+
Pomatomidae	<i>Pomatomus saltatrix</i> (L., 1766)	П	ТГ	+
Carangidae	<i>Trachurus mediterraneus ponticus</i> Aleev, 1956	П	П	++
Sparidae	<i>Diplodus annularis</i> (L., 1758)	ПД	ТГ	+
	<i>D. puntazzo</i> (Cetti, 1777)	ПД	ТГ	+
	<i>Sarpa salpa</i> (L., 1758)	ПД	РГ	*
Centracanthidae	<i>Spicara flexuosa</i> Rafinesque, 1810	П	П	+++
Sciaenidae	<i>Sciaena umbra</i> L., 1758	ПД	ТГ	++
Mullidae	<i>Mullus barbatus</i> (L., 1758)	ПД	ТГ	+++
Pomacentridae	<i>Chromis chromis</i> L., 1758	ПД	ТГ	+++
Labridae	<i>Ctenolabrus rupestris</i> (L., 1758)	ПД	ТГ	+
	<i>Symphodus cinereus</i> (Bonnaterre, 1788)	ПД	ТГ	+
	<i>S. roissali</i> (Risso, 1810)	ПД	ТГ	+++
	<i>S. tinca</i> (L., 1758)	ПД	ТГ	+++
	<i>S. ocellatus</i> Forsskål, 1775	ПД	ТГ	++++
Ammodytidae	<i>Gymnammodytes cicerellus</i> (Rafinesque, 1810)	Д	РГ	++
Trachinidae	<i>Trachinus draco</i> L., 1758	Д	РГ	++
Uranoscopidae	<i>Uranoscopus scaber</i> L., 1758	Д	РГ	++
Tripterygiidae	<i>Tripterygion tripteronotus</i> (Risso, 1810)	Д	ТГ	++
Blenniidae	<i>Aidablennius sphyinx</i> (Valenciennes, 1836)	Д	ТГ	+
	<i>Coryphoblennius galerita</i> (L., 1758)	Д	ТГ	+

	<i>Parablennius sanguinolentus</i> (Pallas, 1814)	Д	ТГ	+
	<i>P. tentacularis</i> (Brunnich, 1768)	Д	ТГ	+
	<i>Salaria pavo</i> (Risso, 1810)	Д	ТГ	+
Gobiesocida	<i>Lepadogaster candollii</i> , Risso, 1810	Д	ТГ	+
Callionymidae	<i>Callionymus pussilus</i> Delaroché, 1809	Д	РГ	++++
Gobiidae	<i>Gobius niger</i> L., 1758	Д	ТГ	++
	<i>G. cobitis</i> Pallas, 1814	Д	ТГ	++
	<i>Mesogobius batrachocephalus</i> (Pallas, 1814)	Д	РГ	+
	<i>Neogobius melanostomus</i> (Pallas, 1814)	Д	РГ	++
	<i>Pomatoschistus</i> sp.	Д	РГ	+++
	<i>Zosterisessor. ophiocephalus</i> (Pallas, 1814)	Д	РГ	++
Scombridae	<i>Sarda sarda</i> (Bloch, 1793)	П	П	+
Scophthalmidae	<i>Psetta maxima maeotica</i> (Pallas, 1814)	Д	ТГ, РГ	+
Soleidae	<i>Pegusa nasuta</i> (Pallas, 1814)	Д	РГ	+

ПД – придонний, Д – донний, П – пелагический, ТГ – твердые грунты, РГ – рыхлые грунты.

++++ – массовый, +++ – обычный многочисленный, ++ – обычный немногочисленный, + – редкий, * – единичные наблюдения.

Пелагические рыбы, отмеченные в районе наблюдений, являются обычными для прибрежной акватории Севастополя (Болтачев, Карпова, 2012). В разные сезоны отмечено 15 видов рыб из 11 семейств. В прибрежье на глубинах до 24 м встречаются черноморская и средиземноморская атерины *A. pontica* и *A. hepsetus*, сарган *B. belone*, луфарь *P. saltatrix*, лаврак *D. labrax* и пелагида *S. sarda*. На открытых участках акватории, в зависимости от времени года, регистрировались массовые виды – хамса *E. encrasicolus*, шпрот *S. sprattus*, ставрида *T. mediterraneus*, смарида *S. smarís* и кефали Mugilidae. На глубинах более 40 м отмечался катран *S. acanthias*.

Ихтиоцен твёрдых грунтов включает виды рыб, которых мы могли наблюдать на монолитных, блочных, блочно-ячеистых и ячеистых формах рельефа. В ихтиоцене ТГ преобладают придонные рыбы (ПД), которые представлены 14 видами из 7 семейств. Наибольшим разнообразием таксонов характеризуются губановые Labridae – 2 рода, 5 видов, игловые Syngnathidae и спаровые Sparidae – по 2 каждое, остальные 4 семейства по одному. Донные рыбы (Д) представлены 8 видами из 5 семейств. Наиболее многообразны собачковые Blenniidae – 5 видов и 4 рода, остальные 4 семейства представлены одним видом. По численности в ихтиоцене ТГ среди ПД рыб доминирует зеленушка перепелка (22,7%) *S. roissali*, субдоминирующими выступают глазчатая зеленушка *S. ocellatus* (17,3%) и рулена *S. tinka* (10,3%). Обычными являются ласточка *C. chromis* (8,6%), каменный окунь-зебра *S. scriba* (2,9%), тёмный горбыль *S. umbra* (2,8%) ласкирь *D. annularis* (2,8%), зубарик *D. puntazzo* (2,5%), зеленушка рябчик *S. cinereus* (2%). К немногочисленным относятся пухлощёкая игла-рыба *S. abaster*, морской конек *H. hippoampus*, гребенчатый губан *C. rupestris* и трёхиглая колюшка *G. aculeatus*, их суммарная доля составляла 5,4%.

Среди донных рыб доминирует обыкновенная морская собачка *P. sanguinolentus* (7,4%), субдоминирующий вид – скорпена *S. porcus* (6,9%). Обычные – троепёр *T. tripteronotus* (1,9%), морской налим *G. mediterraneus* (1,5%), присоски Gobiesocidae (1,7%) и остальные собачки: *A. sphynx*, *C. Galerita*, *P. tentacularis*, *S. pavo* (3,3%).

Ихтиоцен рыхлых грунтов. Из 20 видов рыб, отмеченных на РГ, придонные – 6, донные – 14, среди которых наибольшим разнообразием отличались бычковые Gobidae (5 видов, 4 рода), 9 семейств представлены одним видом. На дне доминируют морские мыши *C. pussilus* (26,3%) и песчанка *G. cicerellus* (23,2%), субдоминирующее положение занимают лысуны, бычки рода *Pomatoschistus* (9,5%). Обычными являются скорпена (8,5%), бычки кнут *M. batrachocephalus* (7,8%), травяник *G. ophiocephalus* (4,1%) и кругляк *N. melanostomus* (2,5%). Немногочисленны, но постоянно присутствуют – морской дракончик *T. draco*, звездочёт *U. scaber*, калкан *P. maxima*, ошибеня *O. rochei*, тригла *C. lucernus* (7,3%). Среди донных рыб наиболее многочисленна султанка *M. barbatus* (9,3%), обычные виды – мерланг *M. merlangus*, длиннорылая игла-рыба *S. typhle*,

морской кот *D. pastinaca* и лисица *R. clavata* (1,5%). Отдельно стоит отметить появление в июне 2005 г. в акватории бухты сальпы *S. salpa*.

Вертикальное распределение и сезонная динамика рыб. Пространственная структура сообщества рыб неоднородна, что обусловлено, прежде всего, экологическими нишами, которые занимают виды. Число видов внутри экологических групп зависит от глубины и различается для пелагических, донных и придонных видов (табл. 2).

Таблица 2.

Изменение общего количества видов рыб по глубинам в акватории б. Круглая

Биотоп	Группа	Глубина, м							
		3	6	9	12	15	18	21	24+
П		8* / 50,0%	13 / 81,3%	15 / 93,8%	15 / 93,8%	14 / 87,5%	11 / 68,8%	10 / 62,5%	9 / 56,3%
ТГ	Д	8 / 36,4%	6 / 27,3%	6 / 27,3%	4 / 18,2%	–	–	–	–
	ПД	10 / 45,5%	13 / 59,1%	13 / 59,1%	11 / 50,0%	8 / 36,4%	–	–	–
РГ	Д	2 / 10,0%	14 / 70,0%	14 / 70,0%	10 / 50,0%	7 / 35,0%	6 / 30,0%	5 / 25,0%	4 / 20,0%
	П	2 / 10,0%	4 / 20,0%	4 / 20,0%	4 / 20,0%	4 / 20,0%	3 / 15,0%	3 / 15,0%	3 / 15,0%

* – в числителе – количество видов, в знаменателе – их доля от общего количества видов, зарегистрированных на данном биотопе. П – пелагиаль, пелагические виды, Д – донные виды, ПД – придонные виды, ТГ – твердые грунты, РГ – рыхлые грунты.

Проводя анализ пространственного распределения и сезонной динамики рыб, необходимо уточнить, что их обилие в биотопе зависит от условий среды (характер рельефа, температура (tw) и прозрачность воды, время суток, волнение моря) и особенностей биологии каждого вида.

На ТГ горизонт глубин до 3 м занимают донные виды рыб, ведущие малоподвижный образ жизни – присоски, собачковые, бычковые и скорпена. Из придонных видов отмечались губановые, пухлощекая игла-рыба и морской конёк. Доля донных видов уменьшалась с увеличением глубины. Отсутствовали присоски, снижалась численность собачковых и бычковых, а на глубинах более 12 м регистрировали только скорпену. Обилие придонных рыб увеличивалось, в основном, за счёт губановых. На глубинах от 6 м нами отмечались ласточка, ласкирь, каменный окунь-зебра, тёмный горбыль, зубарик и средиземноморский морской налим. На РГ в диапазоне глубин 3–12 м преобладали донные рыбы, наиболее разнообразными были бычковые. Начиная с глубины 6 м регистрировались песчанка, звездочёт, морской дракон и ошибень. На глубинах до 45 м – морская лисица, морской кот и черноморская камбала-калкан.

Обилие рыб изменяется в зависимости от времени года. В зимний период на открытых участках акватории tw в толще не превышает 7°C, а летом увеличивается до 26°C (рис. 2).

В период с декабря по март при tw 7–9°C в пелагиале прибрежных вод отмечали скопления хамсы и ставриды. Во второй половине апреля, с повышением температуры воды, к берегу подходят стаи кефалей, смариды, в июне – шпрот, черноморская и средиземноморская атерины, сарган и пеламида, в июле – луфарь. На ТГ обилие рыб минимально, их общая численность редко достигает 10 особей на трансекту. В этот период на глубинах до 6 м единично встречались рулена, глазчатая зеленушка и скорпена.

В апреле–мае, с повышением температуры воды и началом нерестового периода, количество рыб увеличивается. Весной рыбы держатся в верхних наиболее прогретых слоях воды. Стаи губанов насчитывают более 20 особей. Доля зеленушки-перепёлки составляет 35%, глазчатой – 26%, а рулены – 13% от общего числа рыб в ихтиоценозе. В это время появляются бычки и единичные особи темного горбыля. Во второй половине мая, по мере прогревания воды

до 14°C, видовое разнообразие и численность рыб возрастает. За счёт увеличения видового богатства доля губановых уменьшается до 62%, появляются собачковые (16%), увеличивается численность скорпены (6%) и бычков (3%). В зарослях макрофитов можно встретить пухлощёкую иглу и морского конька, а у дна на границе ТГ – горбыля, каменного окуня-зебру и налима.

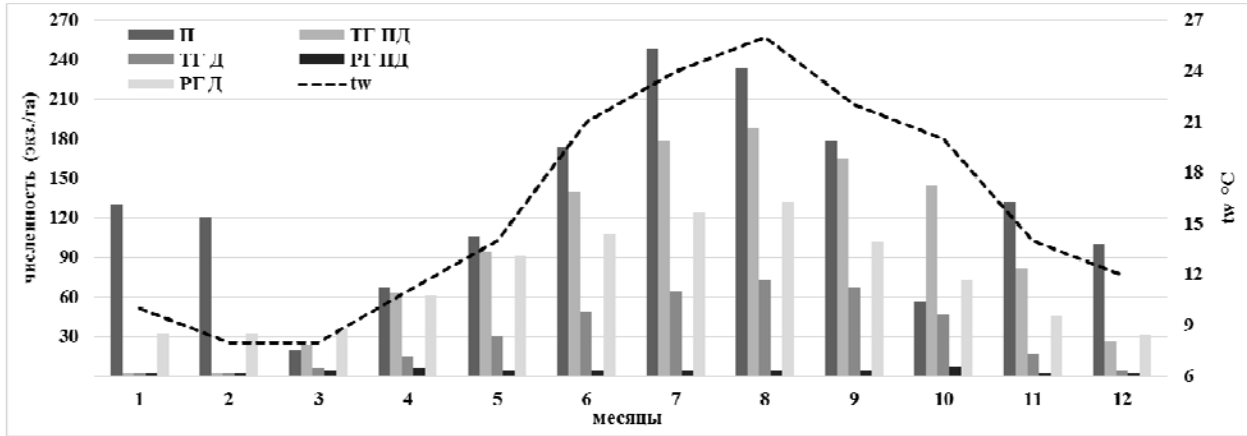


Рис. 2. Сезонная динамика сообщества морских рыб прибрежной акватории бухты Круглая (Севастополь, Чёрное море)

П – пелагиаль, пелагические виды, Д – донные виды, ПД – придонные виды, ТГ – твердые грунты, РГ – рыхлые грунты, tw – температура воды °С.

Летом наблюдается всё многообразие ихтиофауны. С повышением температуры воды в толще увеличивается обилие рыб и глубина их распространения. При tw выше 18°C видовое богатство растёт за счёт появления теплолюбивых видов рыб. У самого берега на камнях многочисленна обыкновенная морская собачка (8%), можно встретить тронопёра, а у уреза воды присосок. В июне-сентябре численность губановых увеличивается, их доля достигает 50%, кроме массовых видов в поле зрения попадают зеленушка рябчик и гребенчатый губан. Достигает максимума количество собачковых (14%) и бычков (8%). Рядом с гидротехническими сооружениями и у отвесных стенок ласточки образуют крупные стаи численностью до 50 особей (9%). Начиная с июля все чаще можно наблюдать ласкиря, зубарика и горбыля.

В сентябре–октябре численность рыб ещё достаточно велика, но с понижением температуры она уменьшается. Первыми из прибрежной зоны исчезают рыбы, населяющие малые, до 3 м, глубины, а также единственный тропический вид – ласточка. В ноябре, при tw выше 12°C, общее количество рыб не превышает 100 особей на 1 га. В этот период доля губановых составляет 60%, скорпены – 11%, ласкиря – 5% и каменного окуня менее 4%.

На РГ распределение донных и придонных рыб и их сезонная динамика имеют свои особенности. У берега на глубинах до 30 м в период с декабря по март придонные виды не отмечались. Весной, начиная с середины апреля, к берегу подходят черноморская камбалка-калкан, морской кот и морская лисица. В акватории бухты в зависимости от сезона происходит смена массовых видов. Зимой в бухте на глубинах до 9 м мы наблюдаем морских мышей, численность которых весьма велика и достигает 50 особей на трансекту. На больших глубинах обычны морской дракон, звездочёт и скорпена. Весной и летом РГ заселены бычками, обилие которых увеличивается на протяжении всего лета. В это время численность морской мыши уменьшается, и доля не превышает 15%. В апреле–мае с повышением tw выше 15°C мы наблюдаем обилие бычков, среди которых наиболее массовый песочник (до 27%), кнут (до 15%) и травяник (до 12%), а доля лысунов составляет 10%. Осенью при tw ниже 16°C численность бычков уменьшается, а морских мышей возрастает. Среди донных видов по численности наиболее массовым видом выступает султанка, которая подходит к берегу с мая по июнь. Также с апреля по ноябрь на глубинах 6–40 м отмечались морская лисица и морской кот, а на глубинах более 30 м круглогодично – мерланг.

Для разных экологических групп были рассчитаны индексы видового разнообразия Симпсона и Шеннона, а также индекс выравненности по Пиелу. Для пелагических они имели следующие значения: 0,83, 1,96, 0,61; для ихтиоценоза ТГ 0,89, 2,55, 0,80; для ихтиоценоза РГ 0,85, 3,00, 0,86.

При погружениях на траверзе бухты в диапазоне глубин 30–76 м на РГ нами неоднократно регистрировались следы донных тралений, которые приводят к ряду негативных последствий (Еремеев, Болтачев, 2005). Во-первых – происходит физическое разрушение донных биоценозов, которые оставались неизменными на протяжении сотен лет, и именно здесь, в зоне мидийного ила зимовали осетровые, численность которых в Черном море резко снизилась. Во-вторых – ил, поднимаемый со дна, долгое время не осаждается, а течениями перемещается к берегу, в результате чего происходит смещение границы ил–песок на меньшие глубины. В-третьих – мелкодисперсный ил, находясь во взвешенном состоянии, уменьшает прозрачность воды, что препятствует прохождению солнечного света.

Заключение

Особенности подводных биотопов и широкий диапазон глубин в акватории бухты Круглая (Севастополь, Чёрное море) создали условия для формирования трёх устойчивых ихтиоценозов – пелагиали, твердых и рыхлых грунтов. На основании многолетних наблюдений и анализа полученных данных можно уверенно говорить о существовании устойчивого сообщества морских видов рыб в акватории бухты Круглой, сформированного, в подавляющем большинстве, средиземноморскими видами. В ходе наших исследований было зарегистрировано 57 видов рыб из 43 родов, относящихся к 36 семействам. Ихтиоценоз пелагиали насчитывает 16 видов из 11 семейств. Наибольшими по численности были основные промысловые виды: хамса (25,6%) и шпрот (22,4%). Также зарегистрированы: ставрида, смарида, кефали, черноморская и средиземноморская атерины, сарган, луфарь, лаврак, пелагида и катран. Ихтиоценоз твердых грунтов состоял из придонных и донных видов. Придонные рыбы представлены 13-ю видами из 7-ми семейств. Наибольшим разнообразием таксонов характеризовались зеленушки – 2 рода, 5 видов, игловые и спаровые по 2 вида, остальные 4 семейства по одному соответственно. Донные рыбы представлены 8-ю видами из 5-ти семейств. К многочисленным относятся собачки 5-ти видов из 4-х родов, остальные семейства представлены по одному виду. Ихтиоценоз рыхлых грунтов представлен 20-ю видами рыб, среди которых придонные – 6, донные – 14. Здесь наибольшим разнообразием отличались бычковые (5 видов, 4 рода). Каждое из остальных 9-ти семейств представлено одним видом. Сезонная динамика численности придонных и донных видов рыб на твердых грунтах характеризуется нормальным распределением: зимний минимум, весеннее повышение, летний максимум и осеннее снижение. Динамика численности придонных и донных рыб на рыхлых грунтах отличны от таковых на твёрдых грунтах, отмечена тенденция сезонной смены доминирующих видов в ихтиоценозе. В пелагиали также наблюдается смена доминирующих групп – замещение теплолюбивых видов холодолюбивыми, что связано с особенностями биологии и этологии этих рыб. Подводя итог и сравнивая полученные результаты с ретроспективными данными, можно отметить тенденцию к восстановлению прибрежных экосистем, что подтверждается улучшением качественно-количественных показателей сообщества морских рыб, высокими значениями индексов видового разнообразия.

Автор признателен коллегам, дайверам и подводным охотникам за помощь в сборе и анализе материала. Представленные результаты были получены при частичной материально-технической поддержке проекта «Black sea explorers». Отдельно выражаю благодарность ведущему научному сотруднику отдела планктона ИнБЮМ НАН Украины к.б.н Загородней Юлии Анатольевне и руководителю межведомственной лаборатории мониторинга экосистем Азовского бассейна Института морской биологии и Мелитопольского государственного педагогического университета д.б.н. Демченко Виктору Алексеевичу за ценные замечания и консультации при выполнении работы.

Список литературы

Блинова О.И., Вилкова О.Ю., Милютин Д.М. Изучение экосистем рыбохозяйственных водоемов, сбор и обработка данных о водных биологических ресурсах, техника и технология их добычи и переработки. Методы ландшафтных исследований и оценки запасов донных беспозвоночных и

водорослей морської прибережної зони. – М.: ВНИРО, 2005. – Вып.3. – 135с. /Blinova O.I., Vilkoval O.Yu., Milyutin D.M. Izucheniye ekosistem rybokhozyaystvennykh vodoyemov, sbor i obrabotka dannykh o vodnykh biologicheskikh resursakh, tekhnika i tekhnologiya ikh dobychi i pererabotki. Metody landshaftnykh issledovaniy i otsenki zapasov donnykh bespozvonochnykh i vodorosley morskoy pribrezhnoy zony. – М.: VNIRO, 2005. – Вып.3. – 135с./

Болтачев А.Р., Зуев Г.В., Гуцал Д.К. К столетию отчета С.А.Зернова по исследованию рыболовства в Таврической губернии // Экология моря. – 2001. – Вып.57. – С. 19–24. /Boltachev A.R., Zuyev G.V., Gutsal D.K. K stoletiyu otcheta S.A. Zernova po issledovaniyu rybolovstva v Tavricheskoj gubernii // Ekologiya morya. – 2001. – Вып.57. – С. 19–24./

Болтачев А.Р. Ихтиофауна черноморского побережья Крыма / Современное состояние биоразнообразия прибрежных вод Крыма (Черноморский сектор). – Севастополь: ЕКОСИ-Гидрофизика, 2003. – С. 364–379. /Boltachev A.R. Ikhtiofauna chernomorskogo poberezh'ya Kryma / Sovremennoye sostoyaniye bioraznoobraziya pribrezhnykh vod Kryma (Chernomorskiy sektor). – Sevastopol': EKOSI-Gidrofizika, 2003. – С. 364–379./

Болтачев А.Р., Карпова Е.П. Ихтиофауна прибрежной зоны Севастополя (Чёрное море) // Морской экологический журнал. – 2012. – 2. – С. 10–27. /Boltachev A.R., Karpova Ye.P. Ikhtiofauna pribrezhnoy zony Sevastopolya (Chernoye more) // Morskoy ekologicheskij zhurnal. – 2012. – 2. – С. 10–27./

Гетьман Т.П. Визуальные подводные наблюдения при оценке качественно-количественных показателей ихтиоцены // Экология моря. – 2007. – Отдельный вып.74. – С. 13–17. /Get'man T.P. Vizual'nyye podvodnyye nablyudeniya pri otsenke kachestvenno-kolichestvennykh pokazateley ikhtiotseya // Ekologiya morya. – 2007. – Otdel'nyy vyp.74. – С. 13–17./

Гетьман Т.П. Некоторые аспекты мезомасштабного районирования ихтиоценов морской прибрежной акватории Севастополя (Чёрное море) // Сучасні проблеми теоретичної і практичної іхтіології: Матеріали VIII Міжн. іхтіологічної наук.-практ. конф. – Херсон: Гринь Д.С., 2015. – С. 35–39. /Get'man T.P. Nekotoryye aspekty mezomashtabnogo rayonirovaniya ikhtiotseynov morskoy pribrezhnoy akvatorii Sevastopolya (Chernoye more) // Suchasni problemy teoretichnoi i praktichnoi ikhtologii: Materialy VIII Mizhn. ikhtilogichnoi nauk.-prakt. konf. – Kherson: Grin' D.S., 2015. – С. 35–39./

Гордина А.Д., Салехова Л.П., Климова Т.Н. Видовой состав рыб как показатель современного состояния прибрежной экосистемы юго-западного шельфа Крыма // Морской экологический журнал. – 2004. – №2. – С. 15–24. /Gordina A.D., Salekhova L.P., Klimova T.N. Vidovoy sostav ryb kak pokazatel' sovremennoy sostoyaniya pribrezhnoy ekosistemy yugo-zapadnogo shel'fa Kryma // Morskoy ekologicheskij zhurnal. – 2004. – No. 2. – С. 15–24./

Еремеев В.Н., Болтачев А.Р. Потенциальные перспективы Донузлава в качестве центра сохранения биоразнообразия, марикультуры, рекреации и экотуризма / Экологическая безопасность прибрежной и шельфовой зон и комплексное использование ресурсов шельфа. – Севастополь, 2005. – С. 151–158. /Yeremeyev V.N., Boltachev A.R. Potentsial'nyye perspektivy Donuzlava v kachestve tsentra sokhraneniya bioraznoobraziya, marikul'tury, rekreatsii i ekoturizma / Ekologicheskaya bezopasnost' pribrezhnoy i shel'fovoy zon i kompleksnoye ispol'zovaniye resursov shel'fa. – Sevastopol', 2005. – С. 151–158./

Зернов С.А. К вопросу об изучении жизни чёрного моря // Зап. императ. АН. – Спб., 1913. – 32, №1. – 299с. /Zernov S.A. K voprosu ob izuchenii zhizni chernogo morya // Zap. imperat. AN. – Spb., 1913. – 32, No. 1. – 299s./

Одум Ю. Экология. – М.: Мир, 1986. – 376с. /Odm Yu. Ekologiya. – М.: Mir, 1986. – 376s./

Пашков А.П., Круглов М.В. К методике оценки плотности распределения придонных рыб в мелководной части Черноморского шельфа // Актуальные вопросы экологии и охраны природы степных экосистем и сопредельных территорий. – Краснодар, 1994. – С. 318–322. /Pashkov A.P., Kruglov M.V. K metodike otsenki plotnosti raspredeleniya pridonnykh ryb v melkovodnoy chasti Chernomorskogo shel'fa // Aktual'nyye voprosy ekologii i okhrany prirody stepnykh ekosistem i sopredel'nykh territoriy. – Krasnodar, 1994. – С. 318–322./

Шевченко Н.Ф. Видовой состав и количественное распределение рыб в бухтах в районе Севастополя // Ихтиофауна черноморских бухт в условиях антропогенного воздействия. – Киев: Наукова думка, 1993. – С. 77–91. /Shevchenko N.F. Vidovoy sostav i kolichestvennoye raspredeleniye ryb v bukhтах v rayone Sevastopolya // Ikhtiofauna chernomorskikh bukhт v usloviyakh antropogennogo vozdeystviya. – Kiev: Naukova dumka, 1993. – С. 77–91./

Представлено: В.О.Демченко / Presented by: V.O.Demchenko

Рецензент: Г.Л.Гончаров / Reviewer: G.L.Goncharov

Подано до редакції / Received: 03.12.2017

УДК: 599.742 : 591.531.3 (477.8)

Особливості живлення деяких видів родини Mustelidae на території Львівської області

І.В.Дикий¹, М.В.Марців¹, В.І.Шельвінський², А.Т.Затушевський³

¹Львівський національний університет імені Івана Франка (Львів, Україна) i.dykyu@gmail.com

²Державний природознавчий музей НАН України (Львів, Україна) office@smnh.org

³Зоологічний музей ЛНУ імені Івана Франка (Львів, Україна) andriyatushevsky@gmail.com

На основі трирічних спостережень проаналізовано живлення деяких видів родини Mustelidae і з'ясовано особливості їх живлення за сезонами на території Львівської області. Отримані результати свідчать, що кормовий раціон представників родини Куницеви (*Mustella nivalis*, *M. erminea*, *M. putorius*, *Martes foina*, *M. martes*, *Meles meles*, *Lutra lutra*) формують рослинні (35%) та тваринні (65%) корми. Хребетні у раціоні досліджуваних видів представлені ссавцями – 8 видів. Найчастіше реєструвалися рештки мишоподібних гризунів – *Microtus arvalis* (25%). Серед рослинних кормів переважали сухі плоди (55%). До складу соковитих плодів (45%) входять плоди шести видів рослин. *M. foina* споживає більше рослинних кормів (47%). Завдяки цьому вона більш пристосована до урбоценозів. В раціоні ласки, тхора і видри основну роль відіграють хребетні тварини – понад 70%. Через малу вибірку сезонні особливості харчування вдалося з'ясувати тільки для куниці кам'яної. З'ясовано, що восени *M. foina* живиться переважно рослинами – 55% і менше тваринними кормами – 45%. Однак цікавим фактом є те, що і в зимовий період у раціоні особин виду переважали рослинні корми (антропогенного характеру) – 60%, а у весняний період переважали хребетні (75%), а рослинних решток не було зареєстровано. Встановлено, що *M. nivalis* надає перевагу кормам тваринного походження, в усі пори року хребетні тварини становлять вагомий частку її раціону.

Ключові слова: родина Куницеви, живлення, раціон, безхребетні, хребетні, рослини, Львівська область.

The feeding peculiarities of the Mustelidae family on the territory of the Lviv region

I.Dykyu, M.Martsiv, V.Shelvinskiy, A.Zatushevsky

Analysis of the feeding of some species of the Mustelidae and peculiarities of their feeding by seasons on the territory of the Lviv region has been made on the basis of recent three-year observations. The obtained results indicate that the diet of the family Mustelidae species (*Mustella nivalis*, *M. erminea*, *M. putorius*, *Martes foina*, *M. martes*, *Meles meles*, *Lutra lutra*) consists of plant (35%) and animal (65%) feed. Vertebrates, in the diet of the studied species, are represented by mammals – 8 species. Remains of the rodent *Microtus arvalis* are most commonly recorded (25%). Among the plant feed, dry fruit predominate (55%). The composition of juicy fruit (45%) includes the fruits of six species of plants. *M. foina* consumes more vegetable feed (47%). Due to this, it is more adapted to the urboecosystems. In the diet of *M. nivalis*, *M. putorius* and *Lutra lutra* the main role is played by vertebrates – more than 70%. Due to the small sample, the seasonal features of the feeding were found only for stone marten. It has been determined that in autumn *M. foina* is feeding mainly by plants – 55%, and in a less degree by animals – only 45%. However, the interesting fact is that in winter, in the diet of *M. foina*, vegetative feeds (of antropogenic character) prevail (60%), and in the spring period vertebrates are predominant (75%), and plant remains are not registered. It has been found that *M. nivalis* gives preference to animal feeds, in all seasons vertebrate animals make up a significant proportion of its ration.

Key words: Mustelidae family, feeding, ration, invertebrates, vertebrates, plants, Lviv region.

Особенности питания некоторых видов семейства Mustelidae на территории Львовской области

И.В.Дикий, М.В.Марців, В.И.Шельвинский, А.Т.Затушевский

На основе трехлетних наблюдений проанализировано питание некоторых видов семейства Mustelidae. Выяснены особенности их питания по сезонам на территории Львовской области. Полученные результаты свидетельствуют, что кормовой рацион представителей семейства куньих (*Mustella nivalis*, *M. erminea*, *M. putorius*, *Martes foina*, *M. martes*, *Meles meles*, *Lutra lutra*) формируют растительные (35%) и животные (65%) корма. Позвоночные, в рационе исследуемых видов, представлены млекопитающими – 8 видов. Чаще всего регистрировались остатки мышевидных грызунов – *Microtus arvalis* (25%). Среди растительных кормов преобладали сухие плоды (55%). В состав рациона сочных

плодов (45%) входять плоди шести видів рослин. *M. foina* потребляє більше рослинних кормів (47%). Благодаря этому она более приспособлена к урбоценозам. В рационе ласки, хорька и выдры основную роль играют позвоночные животные – более 70%. Из-за малой выборки сезонные особенности питания удалось выяснить только для *M. foina* и *M. nivalis*. Выяснено, что осенью *M. foina* питается преимущественно растениями – 55% и в меньшей степени животными кормами – 45%. Однако интересным фактом является то, что и в зимний период в рационе особей вида преобладали растительные корма (антропогенного характера) – 60%, а в весенний период уже преобладали позвоночные животные (75%), а растительных остатков не было отмечено. Исследовано, что *M. nivalis* предпочитает корма животного происхождения, во все времена года позвоночные животные составляют весомую долю ее рациона.

Ключевые слова: семейство куньи, питание, рацион, беспозвоночные, позвоночные, растения, Львовская область.

Вступ

У кожній екосистемі велике значення мають трофічні зв'язки. Вони є основою біогенного кругообігу речовин, зв'язують окремі види тварин і рослин і вважаються основними регуляторами чисельності організмів. Для більшості представників родини Mustelidae головним типом трофічних зв'язків визнано відносини хижака до жертви, що є однією з важливих проблем екології тварин, правильне вирішення якої має значне теоретичне і практичне значення. У вивченні функціональної ролі хижих ссавців, що займають вищі гетеротрофні рівні наземних екосистем, особливу роль відіграють трофічні дослідження. Найбільш цікавим у даному випадку є порівняльний аспект, що дає змогу оцінити особливості використання ресурсів і роз'єднання екологічних ніш в умовах спільного мешкання тварин.

Хижі ссавці є вершиною екологічних пірамід різноманітних типів біоценозів і, в той же час, це найбільш вразливі види тварин. Ряд видів (*Mustela erminea*, *M. putorius*, *Lutra lutra*) є рідкісними або вразливими та занесені до Червоної книги України (Червона книга України, 1994, 2009), Європейського червоного списку та до Червоної книги МСОП (МСОП, 2017). Практично всі хижі ссавці України знаходяться під охороною ратифікованою Україною Бернської конвенції (Загороднюк, 1999). Збереження біорізноманіття є основою для підтримання життєзабезпечуючих функцій біосфери та існування людини. Це завдання не може бути реалізоване без фундаментальних досліджень, спрямованих на розробку принципів і практичних заходів, задля охорони живої природи, як на екосистемному, так і на популяційно-видовому рівні. Саме комплексні дослідження трофічних зв'язків дозволять розробити правильний методологічний підхід для реалізації цього завдання.

Зведення відносно хижих ссавців родини куницевих містяться у працях другої половини XIX – початку XX ст. і переважно присвячені біології, систематиці та поширенню даних представників по території західного регіону України. У період 40–80 років XX ст. найбільша увага приділялася особливостям екології куницевих. Зокрема, такі дослідження проводила Н.А.Полушина протягом 1952–1959 рр. в різних районах Українських Карпат та Прикарпаття. У своїй дисертації «Экология, распространение и народнохозяйственное значение семейства куньих западных областей УССР» вона на підставі досліджень 556 зразків (17 шлунків, 523 екскрементів, 16 залишків здобичі), зібраних впродовж усіх п'яти років, аналізує особливості живлення кожного з видів родини Mustelidae, представлених у фауні заходу України (Полушина, 1955). К.А.Татаринов у монографії «Звірі заходу України» описує особливості харчування на заході України таких видів, як куниця лісова, куниця кам'яна, горностай, ласка, тхір чорний, борсук та ін. (Татаринов, 1956). У наступній його праці «Фауна заходу України» звернено увагу на дослідження в галузі морфології, поширення, екології та біоценології хижих ссавців західної частини України. Розглядається генезис фауни, який дозволяє робити певні висновки про навколишнє середовище та клімат минулого (Татаринов, 1973). В кінці 60-х років дослідження живлення родини куницевих доповнює В.І.Абеленцев. У третьому випуску першого тому «Фауни України» підсумовано всі дані про куницевих і наведено опис видів, що населяють дану територію (Абеленцев, 1968). Для цього автором використано власні оригінальні матеріали, зібрані за останні 20 років під час польових екологічних досліджень, літературні і архівні джерела, а також колекційні матеріали зоологічних установ України. У монографії наведено коротку характеристику родини, висвітлено систематику і філогенію, а в описах видів, окрім морфо-анатомічної характеристики, поширення, екологічних особливостей, частково висвітлено і їхнє

живлення. В цей же період були ґрунтовно досліджені особливості живлення борсука на Україні О.П.Корнєєвим, Ц.Ю.Кричевською (1964).

На сьогодні відомі лише фрагментарні дані, основані на невеликій кількості матеріалу, щодо дослідження живлення куниці лісової, кам'яної та ласки. Зокрема, відома публікація С.Стельмаха щодо аналізу живлення куниці лісової на Українському Розточчі (Стельмах, 2013). Деякі фрагментарні дані стосовно особливостей живлення представників родини Mustelidae на даній території висвітлені у публікації Р.Ганаса (2013) та М.Марців (2017). Також за останній період найбільш ґрунтовно досліджено живлення борсука на території західної України І.В.Диким (Дикий, 2005; Дикий, Дика, 2005). Зокрема, на основі матеріалу, зібраного впродовж 1997–2002 рр. автором, було проаналізовано 184 зразки (47 екскрементів і 137 решток здобичі). Також живлення борсука у Харківській обл. впродовж 2001–2010 рр. досліджував В.А.Токарський (Токарский, 2014). Він же у публікації «Степной хорек в степном биоценозе Восточной Украины» (Токарский, 2001), дослідивши живлення цього виду, охарактеризував роль степового тхора у степових біоценозах регіону та його значення як регулятора чисельності степового бабака. Дослідженням живлення куниць роду *Martes* також займалися А.Міхєєв (2002) і J.Lanszki (2003). Також А.Міхєєв провів порівняльний аналіз живлення ласки і горностая в лісових екосистемах південного сходу України (Міхєєв, 2011). За кордоном такі дослідження хижаків більш поширені. Багато вчених досліджують трофіку куниць. J.Lanszki, S.Kormendi, C.Hancz та A.Zalewski (1999) аналізують трофіку хижаків на території Угорщини. Сезонні особливості живлення куниці кам'яної та лисиці охарактеризовано в праці А.Brangi (1995). M.Posluszny, M.Pilot, J.Goszczyński, B.Gralak (2007) аналізують раціон двох видів куниць, використовуючи при визначенні генетичний аналіз, що підвищує рівень достовірності їхніх результатів.

Мета наших досліджень – проаналізувати живлення окремих видів хижаків родини куницевих (Mustelidae). Зокрема, завданням роботи було дослідити та проаналізувати особливості живлення куниці кам'яної та лісової, ласки, тхора чорного, борсука та видри на території Львівської області та з'ясувати сезонні особливості їхньої трофіки.

Об'єкти та методи дослідження

Об'єктом наших досліджень були куниця кам'яна (*Martes foina*), куниця лісова (*Martes martes*), ласка (*Mustella nivalis*), горностай (*Mustella erminea*), тхір чорний (*Mustella putorius*), борсук (*Meles meles*) та видра річкова (*Lutra lutra*). Предмет досліджень – особливості їхнього живлення на території Львівської області.

Матеріал для даної роботи зібрано протягом 2015–2017 рр. на території Львівської області. Застосовувався метод збору і аналізу екскрементів та вмісту шлунків загиблих тварин. Зокрема зроблено розтин та аналіз 59 шлунків та 9 зразків екскрементів. Збір копрологічного матеріалу проведено з урахуванням особливостей поведінки кожного виду. Аналіз екскрементів проводили за загальноприйнятою методикою (Полушина, 1955). Дослідження вмісту шлунків мертвих тварин (переважно тварини, загиблі на автошляхах) проводилося наступним чином. Із мертвої тварини від травного тракту відділявся шлунок і розміщувався у скляний ексікатор. Далі відділявся вміст шлунку, який консервували у 70% розчині спирту. Збереження матеріалу здійснювали у герметично закритій посудині до проведення визначення фрагментів харчових решток з використанням мікроскопа чи біокуляра (Смелов, 1985). Визначення фрагментів харчових решток проводилося за загальноприйнятою методикою з допомогою спеціалізованих визначників (Кузнецов, 1974; Мамаєв и др., 1976; Кисин и др., 1984; Доброчаєва и др., 1987).

З огляду на зоогеографічну характеристику Львівська область належить до бореально-лісової та європейської лісостепової зон. На території області знаходиться Головний європейський вододіл, який тягнеться звивистою лінією по горбистих висотах Гологірського пасма, відділяючи річку Дністер та її притоки (басейн Чорного моря) від приток і ріки Західний Буг (басейн Балтійського моря). Лісові масиви зосереджені в Карпатах, а також в західній та північній частині Львівщини. Загалом ліси займають близько 25% площі області (Географічна енциклопедія України, 1991).

Результати та обговорення

Родина куницевих Mustelidae – найчисленніша у ряді хижих. У ній налічується близько 56 видів, із них 11 поширені в Україні. Ми збрали матеріал і проаналізували живлення лише семи

представників даної родини: *Mustella nivalis*, *M. erminea*, *M. putorius*, *Martes foina*, *M. martes*, *Meles meles*, *Lutra lutra*.

Серед вищезгаданих представників нами було проаналізовано найбільше шлунків куниці кам'яної, а саме – 18, через те, що даний вид є об'єктом мисливського полювання. Більшість інших представників були знайдені загиблими на автошляхах Львівщини. Серед них найчисельнішими представниками були ласка – 15 шлунків та куниця лісова – 12 шлунків. Інші види траплялись рідше, зокрема видра річкова – 4 шлунки, 1 зразок екскрементів, тхір лісовий – 3 шлунки, 1 зразок екскрементів, борсук – 2 шлунки, 2 зразки екскрементів, горностай – 2 шлунки. Зазвичай серед досліджених тварин траплялись представники обох статей. Частіше це були самці – 36 екз., рідше самки – 23 екз. Зокрема, *Martes foina* – 10 ♀, 8 ♂; *Mustella nivalis* – 5 ♀, 10 ♂; *Martes martes* – 4 ♀, 8 ♂; *Mustella putorius* – 1 ♀, 2 ♂; *Meles meles* – 1 ♀, 1 ♂; *Lutra lutra* – 4 ♂; *Mustella erminea* – 2 ♂.

В результаті досліджень було встановлено, що представники родини Mustelidae мають досить широкий спектр живлення. Всього нами було зареєстровано 37 типів кормів як рослинного, так і тваринного походження. З'ясовано, що більшість видів куницевих надають перевагу тваринним кормам – 65%, однак значну частину їхнього раціону становлять рослини – 35%. Серед тваринних кормів переважають хребетні, це 59% (20 видів), і найрідше траплялись безхребетні тварини – 6%, які були представлені комахами і молюсками. Комахи траплялись у зразках харчування куниць кам'яної та лісової, молюски – у тхора чорного та видри річкової.

Очевидно, що важливою частиною раціону куницевих є хребетні тварини. Серед них переважають Mammalia (54%), Aves (19%) та Pisces (17%) трапляються рідше, ще рідше – Amphibia і Reptilia, які разом становлять 10%.

Савці – це важливий компонент раціону куницевих, який був найчисленнішим класом у досліджуваних матеріалах, – понад 8 видів, що складає 54%. Найчастіше в досліджуваних зразках було знайдено залишки мишоподібних гризунів, зокрема полівки звичайної (*Microtus arvalis*) – 16%. Рідше реєструвалась миша лісова (*Sylvaemus sylvaticus*) – 6%, вивірка звичайна (*Sciurus vulgaris*) – 6% і щур сірий (*Rattus norvegicus*) – 3%. Хом'як звичайний (*Cricetus cricetus*), щур водяний (*Arvicola amphibius*), заєць сірий (*Lepus europaeus*) та кіт свійський (*Felis catus*) – траплялись лише поодинокі реєстрації. Також велика частка гризунів – 15%, яких не вдалося визначити.

Ще один клас хребетних, яким надають перевагу куницеві, – птахи. Зокрема, у дослідних зразках було виявлено 6 видів птахів: сич хатній (*Athene noctua*), синиця велика (*Parus major*), курка домашня (*Gallus domesticus*), дрізд чорний (*Turdus merula*), сорока (*Pica pica*), крижень (*Anas platyrhynchos*). У двох зразках було знайдено фрагменти пір'я, але вид визначити не вдалося. Однак, харчуються птахами не всі види куницевих, наприклад, у зразках живлення борсука та видри цього класу хребетних зареєстровано не було. З'ясовано, що найчастіше на птахів полює куниця кам'яна.

Риби були зареєстровані лише в зразках живлення видри річкової. Представлені вони шістьма видами: ротан (*Perccottus glenii*) – 4%, окунь (*Perca fluviatilis*) – 4%, колючка триголкова (*Gasterosteus aculeatus*) – 2%, карась (*Carassius sp.*) – 2%, щука (*Esox lucius*) – 3% та вівсянка (*Leucaspis delineatus*) – 2%.

Амфібії траплялись лише у раціоні ласки та видри, а плазуни у раціоні куниці лісової й ласки. Із плазунів у двох випадках були ящірки прудкі (*Lacerta agilis*) і у зразках видри – вуж звичайний (*Natrix natrix*).

Серед рослинних кормів у раціоні представників родини Куницевих переважали сухі плоди – 59%, які представлені 2 видами – пшениця (10%) і соняшник (10%), травою та іншими об'єктами, які не було визначено. Сухі корми траплялися майже в кожному зразку харчування куниці кам'яної, цікаво, що в одному екземплярі пшениця була пророщеною. Також у шлунку борсука була виявлена велика кількість насіння соняшника. Соковиті плоди трапляються рідше (41%), але їх видовий склад більший, а саме 6 видів. Серед них переважали плоди яблуні (*Malus domestica*) – 36% та груші (*Pyrus communis*) – 29%, також траплялись плоди терену (*Prunus spinosa*) – 14% і рідше – калини (*Viburnum opulus*), глоду (*Crataegus sp.*) та винограду дикого (*Parthenocissus tricuspidata*) – по 7%. Дуже часто в зразках траплялась трав'яна рослинність, яка становить 54% від усіх сухих плодів, а також об'єкти рослинного походження, які не вдалось визначити (26%).

Загальновідомо, що представники родини Куницевих, незважаючи на свою приналежність до хижих, переважно є еврифагами (Владимирова, Мозговой, 2010; Гептнер, 1967; Данилов, Туманов,

1976; Токарский, 2001; Кондратенко, 2005). Проте кожен вид з цієї родини має свої харчові особливості і споживає різні типи кормів у різних співвідношеннях (рис. 1).

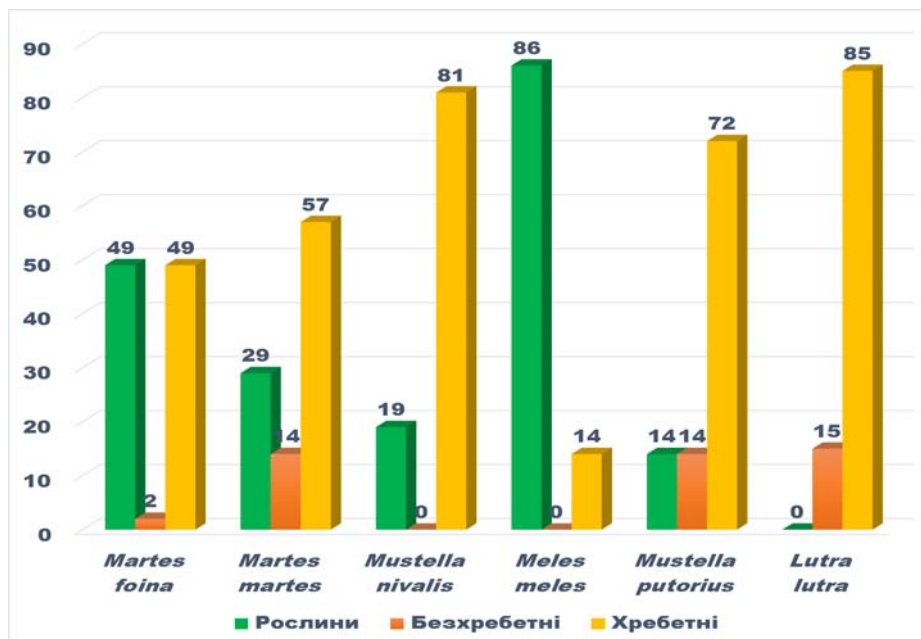


Рис. 1. Відсотковий склад кормів по кожній дослідженій видовій вибірці представників родини Mustelidae

Куниця кам'яна харчується рослинами і хребетними тваринами в однакових співвідношеннях – по 49%. Безхребетні становлять лише 2% її раціону. Куниця лісова також переважно харчується хребетними – 57%, проте у її раціоні менший відсоток рослинних кормів – 29% і більше безхребетних – 14%. Ласка, типовий хижак, що харчується переважно хребетними – 81%, рослинні корми в її раціоні становлять лише 19%. Безхребетних в наших зразках не було виявлено. Борсук – один із представників, що надає перевагу рослинним кормам, в його раціоні вони становлять 86%, хребетні тварини – 14%. В опрацьованих нами зразках безхребетні були відсутні. Хоча, за даними І.Дикого, безхребетні тварини складають майже 40% від раціону виду (Дикий, Дика, 2005). Отже, ми не можемо стверджувати, що цей вид надає перевагу саме рослинним кормам. Тхір чорний – типовий хижак, який полює на хребетних, які становлять в його раціоні 72%. Рослинні корми та безхребетні в раціоні тхора мають однакове співвідношення – по 14%. Видра річкова – єдина з родини куницевих, в раціоні якої нами не було зафіксовано решток рослин. Харчується лише тваринами, найчастіше хребетними – 85%, а саме рибами, рідше – безхребетними – 15%.

В ході роботи ми спробували встановити сезонні особливості живлення родини куницевих. Оскільки для цього потрібна велика вибірка, було проаналізовано дані по видам, зразки яких траплялися найчастіше, це куниця кам'яна та ласка.

Було встановлено, що восени *M. foina* живиться переважно рослинами – 55% і трохи менше тваринними кормами – 45%. Однак, цікавим фактом є те, що і в зимовий період у раціоні особин виду переважали рослинні корми (антропогенного характеру) – 60%, серед яких – терен, яблуко та груша. Так як *M. foina* часто живе поруч з людиною, переважно на горищах, то може харчуватись рослинними запасами людей, що для них більш вигідно, ніж полювати на хребетних, яких було в зимовий період зареєстровано менше, ніж восени – 39%. У весняний період ми отримали найменше зразків живлення куниці кам'яної. У них переважали хребетні – 66%, також були відмічені рештки комах – 17% та рослини – 17%.

M. nivalis надає перевагу кормам тваринного походження, в усі пори року хребетні тварини становлять вагому частку її раціону. Восени особини виду живляться хребетними тваринами – 83% та рослинними кормами – 17%. В зимовий період, за результатами наших досліджень, ласка

вживає виключно тваринні корми. Весною частота трапляння у зразках хребетних тварин зменшується до 60% і частіше з'являються рештки рослин – 40%.

В результаті досліджень встановлено, що незважаючи на свою приналежність до хижаків, кожен вид з родини Mustelidae має свої харчові особливості і споживає різні типи кормів у різних співвідношеннях. Однак більшість видів куницевих надають перевагу тваринним кормам (65%), а частину їхнього раціону становлять рослини (35%). В залежності від наявності того чи іншого корму види можуть змінювати свій раціон, чим і пристосувались до найрізноманітніших умов існування, і є невід'ємними компонентами біоценозів. Зокрема, куниця кам'яна здатна змінювати свій раціон відповідно до сезону, на противагу ласці, у якої раціон відносно стабільний протягом року. *M. foina* завдяки здатності харчуватися рослинними кормами більш пристосована до урбоценозів, що підтверджено нашою вибіркою. В раціоні ласки, тхора і видри основну роль відіграють хребетні тварини – понад 70%. Встановлено, що представники родини Mustelidae є важливими регуляторами чисельності мишоподібних гризунів, особливо полівок, які становлять 10% їхнього раціону.

Список літератури

- Абелентцев В.І. Ссавці. Куницеви // Фауна України. – Т.1, вип.3. – К., 1968. – 312с. /Abelentsev V.I. Ssavtsi. Kunytsyevi // Fauna Ukrainy. – Т.1, вып.3. – К., 1968. – 312s./
- Владимирова Э.Д., Мозговой Д.П. Зимняя экология лесной куницы (*Martes martes* L.) в волжской пойме напротив г. Самара // Экология. – 2010. – Вып.4. – С. 298–304. /Vladimirova E.D., Mozgovoy D.P. Zimnyaya ekologiya lesnoy kunitsy (*Martes martes* L.) v volzhskoy poyme naprotiv g. Samara // Ekologiya. – 2010. – Vyp.4. – S. 298–304./
- Ганас Р., Дикий І. Особливості живлення деяких представників родини Мустелові (Mustelidae) Заходу України // Молодь і поступ біології: IX Міжнар. наук. конф. студентів і аспірантів: збірник тез. – Львів, 2013. – С. 242–243. /Ganas R., Dykyi I. Osoblyvosti zhivlennya deyakykh predstavnykiv rodyny Mustelovi (Mustelidae) Zakhodu Ukrainy // Molod' i postup biologiyi: IX Mizhnar. nauk. konf. studentiv i aspirantiv: zbirnyk tez. – L'viv, 2013. – S.242./
- Географічна енциклопедія України: в 3 т. / «Українська Радянська Енциклопедія» ім. М.П.Бажана. – К., 1991. – Т.3: П–Я. – С. 572–573. /Geografichna entsyklopediya Ukrainy: v 3 t. / "Ukrains'ka Radyans'ka Entsiklopediya" im. M.P.Bazhana. – K., 1991. – T.3: P–Ya. – S. 572–573./
- Гептнер В.Г. Млекопитающие Советского Союза. Т.2, ч.1. Морские коровы и хищные. – Москва: Высшая школа, 1967. – С. 491–604. /Geptner V.G. Mlekopitayushchiye Sovetskogo Soyuz. T.2, ch.1. Morskiye korovy i khishchnyye. – Moskva: Vysshaya shkola, 1967. – S. 491–604./
- Данилов П.И., Туманов И.Л. Куны Северо-Запада СССР. – Л.: Наука (Ленингр. отд.), 1976. – С. 3–256. /Danilov P.I., Tumanov I.L. Kun'i Severo-Zapada SSSR. – L.: Nauka (Leningr. otd.), 1976. – S. 3–256./
- Дикий І. Борсук (*Meles meles* L., 1758) на заході України (морфологія, поширення, екологія, охорона). Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Київ, 2005. – 20с. /Dykyi I. Borsuk (*Meles meles* L., 1758) na zakhodi Ukrainy (morfologiya, poshyrennya, ekologiya, okhorona). Avtoref. dys. ... kand. biol. nauk. – Kyiv, 2005. – 20s./
- Дикий І., Дика О. Живлення борсука на території Західної України // Науковий вісник Ужгородського університету, серія біологія. – 2005. – Вип.17. – С. 42–49. /Dykyi I., Dyka O. Zhivlennya borsuka na terytorii Zakhidnoi Ukrainy // Naukovyy visnyk Uzhgorodsk'ogo universytetu, seriya biologiya. – 2005. – Vyp.17. – S. 42–49./
- Доброчаева Д.Н., Котов М.И., Прокудин Ю.Н. и др. Определитель высших растений Украины. – К.: Наук. думка, 1987. – 548с. /Dobrochayeva D.N., Kotov M.I., Prokudin Yu.N. i dr. Opredelitel' vyssh'ykh rasteniy Ukrainy. – K.: Nauk. dumka, 1987. – 548s./
- Загороднюк І. Контрольний список теріофауни України // Ссавці України під охороною Бернської конвенції / За ред. І.В.Загороднюка. – К., 1999. – С. 202–210. (Праці Теріологічної школи. Вип.2). /Zagorodnyuk I. Kontrol'nyy spysok teriofauny Ukrainy // Ssavtsi Ukrainy pid okhonoouy Berns'koyi konventsiiyi / Za red. I.V.Zagorodnyuka. – K., 1999. – S. 202–210. (Pratsi Teriologichnoi shkoly. Vyp.2)/
- Кисин М.В., Булышева Л.К., Мамотюк М.Л., Разоренова О.И. Волосы животных как объект судебно-биологической экспертизы. – М.: ВНИИ МВД СССР, 1984. – 115с. /Kisin M.V., Bulysheva L.K., Mamotyuk M.L., Razorenova O.I. Volosy zhyvotnykh kak ob'ekt sudebno-biologicheskoy ekspertizy. – M.: VNII MVD SSSR, 1984. – 115s./
- Кондратенко О. Історія досліджень мікротеріофауни регіону Донецько-Донських і Донецько-Приазовських степів. 2005. – С. 8–17. /Kondratenko O. Istoriya doslidzhen' mikroteriofauny regionu Donets'ko-Dons'kykh i Donets'ko-Pryazovs'kykh stepiv. 2005. – S. 8–17./
- Корнеев О. П., Кричевська Ц. Ю. Особливості живлення борсука на Україні // Вісн. Київ. ун-ту. Сер. біол. – 1964. – №6. – С. 121–124. /Korneyev O.P., Krychevs'ka Ts.Yu. Osoblyvosti zhivlennya borsuka na Ukraini // Visn. Kyiv. un-tu. Ser. biol. – 1964. – No. 6. – S. 121–124./
- Кузнецов Б.А. Определитель позвоночных животных фауны СССР. Млекопитающие, Ч.3. Пособие для учителей. – М.: «Просвещение», 1975. – 208с. /Kuznetsov B. A. Opredelitel' pozvonochnykh zhyvotnykh fauny SSSR. Mlekopitayushchiye, Ch.3. Posobiye dlya uchiteley. – M.: "Prosveshheniye", 1975. – 208s./

- Мамаев Б.М., Медведев Л.Н., Правдич Ф.Н. Определитель насекомых европейской части СССР: Учеб. пособие для студентов биол. специальностей пед. ин-тов. – М.: Просвещение, 1976. – 304с. /Mamayev B.M., Medvedev L.N., Pravdich F.N. Opredelitel' nasekomykh yevropeyskoy chasti SSSR: Ucheb. posobiye dlya studentov biol. spetsial'nostey ped. in-tov. – M.: Prosveshcheniye, 1976. – 304s./
- Марців М. Шельвінський В. Дослідження живлення куниці кам'яної на території Львівської області // XIII Міжнар. наук. конф. студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології»: збірник тез. – Львів, 2017. – С. 155–156. /Martsiv M., Shel'vins'kyy V. Doslidzhennya zhyvlennya kunytsi kam'yanoi na terytorii L'vivs'koi oblasti // XIII Mizhnar. nauk. konf. studentiv i aspirantiv «Molod' i postup biologiyi»: zbirnyk tez. – L'viv, 2017. – S. 155–156./
- Михеев А.В. Сравнительная характеристика питания куниц рода *Martes* в лесных экосистемах степной зоны Украины // Вестник зоологии. – 2002. – Т.36, №3. – С. 45–54. /Mikheyev A.V. Sravnitel'naya kharakteristika pitaniya kunits roda *Martes* v lesnykh ekosistemakh stepnoy zony Ukrainy // Vestnik zoologii. – 2002. – T.36, no. 3. – S. 45–54./
- Міхеев О. Порівняльна характеристика живлення ласки (*Mustela nivalis* L.) і горностає (*M. erminea* L.) в лісових екосистемах південного сходу України // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. – 2011. – Вип.55. – С. 110–118. /Mikheyev O. Porivnyal'na kharakterystyka zhyvlennya lasky (*Mustela nivalis* L.) i gomostaya (*M. erminea* L.) v lisovykh ekosistemakh pivdenного skhodu Ukrainy // Visn. L'viv. un-tu. Ser. biol. – 2011. – Vyp.55. – S. 110–118./
- МСОП. Категорії та критерії червоного списку МСОП: Версія 3.1. 2-ге вид. Пер. з англ. – Київ, 2017. – 36с. /MSOP. Kategorii ta kryterii chervonogo spysku MSOP: Versiya 3.1. 2-ge vyd. Per. z angl. – Kyiv, 2017. – 36s./
- Полушина Н.А. Экология, распространение и народнохозяйственное значение семейства куньих западных областей Украинской ССР. Автореф. дис. ... канд. биол. наук / Львов. гос. ун-т им. И.Франко. – Львов, 1955. – 14с. /Polushina N.A. Ekologiya, rasprostraneniye i narodnokhozyaystvennoye znacheniye semeystva kun'ikh zapadnykh oblastey Ukrainskoy SSR. Avtoref. dis. ... kand. biol. nauk / L'vov. gos. un-t im. I.Franko. – L'vov, 1955. – 14s./
- Смелов В.А. Питание и некоторые морфологические особенности пищеварительной системы куньих (Mustelidae). Дисс... канд. биол. наук / 03.00.08. – Петрозаводск, 1985. – 242с. /Smelov V.A. Pitaniye i nekotoryye morfologicheskiye osobennosti pishhevaritel'noy sistemy kun'ikh (Mustelidae). Diss... kand. biol. nauk / 03.00.08. – Petrozavodsk, 1985. – 242c./
- Стельмах С. Біотопи, сховища та живлення куниці лісової (*Martes martes* L.) на Розточчі (Львівська область) // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. – 2013. – Вип.63. – С. 35–43. /Stel'makh S. Biotopy, skhovyshha ta zhyvlennya kunytsi lisovoyi (*Martes martes* L.) na Roztochchi (L'vivs'ka oblast') // Visn. L'viv. un-tu. Ser. biol. – 2013. – Vyp.63. – S. 35–43./
- Татаринов К.А. Звірі західних областей України. – К.: Вид-во АН УРСР, 1956. – 188с. /Tatarinov K.A. Zviri zakhidnykh oblastey Ukrainy. – K.: Vyd-vo AN URSR, 1956. – 188s./
- Татаринов К.А. Фауна хребетних заходу України. – Львів: Вид-во Львів. ун-ту, 1973. – С. 149–150. /Tatarinov K.A. Fauna khrebetnykh zakhodu Ukrainy. – L'viv: Vyd-vo L'viv. un-tu, 1973. – S. 149–150./
- Токарський В.А. Степной хорек (*Mustela eversmanni*) в степном биоценозе Восточной Украины // Вестник зоологии. – 2001. – Вип.35.3. – С.78. /Tokarskiy V.A. Stepnoy khorek (*Mustela eversmanni*) v stepnom biotsenozе Vostochnoy Ukrainy // Vestnik zoologii. – 2001. – Vyp. 35.3. – S.78./
- Червона книга України. Тваринний світ / За ред. І.А.Акімова. – К.: Глобалконсалтинг, 2009. – 600с. /Chervona knyga Ukrainy. Tvarynnyy svit / Za red. I.A.Akimova. – K.: Globalkonsalting, 2009. – 600s./
- Червона книга України. Тваринний світ / Під ред. М.М.Щербака. – К.: Укр. енциклопедія, 1994. – 464с. /Chervona knyga Ukrainy. Tvarynnyy svit / Pid red. M.M.Shcherbaka. – K.: Ukr. entsyklopediya, 1994. – 464s./
- Brangi A. Seasonal changes of trophic niche overlap in the stone marten (*Martes foina*) and the red fox (*Vulpes vulpes*) in a mountainous are of the northern Apennines // Hystrix It. J. Mamm. – 1995. – Vol.7 (1–2). – P. 113–118.
- Lanszki J. Feeding habits of stone martens in a Hungarian village and its surroundings // Folia Zoologica. – 2003. – Вип. 52. – P. 367–377.
- Lanszki J., Kormendi S., Hancz C., Zalewski A. Feeding habits and trophic niche overlap in a Carnivora community of Hungary // Acta Theriologica. – 1999. – Vol.44. – P. 429–442.
- Postuszny M., Pilot M., Goszczyński J., Gralak B. Diet of sympatric pine marten (*Martes martes*) and stone marten (*Martes foina*) identified by genotyping of DNA from faeces // Annales Zoologici Fennici. – 2007. – Vol.44 (4). – P. 269–284.
- Tokarsky V.A. Features of badger (*Meles meles* L., 1758) nutrition in the Kharkiv Region // The Journal of V.N.Karazin Kharkiv National University. Series "Biology". – 2014. – Issue 22. – P. 129–132.

Представлено: П.Б.Хоєцький / Presented by: P.B.Hoets'ky
Рецензент: В.А.Токарський / Reviewer: V.A.Tokarsky
Подано до редакції / Received: 15.11.2017

УДК: 957.851

Парадокс відтворення триплоїдних *Pelophylax esculentus* у геміклональних популяційних системах Брусівки (Донецька область) та Кременної (Луганська область)

М.О.Дрогваленко, Р.М.Макарян, О.В.Бірюк, О.В.Коршунов, Д.А.Шабанов

Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна (Харків, Україна)
d.a.shabanov@gmail.com

Європейські зелені жаби групи *Pelophylax esculentus* complex представляють собою значний інтерес як приклад міжвидової гібридизації та поліплоїдизації. Диплоїдні та триплоїдні гібридні жаби *Pelophylax esculentus* здатні відтворюватися, схрещуючись з особинами батьківських видів за рахунок явища геміклонального спадкування. У Сіверсько-Донецькому центрі різноманіття *Pelophylax esculentus* complex на сході України зареєстровані геміклональні популяційні системи (ГПС) різних типів, в тому числі не описаний раніше тип ГПС. Нами був досліджений склад геміклональної популяційної системи (ГПС) зелених жаб оз. Подписочного (Луганська область) та вперше визначений склад ГПС заплавного озера біля с. Брусівка (Донецька область) за допомогою цитометрії еритроцитів та каріологічного аналізу. Виявилося, що обидві ці ГПС складаються виключно з представників озерної жаби *Pelophylax ridibundus* обох статей, а також триплоїдних самиць їстівної жаби *Pelophylax esculentus* з геномною композицією LLR (два геноми *Pelophylax lessonae* та один геном *Pelophylax ridibundus*). За існуючими даними, триплоїдні *P. esculentus* Сіверсько-Донецького центру різноманіття *Pelophylax esculentus* complex продукують лише гаплоїдні гамети. У такому випадку, залишається неясним механізм відтворення самиць-LLR у даних ГПС.

Ключові слова: *Pelophylax esculentus*, триплоїди, геміклональна популяційна система, еритроцити, каріологічний аналіз, цитометрія.

The paradox of the reproduction of triploid *Pelophylax esculentus* in the hemiclinal population systems in Brusivka (Donetsk region) and Kreminna (Lugansk region)

M.O.Drohvalenko, R.M.Makaryan, O.V.Biriuk, O.V.Korshunov, D.A.Shabanov

European water frogs from *Pelophylax esculentus* complex provide a unique interest as interspecies hybridization and polyploidization example. Diploids and triploids of *Pelophylax esculentus* can reproduce in crossings with parental species due to hemiclinal heredity phenomenon. Different types of hemiclinal population systems (HPS) has been registered in Siversky Donets diversity center of *Pelophylax esculentus* complex on the Eastern Ukraine, even HPS of type not described early. The composition of the hemiclinal population system (HPS) of water frogs from Lake Podpisochne (Lugansk region) was examined, and the composition of HPS from Brusivka village vicinity (Donetsk region) was first defined using erythrocyte cytometry and caryological analysis. Both of the HPS are composed of both sexes of marsh frog *Pelophylax ridibundus* and triploid females of edible frog *Pelophylax esculentus* with genomic compound LLR (two *Pelophylax lessonae* and one *Pelophylax ridibundus* genomes) only. According to the current data triploids in Siversky Donets diversity center of *Pelophylax esculentus* complex can produce only haploid gametes. Thus, it is unclear how LLR females reproduce in these HPS.

Key words: *Pelophylax esculentus*, triploids, hemiclinal population system, erythrocytes, caryological analysis, cytometry.

Парадокс воспроизводства триплоидных *Pelophylax esculentus* в геміклональных популяционных системах зеленых лягушек Брусовки (Донецкая область) и Кременной (Луганская область)

Н.А.Дрогваленко, Р.Н.Макарян, О.В.Бірюк, А.В.Коршунов, Д.А.Шабанов

Европейские зеленые лягушки группы *Pelophylax esculentus* complex представляют значительный интерес как пример природной межвидовой гибридизации и полиплоидизации. Диплоидные и триплоидные гибридные лягушки *Pelophylax esculentus* способны воспроизводиться, скрещиваясь с особями родительских видов за счет явления геміклонального наследования. В Северско-Донецком

центре разнообразия *Pelophylax esculentus* complex на востоке Украины зарегистрированы гемиклональные популяционные системы (ГПС) различных типов, в том числе ранее не описанный в литературе тип ГПС. Нами был исследован состав гемиклональной популяционной системы зелёных лягушек оз. Подпесочного (Луганская область) и впервые определён состав ГПС пойменного озера около с. Брусовка (Донецкая область) с помощью цитометрии эритроцитов и кариологического анализа соматических тканей. Выяснилось, что обе эти ГПС состоят исключительно из представителей озерной лягушки *Pelophylax ridibundus* обоих полов, а также триплоидных самок съедобной лягушки *Pelophylax esculentus* с геномной композицией LLR (два генома *Pelophylax lessonae* и один геном *Pelophylax ridibundus*). По существующим данным, триплоидные *P. esculentus* в Северско-Донецком центре разнообразия *Pelophylax esculentus* complex способны производить лишь гаплоидные гаметы. В таком случае, остаётся неясным механизм воспроизводства LLR-самок в данных ГПС.

Ключевые слова: *Pelophylax esculentus*, триплоиды, гемиклональная популяционная система, эритроциты, кариологический анализ, цитометрия.

Введение

Pelophylax esculentus (Linnaeus, 1758) – гибрид двух видов европейских зелёных лягушек: *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) и *Pelophylax lessonae* (Camerano, 1882) (Berger, Roguski, 1978). Воспроизводится он путём клональной передачи в гаметах одного или двух геномов родительских видов. В типичном случае в гаметогенезе у диплоидных гибридов один из родительских геномов элиминируется из клеток зародышевой линии до мейоза (Graf, Mueller, 1979; Tunner, Heppich, 1981; Heppich et al., 1982), а второй проходит эндоредупликацию и передается в гаметы клонально (Tunner, 1980; Tunner, Tunner-Heppich, 1981; Dedukh et al., 2017). Биосистемы, в которых происходит воспроизводство гибридных лягушек, были названы гемиклональными популяционными системами, ГПС (Шабанов та ін., 2009; Шабанов, Литвинчук, 2010; Шабанов, 2015).

Состав ГПС тесно связан с особенностями гаметогенеза входящих в их состав *P. esculentus* (Plötner, 2005). Описаны формы гибридов, производящих гаметы обоих родительских видов по отдельности или одновременно, диплоидные гаметы разного геномного состава, смесь гаплоидных и диплоидных гамет, а также гаметы с частично рекомбинантными геномами (Biriuk et al., 2016; Dedukh et al., 2017). Потомство с двумя клональными геномами одного вида чаще всего оказывается нежизнеспособным, вероятно, вследствие накопленных изменений в клональных геномах. Высказано предположение (Шабанов, 2015), что, поскольку нежизнеспособными оказываются как особи, имеющие две копии одного и того же генома, так и особи, имеющие разные клональные геномы одного вида (Plötner, 2005), само это снижение жизнеспособности является следствием изменений клональных геномов, вызванных отбором на повышение устойчивости их клональной передачи из поколения в поколение.

Некоторые ГПС состоят только из диплоидных лягушек: гибридов и особей родительского вида или обоих видов (Plötner, 2005; Herczeg et al., 2017). Обозначая символом R- наличие в ГПС *P. ridibundus*, L- – *P. lessonae*, а E- – диплоидных *P. esculentus*, мы можем обозначить такие системы как L-E-ГПС, R-E-ГПС и L-E-R-ГПС. Обсуждается возможность устойчивого существования E-ГПС, состоящих исключительно из диплоидных гибридов (Шабанов, 2015; Макарян та ін., 2016).

Многие ГПС содержат триплоидных *P. esculentus*, доля которых из общего числа гибридов может колебаться от 3 до 100%. Триплоиды могут быть представлены двумя формами: LLR и LRR (геном *P. lessonae* обозначают L, а геном *P. ridibundus* – R), а также одним или обоими полами (Jakob, 2007; Christiansen, 2009; Christiansen et al., 2010; Pruvost et al., 2013).

Указывая типы ГПС, наличие триплоидов (полиплоидов) *P. esculentus* обозначают Ер-, а, к примеру, представленность их только самками – Ерf. Появление триплоидов в разных регионах было, вероятно, независимым (Pruvost et al., 2013, 2015). Об этом свидетельствуют различные механизмы их воспроизводства

В большинстве случаев триплоиды проживают совместно с диплоидными гибридами в L-E-Ер-ГПС или R-E-Ер-ГПС, а в некоторых случаях даже только с диплоидными гибридами в E-Ер-ГПС и, как правило, производят рекомбинантные гаплоидные гаметы; в клетках зародышевой линии рекомбинируют два генома одного вида, геном другого вида элиминируется (Christiansen, Reyer, 2009). В редких случаях были отмечены в небольшом количестве LL-яйцеклетки у самки LLR и амфиспермия у самца LRR (Biriuk et al., 2016). Известен случай производства триплоидной

самкой смеси гаплоидных и диплоидных гамет (Christiansen et al., 2005; Christiansen, 2009). Триплоиды в таких системах играют роль поставщика рекомбинантных геномов и воспроизводятся за счёт диплоидных гибридов, производящих клональные диплоидные гаметы LR. Сами диплоидные гибриды воспроизводятся за счёт гаплоидных гамет, производимых ими же или особями родительского вида (Pruvost et al., 2015; Christiansen, Reyer, 2009). ГПС такого типа распространены в Северо-Западной и Восточной Европе (Christiansen, 2009; Dedukh et al., 2017).

В некоторых ГПС Центральной Европы триплоиды (только самцы) производят клональные диплоидные гаметы (копии пары геномов одного вида из своего генотипа). Они воспроизводятся за счёт форм с гаплоидными гаметами (родительские виды и гибриды LR) и проживают совместно с ними (Pruvost et al., 2015).

Из родительских видов в бассейне реки Северский Донец встречается только *P. ridibundus* (Шабанов, 2015). На территории бассейна обнаружено высокое разнообразие типов ГПС: от полностью диплоидных R-E-ГПС (Шабанов та ін., 2017) до различных систем с триплоидами в составе: R-E-Ер-ГПС, R-E-Ерf-ГПС, R-Ер-ГПС и т. д. (Borkin et al., 2004, 2006; Боркин и др., 2005; Mezhdzerin et al., 2010; Suryadna, 2010; Шабанов, 2015). Высокое разнообразие ГПС зеленых лягушек в бассейне Северского Донца стало основанием для описания здесь Северско-Донецкого центра разнообразия *Pelophylax esculentus* complex (Шабанов та ін., 2009; Шабанов, Литвинчук, 2010; Dedukh et al., 2015). В зависимости от характера преобладающих типов ГПС (в благоприятных для лягушек условиях) в Северско-Донецком центре разнообразия выделено три субрегиона: R-E-Ер-субрегион, R-E-субрегион и R-Ерf-субрегион (Шабанов и др., 2017).

Изучение триплоидных *P. esculentus* из Северско-Донецкого центра разнообразия зеленых лягушек с использованием цитометрического анализа спермы, электрофореза белка LDH-1 яйцеклеток и анализа хромосом типа ламповых щёток в яйцеклетках показало следующее (Dedukh et al., 2015, 2017; Biriuk et al., 2016):

- большинство самцов LRR производят гаплоидные гаметы с клональным геномом R, часть (33%) стерильны; отмечен 1 случай амфиспермии;
- самцы LLR очень редки, производят гаметы с L-геномом и зачастую обладают пониженной фертильностью;
- большинство самок LRR передают потомству R-геном; у двух особей из одного местообитания отмечена смесь ооцитов с разными геномами;
- большинство самок LLR производят икру с геномом L (наличие R-генома в ооцитах зафиксировано лишь в одном случае);
- воспроизводство самих триплоидов в бассейне Северского Донца, по-видимому, обеспечивается диплоидными гаметами диплоидных гибридов.

Диплоидные гаметы у триплоидов в исследованных местообитаниях не обнаружены.

В озере Подпесочном (окрестности г. Кременная в Луганской области) в 2010 году российский батрахолог Г.А.Лада зарегистрировал ГПС, состоящую из особей обоих полов *P. ridibundus* и LLR-самок *P. esculentus*. 11 лягушек из данной ГПС проверены методом проточной ДНК-цитометрии: 2 определены как диплоидные *P. ridibundus*, 9 как триплоидные *P. esculentus* с генотипом LLR. Диплоидных гибридов и самцов-триплоидов обнаружено не было. Вторая такая же система отмечена около г. Северодонецка Луганской области (Biriuk et al. 2016). ГПС подобного состава также были ранее описаны на западе Ростовской области России (Borkin et al. 2006).

В пойменном озере в окрестностях с. Брусовка (Донецкая область) нами была зарегистрирована ГПС, имеющая, предположительно, такой же состав (самки *P. esculentus* имеют LLR-композицию геномов – Д.В.Дедух, устное сообщение). В данном локалитете исследования ранее не проводились.

На основании имеющейся информации о гаметогенезе триплоидов можно предположить, что самки LLR в этих двух ГПС передают в яйцеклетках геном L. В таком случае воспроизводство самок LLR в ГПС такого состава нельзя объяснить ни одним из известных путей образования триплоидов.

В качестве гипотез, объясняющих воспроизводство гибридов в этих ГПС, предполагается удвоение генома L после оплодотворения гаплоидной спермой, несущей геном R (на основании работы Zhang et al., 2015), либо подавление отделения второго полярного тела в последнем мейотическом делении (после слияния со сперматозоидом; Kawahara, 1978). Ни один из таких механизмов не был ранее описан для зелёных лягушек. Нельзя отбрасывать и возможность того,

что LLR-самки в этих локалитетах представляют отдельную линию гибридов и производят диплоидные LL-ооциты.

Целью данной работы являлась проверка состава гемиклональных популяционных систем озера Подпесочного и озёра окрестностей с. Брусовка точными методами.

Материал и методы исследования

Озеро Подпесочное (49,007 N, 38,235 E) представляет собой старицу реки Северский Донец, расположенную на левом берегу, возле боровой террасы. Озеро окружено дубравой, со стороны боровой террасы встречаются ольшаники.

Озёра окрестностей с. Брусовка (49,550 N, 36,300 E) также представляют собой старицы Северского Донца, похожие по условиям на Подпесочное; общепринятых названий не имеют.

Для проверки состава обеих ГПС нами было собрано по две выборки из каждой: во время нереста (июнь) и после него (конец сентября), для исключения возможности участия в размножении других форм зелёных лягушек, объясняющих воспроизводство триплоидов. Сборы проводились в 2016–2017 годах. Общий объём выборок составил 155 лягушек. Выборки формировались случайным образом путём лова руками и сачком ночью с использованием фонаря в типичных для данного комплекса видах местообитаний.

Видовая принадлежность и пол лягушек определялись по комплексу морфологических признаков (Шабанов, 2015).

Определить пloidность у данного комплекса видов можно по длине эритроцитов, которые у триплоидов крупнее (граница составляет 26 мкм) (Бондарева и др., 2012). Измерение средней длины эритроцитов проводится на высушенных мазках крови. Цитометрия эритроцитов была осуществлена для всех выборок.

Для трех неполовозрелых особей из оз. Подпесочного пloidность была проверена также посредством анализа кариологических препаратов, окрашенных нитратом серебра и по Романовскому-Гимзе. Для этого у этих особей были прижизненно взяты фрагменты последней фаланги пальца и перепонки на задней конечности. Методика фиксации, окрашивания и приготовления препаратов была описана ранее (Вегерина и др., 2013; Biriuk et al., 2015). На препаратах оценивали количество ядрышек в ядрах клеток в интерфазе. Позднее для двух из этих особей были получены метафазные пластинки из тканей кишечника. За сутки до фиксации материала животным вводили 0,1 мл 0,04% раствор колхицина. Животных анестезировали с помощью этилацетата.

Результаты и обсуждение

Суммарная выборка из озера Подпесочного составила 76 лягушек, из которых 35 самок, 31 самец и 6 неполовозрелых особей. Из озера около с. Брусовка было поймано в сумме 80 лягушек, из которых 27 самок, 19 самцов и 34 неполовозрелых.

Морфологически определены как *P. esculentus* 28 особей, из которых 12 из озера около с. Брусовка и 16 из озера Подпесочного. Все *P. esculentus* определены как самки. Пол всех неполовозрелых особей *P. esculentus* был проверен по морфологии гонад, в то время как у неполовозрелых *P. ridibundus* пол не определяли. Все *P. esculentus* оказались самками (рис. 1) и в каждом локалитете были сходны между собой по окраске (рис. 2).

Цитометрия эритроцитов показала, что в выборках из обеих ГПС все морфологически определённые как *P. ridibundus* лягушки оказались диплоидами, а морфологически определённые как *P. esculentus* – триплоидами. Были обнаружены по одной особи из каждого локалитета, определённые морфологически как типичные триплоидные *P. esculentus* из данных местообитаний, для которых были характерны близкие к предельным значения длины эритроцитов (26,3 и 26,6 мкм при длине тела 57,3 и 70,2 мм соответственно) (рис. 3).

Пloidность трёх особей *P. esculentus* (оз. Подпесочное) с наименьшей длиной эритроцитов (близкой к граничной для триплоидов) была подтверждена методом кариоанализа. После окрашивания на препаратах были зарегистрированы ядра клеток, несущие 1, 2 или 3 ядрышка (3 ядрышка в 23–31 % от общего числа ядер). Это указывает на то, что данные особи являются триплоидными (рис. 4). Для двух из этих особей были изучены также метафазные пластинки – они содержали 39 хромосом, что соответствует триплоидному набору (для зелёных лягушек $2n=26$, $3n=39$) (рис. 5).

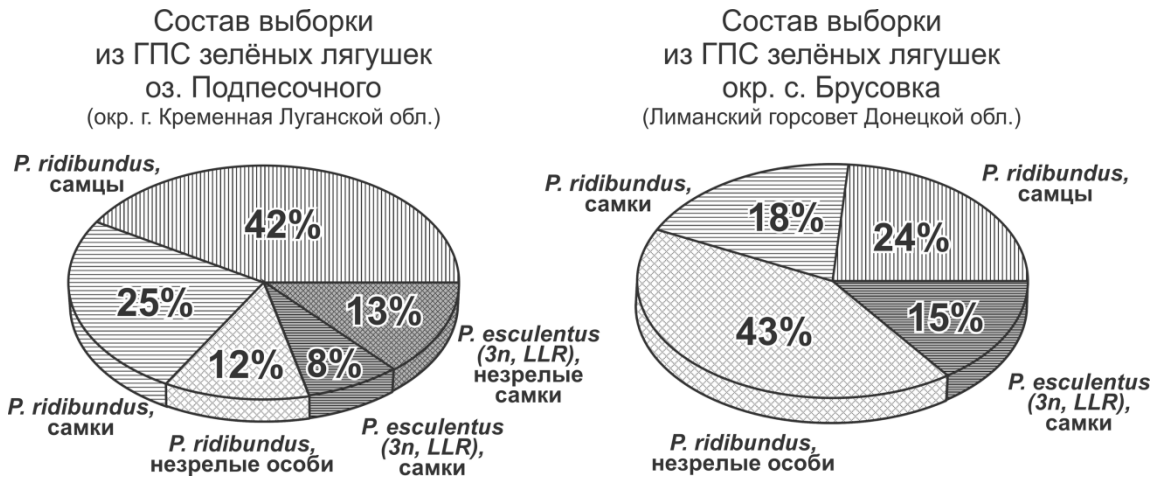


Рис. 1. Доли полов для обоих видов в разных локалитетах



Рис. 2. Триплоидные самки (с геномной композицией LLR) из ГПС зеленых лягушек, населяющих окрестности с. Брусовка (Донецкая область)

Диплоидных гибридов в изученных ГПС не обнаружено. Этот результат является парадоксальным с учетом того, что продукция диплоидных LR-гамет в Северско-Донецком центре разнообразия была описана только для диплоидных *P. esculentus* (Dedukh et al., 2017). Триплоидов другой формы, LRR, которых могли определить морфологически как *P. ridibundus*, не обнаружено. Эти результаты, а также результаты предыдущих исследований (Biriuk et al., 2016), свидетельствуют о том, что ГПС озера Подпесочного состоит из диплоидных *P. ridibundus* обоих полов и триплоидных самок *P. esculentus* (LLR). Новые результаты свидетельствуют о том, что ГПС озера около с. Брусовка имеет такой же состав.

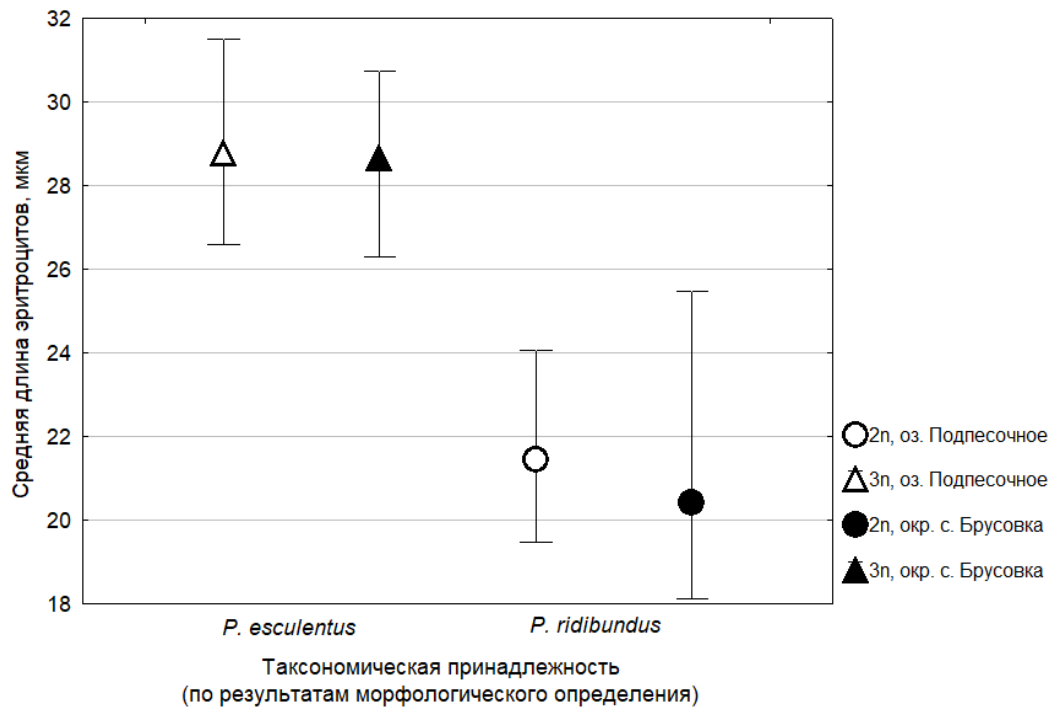


Рис. 3. Размеры эритроцитов изученных групп лягушек. Маркер на графиках – среднее значение длины эритроцитов, отрезки отражают размах значений

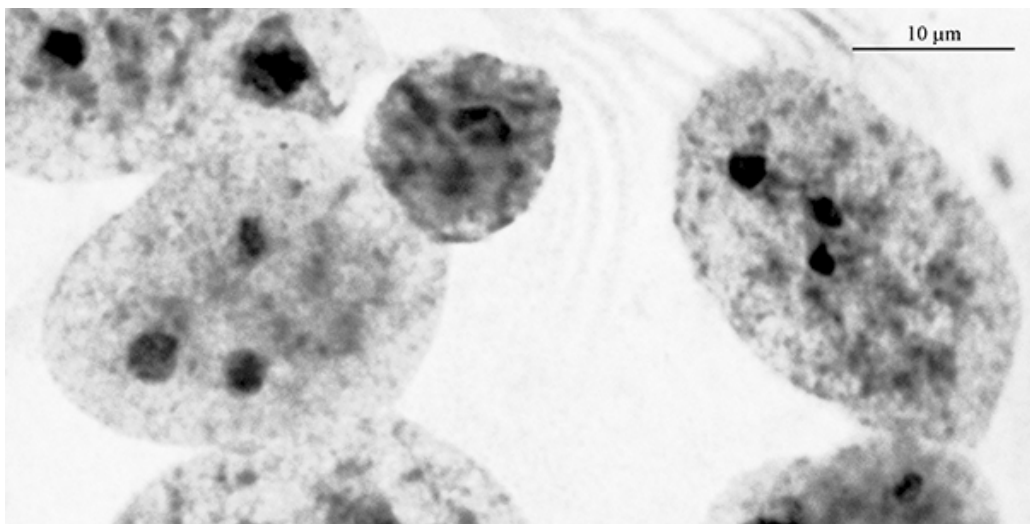


Рис. 4. Ядра соматических клеток *P. esculentus* (оз. Подлесочное), содержащие по 3 окрашенных ядрышка. Аг-окрашивание. Увеличение $\times 1000$



Рис. 5. Метафазна пластинка *P. esculentus* (оз. Подпесочное) с триплоїдним набором хромосом ($3n=39$)

Таким образом, наши исследования подтвердили, что и в окрестностях г. Кременная, и в окрестностях с. Брусовка существуют $R\text{-}^{LLR}Erf\text{-}GPC$, т. е. геміклональные популяционные системы, состоящие из особей родительского вида *P. ridibundus* обоих полов, а также триплоїдных самок *P. esculentus* с геномной композицией LLR (два генома *P. lessonae* и один геном *P. ridibundus*). Согласно существующим представлениям о гаметогенезе триплоїдов в бассейне Северского Донца (только гаплоїдные гаметы; Dedukh et al., 2017), воспроизводство гибридов в этих системах остаётся неясным и требует дальнейших исследований.

Список литературы

- Бондарева А.А., Бибик Ю.С., Самило С.М., Шабанов Д.А. Цитогенетические особенности эритроцитов зеленых лягушек из Северско-Донецкого центра разнообразия *Pelophylax esculentus* complex // Вестник Харьковского национального университета имени В.Н.Каразина. Серия: биология. – 2012. – Вып.15, №1008. – С. 116–123. /Bondareva A.A., Bibik Yu.S., Samilo S.M., Shabanov D.A. Tsitogeneticheskiye osobennosti eritrotsitov zelenykh lyagushek iz Seversko-Donetskogo tsentra raznobraziya *Pelophylax esculentus* complex // Vestnik Khar'kovskogo natsional'nogo universiteta imeni V.N.Karazina. Seriya: biologiya. – 2012. – Vyp.15, no. 1008. – S. 116–123./
- Боркин Л.Я., Зиненко А.И., Коршунов А.В. и др. Массовая полиплоидия в гибридогенном комплексе *Rana esculenta* (Ranidae, Anura, Amphibia) на востоке Украины // Материалы 1-ой конференции Украинского герпетологического общества. – Киев. 2005. – С. 23–26. /Borkin L.Ya., Zinenko A.I., Korshunov A.V. i dr. Massovaya poliploidiya v gibridogenom komplekse *Rana esculenta* (Ranidae, Anura, Amphibia) na vostoке Ukrainy // Materialy 1-oy konferentsii Ukrainского gerpetologicheskogo obschestva. – Kiev. 2005. – S. 23–26./
- Вегерина А.О., Мелешко Е.В., Пырина И.С. и др. Определение соотношения диплоидов и триплоидов среди метаморфов зеленых лягушек в Северско-Донецком центре разнообразия *Pelophylax esculentus* complex // Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія. – 2013. – Вип.18, №1079. – С. 107–113. /Vegerina A.O., Meleshko Ye.V., Pyrina I.S. i dr. Opredeleniye sootnosheniya diploidov i triploidov sredi metamorfov zelenykh lyagushek v Seversko-Donetskom tsentre raznobraziya *Pelophylax esculentus* complex // Visnyk Kharkivs'kogo natsionalnogo universitetu imeni V.N.Karazina. Seriya: biologiya. – 2013. – Vyp.18, no. 1079. – S. 107–113./
- Макарян Р.М., Бірюк О.В., Коршунов О.В. и др. Склад пуголовків зелених жаб (*Pelophylax esculentus* complex) в Іськовому ставі (НПП «Гомільшанські ліси») // Матеріали наукової конференції «Стан і біорізноманіття екосистем Шацького національного природного парку та інших природоохоронних

територій». – Львів: СПОЛОМ, 2016. – С. 61–65. /Makaryan R.M., Biryuk O.V., Korshunov O.V. i dr. Sklad pugolovkiv zelenykh zhab (*Pelophylax esculentus* complex) v Is'kovomu stavi (NPP «Gomil'shans'ki lisy») // Materialy naukovoyi konferentsiyi "Stan i bioriznomanittya ekosystem Shats'kogo natsionalnogo prirodnogo parku ta inshikh pryrodokhoronnykh terytoriy". – L'viv: SPOLOM, 2016. – S. 61–65./

Шабанов Д.А. Эволюционная экология популяционных систем гибридогенного комплекса зеленых лягушек (*Pelophylax esculentus* complex) левобережной лесостепи Украины. Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Днепропетровск: ДНУ, 2015. – 36 с. /Shabanov D.A. Evolyutsionnaya ekologiya populyatsionnykh sistem gibridogenogo kompleksa zelenykh lyagushek (*Pelophylax esculentus* complex) levoberezhnoy lesostepi Ukrainy. Avtoref. dis. ... d-ra. biol. nauk. – Dnepropetrovsk: DNU, 2015. – 36 s./

Шабанов Д.А., Бірюк О.В., Коршунов О.В., Кравченко М.О. Поширення різних типів геміклональних популяційних систем гібридогенного комплексу зелених жаб (*Pelophylax esculentus* complex) у басейні Сіверського Дінця // Матеріали науково-практичної конференції з нагоди 20-річчя створення Національного природного парку «Святі гори». – 2017. – С. 141–146. /Shabanov D.A., Biryuk O.V., Korshunov O.V., Kravchenko M.O. Poshyrennya riznykh typiv gemiklonalnykh populyatsionnykh system gibrydogenogo kompleksu zelenykh zhab (*Pelophylax esculentus* complex) u baseyni Sivers'kogo Dintsya // Materialy naukovo-praktychnoi konferentsii z nagody 20-rlchchya stvorennya Natsional'nogo pryrodnogo parku «Svyati gory». – 2017. – S. 141–146./

Шабанов Д.А., Коршунов О.В., Кравченко М.О. Які ж зелені жаби населяють Харківську область? Термінологічний і номенклатурний аспекти проблеми // Біологія та валеологія. – Вип.11. – Харків: ХДПУ, 2009. – С. 116–125. /Shabanov D.A., Korshunov O.V., Kravchenko M.O. Yaki zh zeleni zhaby naselyayut Kharkivsku oblast? Terminologichny i nomenklaturnyy aspekty problemy // Biologiya ta valeologiya. – Vyp.11. – Kharkiv: KhDPU, 2009. – S. 116–125./

Шабанов Д.А., Литвинчук С.Н. Жизнь без правил или особый способ эволюции? // Природа. Зоология, генетика. 2010. – Вып.3. – С. 29–36. /Shabanov D.A., Litvinchuk S.N. Zhizn' bez pravil ili osobyy sposob evolyutsii? // Priroda. Zoologiya, genetika. 2010. – Vyp.3. – S. 29–36./

Berger L., Roguski H. Triploid F2 progeny of water frogs (*Rana esculenta* complex) // Folia biologica. 1978. – Vol. 26. — P. 135–152.

Biriuk O.V., Usova O.E., Meleshko O.V., Shabanov D.A. Composition and characteristic of subadult water frogs sample (*Pelophylax esculentus* complex) // Research and conservation of European herpetofauna and its environment: *Bombina bombina*, *Emys orbicularis*, and *Coronella austriaca*. 3rd International workshop-conference: Book of abstracts. – Daugavpils University, 2015. – P.8.

Biriuk O.V., Shabanov D.A., Korshunov A.V. et al. Gamete production patterns and mating systems in water frogs of the hybridogenetic *Pelophylax esculentus* complex in north-eastern Ukraine // Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research. – 2016. – Vol. 54, no. 3. — P. 215–225.

Borkin L.J., Korshunov A.V., Lada G.A. et al. Mass occurrence of polyploid green frogs (*Rana esculenta* complex) in eastern Ukraine // Russian Journal of Herpetology. – 2004. – Vol.11, no. 3. – P. 194–213.

Borkin L.J., Lada G.A., Litvinchuk S.N. et al. The first record of mass triploidy in hybridogenic green frog *Rana esculenta* in Russia (Rostov Oblast') // Russian Journal of Herpetology. – 2006. – Vol.13 no. 1. – P. 77–82.

Christiansen D.G. Gamete types, sex determination and stable equilibria of all-hybrid populations of diploid and triploid edible frogs (*Pelophylax esculentus*) // BMC Evolutionary Biology. – 2009. – Vol.9, no. 135. – P. 1754–1768.

Christiansen D.G., Fog K., Pedersen B.V., Boomsma J.J. Reproduction and hybrid load in all-hybrid populations of *Rana esculenta* water frogs in Denmark // Evolution. – 2005. – Vol.59, no. 6. – P. 1348–1361.

Christiansen D.G., Jakob C., Arioli M. et al. Coexistence of diploid and triploid hybrid water frogs: population differences persist in the apparent absence of differential survival // BMC Ecology. – 2010. – Vol.10, no. 14. – P. 1–14.

Christiansen D.G., Reyer H.U. From clonal to sexual hybrids: genetic recombination via triploids in all-hybrid populations of water frogs // Evolution. – 2009. – Vol.63, no. 7. – P. 1754–1768.

Dedukh D., Litvinchuk S., Rosanov J. et al. Optional endoreplication and selective elimination of parental genomes during oogenesis in diploid and triploid hybrid european water frogs // PLOS One. – 2015. – Vol.10, no. 4. – P. 1–19.

Dedukh D., Litvinchuk S., Rosanov J. et al. Mutual maintenance of di- and triploid *Pelophylax esculentus* hybrids in R-E systems: results from artificial crossing experiments // BMC Genetics. –2017. – Vol.14, no. 26. – P. 1–15.

Graf J.D., Mueller W.P. Experimental gynogenesis provides evidence of hybridogenetic reproduction in the *Rana esculenta* complex // Cellular and Molecular Life Sciences. – 1979. – Vol.35, no. 12. P. 1574–1576.

- Heppich S., Tunner H.G., Greilhuber J. Premeiotic chromosome doubling after genome elimination during spermatogenesis of the species hybrid *Rana esculenta* // Theoretical and Applied Genetics. – 1982. – Vol.61, no. 2. – P. 101–104.
- Herczeg D., Voros J., Christiansen D.G. et al. Taxonomic composition and ploidy level among European water frogs (Anura: Ranidae: Pelophylax) in eastern Hungary // Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research. – 2017. – Vol.55, no. 2. – P. 129–137.
- Jakob C. Structure and dynamics of pure hybridogenetic water frog populations of *Rana esculenta* in Southern Sweden. PhD Thesis. Universität Zürich. – 2007. – 197 p.
- Kawahara H. Production of triploid and gynogenetic diploid xenopus by cold treatment // Development, Growth & Differentiation. – 1978. – Vol.20, no. 3. – P. 227–236.
- Mezhzherin S.V., Morozov-Leonov S.I., Rostovskaia O.V. et al. Ploidy and genetic structure of hybrid populations of water frogs *Pelophylax esculentus* (L., 1758) complex (Amphibia, Ranidae) of Ukraine // Tsitologia i Genetica. – 2010. – Vol.44, no. 4. – P. 23–28.
- Plötner J. Die westpalaarktischen Wasserfrosche. – Laurenti-Verlag, Bielefeld, 2005. – 161s.
- Pruvost N.B.M., Hoffman A., Reyer H-U. Gamete production patterns, ploidy, and population genetics reveal evolutionary significant units in hybrid water frogs (*Pelophylax esculentus*) // Ecology and evolution. – 2013. – Vol.3, no. 9. – P. 2933–2946.
- Pruvost N.B.M., Mikulicek L., Choleva L., Reyer H-U. Contrasting reproductive strategies of triploid hybrid males in vertebrate mating systems // Journal of Evolutionary Biology. – 2015. – Vol.28, no. 1. – P. 189–204.
- Suryadna N.N. New records of triploids of *Pelophylax esculentus* (Linnaeus, 1758) in eastern Ukraine // Curr. Stud. Herpetol. Saratov. – 2010. – Vol.10. – P. 128–131.
- Tunner H.G. Kreuzungsexperimente mit wasserfroschen aus oesterreichischen und polnischen mischpopulationen (*Rana lessonae* + *Rana esculenta*) Eine analyse biochemischer und morphologischer merkmale // Journal of Zoological Systematics. – 1980. – Vol.18, no. 4. – P. 257–297.
- Tunner H.G., Heppich S. Premeiotic genome exclusion during oogenesis in the common edible frog, *Rana esculenta* // Naturwissenschaften. – 1981. – Vol.68, no. 4. – P. 207–208.
- Zhang J., Sun M., Zhou L. et al. Meiosis completion and various sperm responses lead to unisexual and sexual reproduction modes in one clone of polyploid *Carassius gibelio* // Scientific Reports. – 2015. – Vol.5. – P. 1–14.

Представлено: Т.Ю.Маркіна / Presented by: T.Yu.Markina
Рецензент: Н.Ю.Полчанінова / Reviewer: N.Yu.Polchaninova
Подано до редакції / Received: 20.11.2017

УДК: 598.293.1(477.53-256)

Структура зимових ночівельних скупчень воронових птахів роду *Corvus* на території м. Полтава В.С.Дупак, В.В.Попельнюх

Полтавський національний педагогічний університет імені В.Г.Короленка (Полтава, Україна)
valeriadupak13@gmail.com; acrocephalus@ukr.net

У 2015–17 роках на території міста Полтава проводили дослідження зимових ночівельних скупчень воронових птахів роду *Corvus*. У роботі наведені результати спостережень за формуванням, існуванням, перерозподілом та зникненням спільних комунальних ночівель сірої ворони (*C. cornix* L., 1758), грака (*C. frugilegus* L., 1758) та галки (*C. monedula* L., 1758). Наразі виявлено три зимових ночівлі: «Гришків ліс», «Пушкарівський ліс» та «Кондратюка», а також мережу постійних місць збору та тимчасових передночіельних скупчень, приурочених до ночівель. Ночівля «Пушкарівський ліс» короткочасна – функціонувала декілька місяців взимку 2015–2016 років, дві інші існували протягом обох сезонів дослідження. Кожна локація характеризувалась особливостями видового складу та індивідуальними строками формування і розпаду. Закартовано основні передночіельні міграційні шляхи обговорюваних видів. Прослідковано закономірності часового та просторового перерозподілу птахів на ночівлях за два зимових періоди. Загальна чисельність воронових птахів роду *Corvus* на зимівлі у 2016–17 роках досягала 80 тисяч особин (50 тисяч для ночівлі «Кондратюка» та 30 тисяч для ночівлі «Пушкарівський ліс»). Нами запропонована і описана методика підрахунку багатотисячних зграй птахів, яка була апробована в ході наших досліджень і може використовуватися для обрахунку масових скупчень птахів будь-якого характеру.

Ключові слова: воронові, *Corvus*, ночівлі, місця збору, зимівля, чисельність, передночіельні скупчення.

Aspects of winter communal roosts of *Corvus* species in Poltava city V.S.Dupak, V.V.Popelnyukh

Winter communal roosting gatherings of *Corvus* species were surveyed in Poltava city in 2015–2017. The results of observations on the formation, existence, redistribution and disappearance of common communal roosts of grey crows (*C. cornix* L., 1758), rooks (*C. frugilegus* L., 1758) and jackdaws (*C. monedula* L., 1758) are presented in the project. Three winter roosts have now been identified: Grishki Forest, Pushkarivskiy Forest and Kondratiuka, as well as a network of permanent gathering sites and temporary night-time pre-roosting gathering sites. The short-period Pushkarivskiy Forest roost functioned for several months in the winter of 2015–2016; the other two roosts existed during both seasons of the study. Every location was characterized by features of the species composition and individual lines of formation and decay. The main pre-roosting migratory paths of the species under discussion have been mapped. The principles of time and spatial redistribution of birds during roosts over two winter periods have been revealed. The total number of corvids was 80 000 individuals in 2016–2017 (50 thousand for Kondratiuk roost and 30 thousand for Pushkarivskiy Forest roost). We suggested and provided a new method of counting birds in gatherings, which was approved during our researches and may be used for calculating mass gathering of birds of any nature.

Key words: *corvidae*, *Corvus*, communal roost, wintering, numbers, pre-roosting gathering.

Структура зимних ночевочных скоплений врановых птиц рода *Corvus* на территории г. Полтава В.С.Дупак, В.В.Попельнюх

В 2015–17 годах на территории города Полтава проводили исследования зимних ночевочных скоплений врановых птиц рода *Corvus*. В работе приведены результаты наблюдений за формированием, существованием, перераспределением и исчезновением совместных коммунальных ночевочных скоплений серой вороны (*C. cornix* L., 1758), грака (*C. frugilegus* L., 1758) и галки (*C. monedula* L., 1758). Сейчас обнаружены три зимних ночевки: «Гришкин лес», «Пушкаревский лес» и «Кондратюка», а также сеть постоянных мест сбора и временных предночевочных скоплений, приуроченных к ночевкам. Ночевка «Пушкаревский лес» кратковременная – существовала несколько месяцев зимой 2015–2016

годов, две другие существовали в течение двух сезонов исследования. Каждая локация характеризовалась особенностями видового состава и индивидуальными сроками формирования и распада. Закартированы основные предночечные миграционные пути обсуждаемых видов. Прослежены закономерности временного и пространственного перераспределения птиц на ночевках за два зимних периода. Общая численность врановых птиц рода *Corvus* на зимовке в 2016–17 годах достигала 80 тысяч особей (50 тысяч для ночевки «Кондратюка» и 30 тысяч для ночевки «Пушкаревский лес»). Нами предложена и описана методика подсчета многотысячных стай птиц, которая была апробирована в ходе наших исследований и может использоваться для подсчета массовых скоплений птиц любого характера.

Ключевые слова: *врановые, Corvus, ночевки, места сбора, зимовка, численность, предночечные скопления.*

Вступ

В умовах трансформованих ценозів міста на особливу увагу заслуговують воронові птахи роду *Corvus*, а саме грак, галка та ворона сіра.

Це пояснюється рядом особливостей цих видів:

- унікальною високою екологічною пластичністю, що проявляється при зміні умов існування (Мацюра, Зимарова, 2015);
- сезонними міграціями;
- здатністю переносити ендопаразитів (гельмінтів), ектопаразитів (кліщів) та інфекційні захворювання птахів, тварин і людей (Музика, Стегній, 2012; Рябов, Пономарев, 2014);
- добовими міграціями на відносно значну відстань від місця відпочинку на місця годівлі (Яніш, 2011);
- масовими скупченнями під час ночівлі (кількість воронових на місцях ночівель може досягати більше 100 тис. особин (Яніш, 2011);
- тісними міжвидовими контактами в місцях харчування (Исаева, 2001) та на ночівельних скупченнях (Брезгунова, 2008).

Значний інтерес представляють ночівельні скупчення цих птахів у межах населених пунктів, особливо в зимовий період, коли вони мають найбільшу чисельність. Дослідження організації колективних ночівель воронових птахів у містах необхідні для проведення епізоотологічного моніторингу, вирішення проблем акустичного забруднення, яке виникає на місцях багатотисячних скупчень птахів, для безпечної роботи аеропортів, розробки оптимальних методів розлякування ночівель, якщо вони становлять загрозу тощо.

В Україні ночівельні скупчення воронових вивчені недостатньо, а географія досліджень носить фрагментарний характер (Брезгунова, 2008; Яніш 2011; Яніш, Лопарьов, 2007; Дранга, Горлов, 2016).

У ході нашої роботи проводились дослідження особливостей розподілу ночівель, місць збору та передночівельних скупчень воронових, оцінена їх чисельність та закономірності ночівельної поведінки в зимові періоди 2015–16 та 2016–17 років на території м. Полтава. Крім того, закартовані основні шляхи добових міграцій до місць ночівель.

Матеріали і методи досліджень

У публікацію включені матеріали досліджень, які були отримані з вересня 2015 року до червня 2017 року.

Під час виявлення місць передночівельних скупчень, збору або ночівель, а також напрямів передночівельних перельотів нами був застосований модифікований метод виявлення ночівель зграйних воронових птахів у зимовий період, шляхом «перехвату потоку». Метод передбачає реєстрацію витягнутої в довжину за напрямком перельоту відносно щільної зграї воронових птахів, що летять разом певним маршрутом до місця вечірнього збору чи ночівлі (Яніш, Лопарьов, 2007).

Місця, що найбільше підходили для ночівлі воронових, обстежували вдень, з метою перевірки наявності екскрементів та загиблих птахів, які, як правило, є на місці ночівлі.

Для визначення видового складу на ночівлях проводили обстеження місць збору до настання темноти. Видовий склад скупчень визначали візуально та по голосах.

Підрахунки проводили на місцях збору. Така стратегія була нами обрана з причини того, що збір птахів відбувався в сутінковий час, а переліт на ночівлю проходив після повного заходу сонця, що значно ускладнювало підрахунки. При цьому місця збору відвідували всі птахи, що

утворювали відповідну ночівлю. Підрахунки проводили лише в певних часових рамках, так як на початку формування місця збору його склад був далеко неповним і поступово змінювався в напрямку збільшення чисельності з прибуттям окремих потоків птахів з різних частин міста.

Під час проведення підрахунків загальної чисельності птахів ми користувалися двома різними методиками для отримання більш достовірних даних.

Підрахунки чисельності птахів обох ночівель проводили за методикою Лугового-Кумарі (підрахунок потоків, що підлітають до місця збору), модифіковану Є.Ю.Яніш (2007).

Інша методика – «обрахунок особин на об'єктах», якою ми користувалися в ході досліджень, розроблена нами. Суть методики полягає в обліку особин на одному середньостатистичному об'єкті (в нашому випадку на деревах та дахах будинків) із перерахунком на кількість таких об'єктів та з урахуванням «динамічних» птахів – тих, які під час обліку літають. Методика включає два етапи: польовий – збір первинних даних та камеральний – математична обробка первинних даних.

Перший етап. Першочергово потрібно зафіксувати (сфотографувати) якнайбільшу кількість об'єктів, на яких розміщуються птахи, в більшості випадків – це дерева. Фотографувати слід за 10–15 хвилин до зльоту зграї на місце ночівлі, коли вже всі птахи зібралися на місці збору. Оскільки птахи починають прилітати за півтори-дві години до перельоту на ночівлю невеликими зграями і не одночасно, то недоцільно робити знімки раніше – дані будуть не достовірні через неповний склад птахів.

Важливо на місці збору обрахувати кількість об'єктів, на яких розміщуються птахи (кількість дерев тощо). Якщо є об'єкти, які сфотографувати неможливо (дахи будинків), дослідник повинен встигнути визначити кількість птахів, які там розміщуються після їх старту. Обов'язково необхідно з'ясувати, який відсоток птахів від їх загальної кількості перебувають в «динамічному» стані, тобто літають, а не сидять на об'єктах, що фіксуються.

Другий етап. Обирається вибірка найбільш вдалих фотографій, причому вона повинна включати об'єкти з різною щільністю птахів та різного розміру самих об'єктів (наприклад, ми фотографували дерева із широкою та вузькою кронами). Так, наша вибірка складала 20 фотознімків дерев.

Далі на кожній світлинці підраховується кількість особин та середнє арифметичне кількості птахів на об'єктах, що ввійшли до вибірки. Середнє арифметичне перемножується на загальну кількість об'єктів, які використовувалися птахами на місці збору, та додається кількість птахів із додаткових об'єктів (в нашому випадку – це дахи будинків). Від даного показника вираховується відсоток «динамічних» птахів. Числа останніх двох дій додаються. Отримана сума і буде результатом кількості птахів, які входять до складу конкретної ночівлі.

Результати і обговорення

У період 2015–16 років нами виявлено три центральні ночівельні локації воронових: «Гришків ліс» (лісовий масив, що знаходиться на північному заході міста), «Кондратюка» (центральна частина міста, Інститутська гора – схил поблизу технічного університету імені Юрія Кондратюка) та «Пушкарівський ліс» (1,5 км на південь від першої ночівлі). Остання ночівля утворилася внаслідок об'єднання двох попередніх: спочатку на ночівлю «Пушкарівський ліс» в середині січня перемістилися птахи з локації «Гришків ліс», а через місяць – з ночівлі «Кондратюка». При зміні локалізації ночівель змістилися і напрями передночівельних міграційних маршрутів (рис. 1).

Ночівлям воронових передують передночівельні скупчення (які зазвичай відвідує частина птахів) та місця збору (що відвідує більшість або всі птахи), які беруть участь в утворенні відповідної ночівлі (Брезгунова, 2008; Яніш, Лопарьов, 2007).

Так, для утворення локації «Гришків ліс» виявлене місце збору на території гімназії №30 по вул. Курчатова; для ночівлі «Кондратюка» – на території парку обласної лікарні імені М.В.Скляфосовського; «Пушкарівський ліс» – садки колишнього колгоспу Шевченка. Також знайдено декілька передночівельних скупчень (рис. 1).

При вивченні особливостей видового складу кожної із ночівель виявили, що на території першої видовий склад представлений граком та вороною сірою. Натомість, при обстеженні місця збору другої ночівлі, серед птахів виявлені галка та грак. На території третьої спостерігалися всі три види птахів, що пояснюється походженням обговорюваної ночівлі.

Воронові птахи досліджуваних видів можуть утворювати як спільні різновидові ночівельні локації (Карев, 1984; Варшавский, 1984; Лопарев, 1984; Благодосклон, 1984; Водолажская, 1984,

Брезгунова, 2008; Брезгунова, 2009), так і моновидові ночівлі (Королькова, 1984; Абуладзе, Эдишерашвили, 1984).

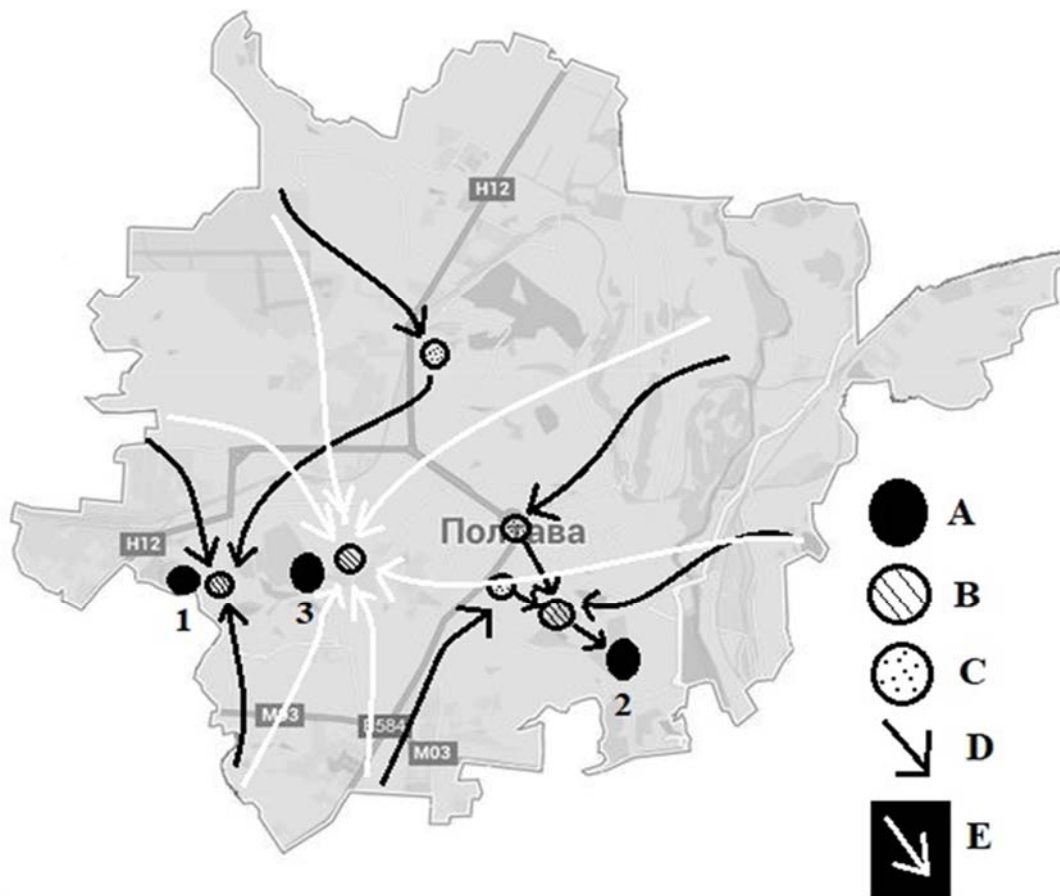


Рис. 1. Схема розташування ночівель, місць збору та передночівельних скупчень воронячих птахів роду *Corvus* на зимівлі 2015–16 рр. у м. Полтава: 1 – ночівля «Гришків ліс»; 2 – ночівля «Кондратюка»; 3 – ночівля «Пушкарівський ліс»; А – місце ночівлі; В – місце збору; С – передночівельне скупчення; D – шляхи передночівельних міграційних маршрутів до зміни локалізації ночівель; E – шляхи передночівельних міграційних маршрутів після зміни розташування ночівель

У зимовий період 2016–17 років існували лише дві ночівлі: «Кондратюка» та «Пушкарівський ліс», місця збору яких від минулорічних не відрізнялися (рис. 2). Проте з початку грудня спостерігалось розформування першої ночівлі. Птахи, що її утворювали, долучилися до ночівлі «Пушкарівський ліс». На початку січня птахи повернулися до початкової структури ночівель. Причини передислокації (фактори тривоги, вирубка дерев тощо) не виявлені. В основному зимові ночівельні локації консервативні – не змінюють своє просторове розміщення протягом багатьох років (Яніш, Лопарьов, 2007; Брезгунова, 2005; Лопарьов, 1984; Сенік, 2007). Хоча й відомий швидкий перерозподіл ночівельних скупчень (Яніш, Лопарьов, 2007), який пояснювався турбуванням із боку людей.

У кінці лютого птахи з ночівлі «Пушкарівський ліс» змістилися зі звичної території на південний захід (0,6 км), а місце збору зсунулося на відповідну відстань ближче до новообраної території. При цьому чисельність птахів значно зменшилася. До 20 березня ночівля повернулася у попереднє положення, але формували її вже виключно ворони сірі.

Місцям збору передували короткочасні передночівельні скупчення, які були не постійними.

З'ясовано, що видовий склад воронових на ночівлях 2016–17 років від минулорічного не відрізнявся.

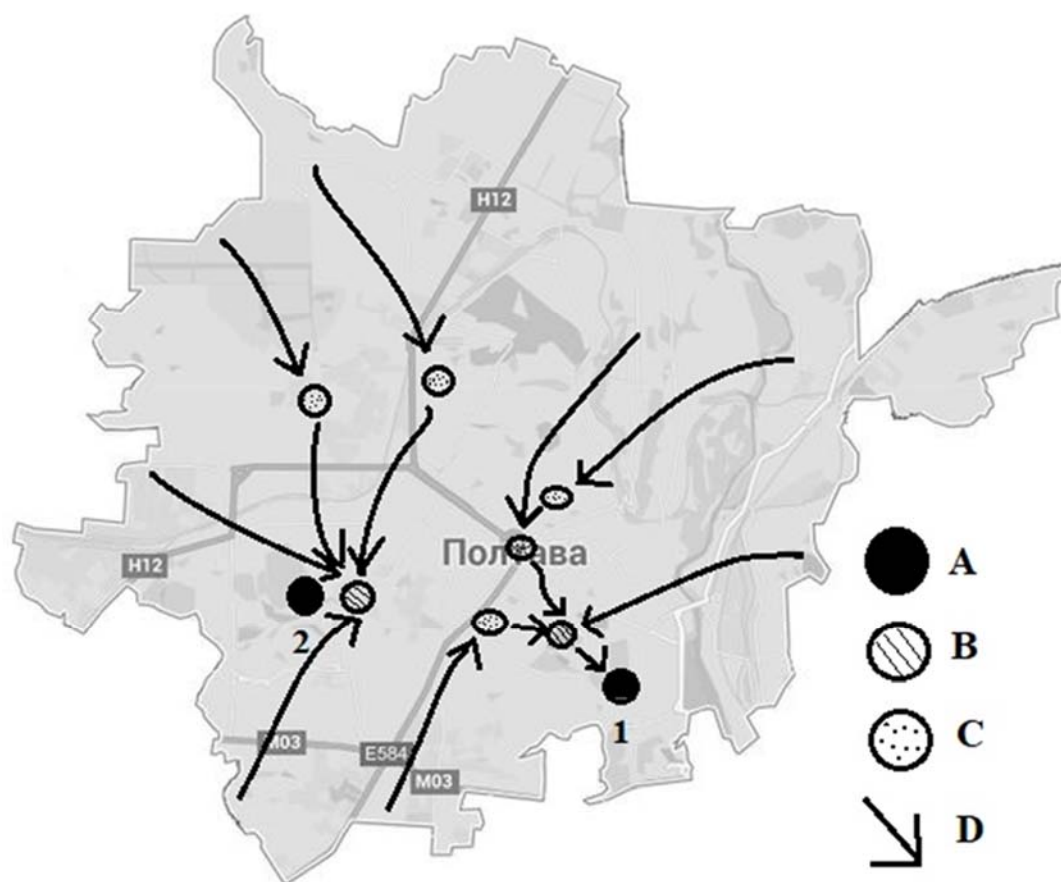


Рис. 2. Схема розташування ночівель, місць збору та передночівельних скупчень воронових птахів роду *Corvus* на зимівлі 2016–17 рр. у м. Полтава: 1 – ночівля «Кондратюка»; 2 – ночівля «Пушкарівський ліс»; А – місце ночівлі; В – місце збору; С – передночівельне скупчення; D – шляхи передночівельних міграційних маршрутів

Часові рамки формування ночівель різнилися між собою, проте збережені тенденції за два зимових періоди. Центральна ночівля «Кондратюка» протягом двох років починала формуватися з середини жовтня, а ночівля – «Гришків ліс» 2015-го року вже у вересні. В кінці січня 2016 року птахи останньої ночівлі перемістилися на локацію «Пушкарівський ліс» і цим утворили її. Наступної осені ця ночівля теж сформувалася у вересні. Відмінність у термінах утворення ночівель може пояснюватися поступовим прильотом птахів на зимівлю з північно-східних регіонів та відльотом місцевих популяцій (Лопарев, 1992; Сенік, 2007; Полуда, Цуканова, 2012). Така ж закономірність відома й для інших частин ареалу (Водолажская, 1984; Воробьев, 1984; Белоусов, 1984; Карев, 1984; Варшавский, 1984; Неручев, 1984; Абуладзе, Эдишерашвили, 1984), де терміни прильоту варіюють з жовтня до початку грудня. На території ночівлі «Кондратюка» птахи трималися до початку квітня. У весняний період на ній відмічалися граки та галки, як і взимку. Ночівля «Пушкарівський ліс» зберігалася до середини червня, але цікавим фактом є те, що з кінця березня і до середини квітня 2017 року її формували виключно ворони сірі, а з середини квітня і до середини червня (період розпаду скупчення) ночівля включала всі три види птахів. Ймовірно, що сюди перемістилися птахи з ночівлі «Кондратюка», після її розпаду.

С.А.Лопарьов (1984) виділяв 5 періодів у формуванні зимового населення воронових. Перший – міграція і формування скупчень (кінець вересня – остання декада листопада); другий –

внутрішній перерозподіл між місцями ночівель та годівель (кінець листопада – початок грудня); третій – співпадає із встановленням постійного снігового покриву і значним промерзанням ґрунту (воронові майже повністю переходять на харчування відходами); четвертий – весняне пожавлення, яке супроводжується змінами добових ритмів життя (співпадає із збільшенням дня і появою відлиг у лютому); п'ятий – відліт із зимівлі (починається в кінці лютого – на початку березня) (Лопарев, 1984). Звичайно межі періодів індивідуальні, можуть значно зсуватися і залежать від конкретного року. Переформування та об'єднання ночівель у місті Полтава можна приурочити до певних етапів існування зимівлі відповідно із зазначеним поділом.

Згідно з аналізом літератури початок формування зимових ночівель варіює з вересня до листопада, а період розпаду фіксується в основному з кінця березня до початку травня (Королькова, 1984; Абуладзе, Эдишерашвили 1984; Яніш, Лопарьов 2007; Брезгунова, 2005, 2009; Дранга, Горлов, 2016), що не характерно для ночівлі «Пушкарівський ліс». Таке тривале існування обговорюваної локації може пояснюватися тим, що у весняно-літній період її формували особини, які з різних причин не розмножувалися, а пізніше разом із іншими птахами перемістилися на периферійну ночівлю (так прийнято називати весняно-осінні ночівельні скупчення (Брезгунова, 2009).

Дані обох методик, що використовувалися для підрахунку чисельності птахів, мало відрізнялися. Так, в зимовий період 2016–17 років кількість птахів на ночівлі «Кондратюка» досягала 50 тисяч особин, а «Пушкарівський ліс» – складала близько 30 тисяч птахів.

Висновки

1. Під час досліджень в м. Полтава дві ночівлі існували протягом обох сезонів дослідження – «Пушкарівський ліс» та «Кондратюка», локація «Гришків ліс» – короткочасна, функціонувала з осені 2015 року до середини січня 2016 року.

2. Виявлені наступні закономірності в ночівельній поведінці досліджуваних видів на території м. Полтава:

- місця збору до всіх виявлених ночівель не змінювалися протягом часу існування останніх;
- структура передночівельних скупчень є мінливою;
- при об'єднанні ночівель, у обох випадках, птахи розташовувалися на території локації «Пушкарівський ліс»;
- видовий склад воронових роду *Corvus* в зимовий період на ночівлях не змінний;
- часові рамки формування і розпаду ночівель збережені протягом двох років.

3. Станом на кінець січня-початок лютого 2017 року загальна чисельність воронових птахів роду *Corvus* на ночівлях у м. Полтава сягала 80 тисяч особин.

Список літератури

- Абуладзе А.В., Эдишерашвили Г.В. Зимовки грачей в Грузинской ССР // Экология, биоценологическое и хозяйственное значение врановых птиц: Мат-лы I совещ. – Москва, 1984. – С. 56–57. /Abuladze A.V., Edisherashvili G.V. Zimovki grachey v Gruzinskoj SSR // Ekologiya, biotsenoticheskoye i khozyaystvennoye znachenije vranovykh ptits: Mat-ly I soveshch. – Moskva, 1984. – S. 56–57./
- Белоусов Ю.А. Адаптации врановых к антропогенным условиям // Экология, биоценологическое и хозяйственное значение врановых птиц: Мат-лы I совещ. – Москва, 1984. – С. 62–63. /Belousov Yu.A. Adaptatsii vranovykh k antropogennym usloviyam // Ekologiya, biotsenoticheskoye i khozyaystvennoye znachenije vranovykh ptits: Mat-ly I soveshch. – Moskva, 1984. – S. 62–63./
- Благосклонов К.Н. Врановые птицы в городах восточной Европы // Экология, биоценологическое и хозяйственное значение врановых птиц: Мат-лы I совещ. – Москва, 1984. – С. 64–67. /Blagosklonov K.N. Vranovyye ptitsy v gorodakh vostochnoy Yevropy // Ekologiya, biotsenoticheskoye i khozyaystvennoye znachenije vranovykh ptits: Mat-ly I soveshch. – Moskva, 1984. – S. 64–67./
- Брезгунова О.А. Организация коммунальных ночевок серой вороны (*Corvus cornix*) в г. Харькове // Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія. – 2005. – Вип. 1–2, №709. – С. 116–121. /Brezgunova O.A. Organizatsiya kommunal'nykh nochevok seroy vorony (*Corvus cornix*) v g. Khar'kove // Visnyk Kharkivs'kogo natsional'nogo universytetu imeni V.N. Karazina. Seriya: biologiya. – 2005. – Vyp. 1–2, no. 709. – S. 116–121./
- Брезгунова О.А. Организация совместных коллективных ночёвок грача (*Corvus frugilegus* L.) и галки (*C. monedula* L.) в г. Харькове // Чтения памяти А.П.Крапивного. – Харьков, 2009. – С. 22–27.

- /Brezgunova O.A. Organizatsiya sovместnykh kollektivnykh nochevok gracha (*Corvus frugilegus* L.) i galki (*C. monedula* L.) v g. Khar'kove // Chteniya pamyati A.P.Krapivnogo. – Khar'kov, 2009. – S. 22–27./
- Брезгунова О.О. Колективні ночівлі воронових птахів: розподіл, типи організації та стратегії поведінки (на прикладі м. Харкова). Автореф. дис. ... канд. біол. наук / 03.00.08. – К., 2008. – 20с. /Brezgunova O.O. Kolektyvni nochiivli voronovykh ptakhiv: rozpodil, typu organizatsii ta strategii povedinky (na prykladi m. Khar'kova). Avtoref. dys. ... kand. biol. nauk / 03.00.08. – K., 2008. – 20s./
- Варшавский С.Н. Городские популяции врановых птиц в низовьях Волги и Урала // Экология, биоценологическое и хозяйственное значение врановых птиц: Мат-лы I совещ. – Москва, 1984. – С. 34–37. /Varshavskiy S.N. Gorodskiyе populyatsii vranovykh ptits v nizov'yakh Volgi i Urala // Ekologiya, biotsenoticheskoye i khozyaystvennoye znacheniye vranovykh ptits: Mat-ly I soveshch. – Moskva, 1984. – S. 34–37./
- Водолажская Т.И. Современные сведения по численности врановых и ее динамике на территории урбанизированного ландшафта (на примере города Казани) // Экология, биоценологическое и хозяйственное значение врановых птиц: Мат-лы I совещ. – Москва, 1984. – С. 72–75. /Vodolazhskaya T.I. Sovremennyye svedeniya po chislennosti vranovykh i ee dinamike na territorii urbanizirovannogo landshafta (na primere goroda Kazani) // Ekologiya, biotsenoticheskoye i khozyaystvennoye znacheniye vranovykh ptits: Mat-ly I soveshch. – Moskva, 1984. – S. 72–75./
- Воробьев Г.П. Врановые в экосистемах г. Воронежа // Экология, биоценологическое и хозяйственное значение врановых птиц: Мат-лы I совещ. – Москва, 1984. – С. 70–72. /Vorob'ev G.P. Vranovyye v ekosistemakh g. Voronezha // Ekologiya, biotsenoticheskoye i khozyaystvennoye znacheniye vranovykh ptits: Mat-ly I soveshch. – Moskva, 1984. – S. 70–72./
- Дранга А.О., Горлов П.И. Коллективная ночевка врановых птиц в г. Мелитополь (Запорожская область) в 2014–2015 годах // Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, екологія. – 2016. – №24 (1). – С. 50–60. /Dranga A.O., Gorlov P.I. Kollektivnaya nochevka vranovykh ptits v g. Melitopol' (Zaporozhskaya oblast') v 2014–2015 godakh // Visnyk Dnipropetrovs'kogo universytetu. Biologiya, ekologiya. – 2016. – №24 (1). – S. 50–60./
- Исаева О.С. Врановые птицы рудеральных ландшафтов европейской части России // Врановые птицы в антропогенном ландшафте. – Вып.4. – Липецк, 2001. – С. 31–42. /Isayeva O.S. Vranovyye ptitsy ruderal'nykh landshaftov yevropeyskoy chasti Rossii // Vranovyye ptitsy v antropogennom landshafte. – Vyp.4. – Lipetsk, 2001. – S. 31–42./
- Карев Е.В. К экологии врановых птиц // Экология, биоценологическое и хозяйственное значение врановых птиц: Мат-лы I совещ. – Москва, 1984. – С. 37–40. /Karev Ye.V. K ekologii vranovykh ptits // Ekologiyu, biotsenoticheskoye i khozyaystvennoye znacheniye vranovykh ptits: Mat-ly I soveshch. – Moskva, 1984. – S. 37–40./
- Королькова Г.Е. Некоторые особенности поведения серой вороны в антропогенном ландшафте // Экология, биоценологическое и хозяйственное значение врановых птиц: Мат-лы I совещ. – Москва, 1984. – С. 52–53. /Korol'kova G.Ye. Nekotoryye osobennosti povedeniya seroy vorony v antropogennom landshafte // Ekologiya, biotsenoticheskoye i khozyaystvennoye znacheniye vranovykh ptits: Mat-ly I soveshch. – Moskva, 1984. – S. 52–53./
- Лопарев С.А. Зимовки врановых в антропогенных ландшафтах Центральной Украины // Экология, биоценологическое и хозяйственное значение врановых птиц: Мат-лы I совещ. – Москва, 1984. – С. 60–62. /Loparev S.A. Zimovki vranovykh v antropogennykh landshaftakh Tsentral'noy Ukrainy // Ekologiya, biotsenoticheskoye i khozyaystvennoye znacheniye vranovykh ptits: Mat-ly I soveshch. – Moskva, 1984. – S. 60–62./
- Лопарев С.А. Характер пролета и зимовок врановых в центральной части Украины // Сезонные миграции птиц на территории Украины. – К.: Наук. думка, 1992. – С. 71–89. /Loparev S.A. Kharakter proleta i zimovok vranovykh v tsentral'noy chasti Ukrainy // Sezonnyye migratsii ptits na territorii Ukrainy. – K.: Nauk. dumka, 1992. – S. 71–89./
- Мацюра О.В., Зимарова А.А. Особливості гніздової екології воронових птахів (Corvidae) в умовах трансформованих ландшафтів Житомирської області. – Беркут, 2015. – 1 (24). – С. 58–65. /Matsyura O.V., Zimaroyeva A.A. Osoblyvosti gnizdovoi ekologii voronovykh ptakhiv (Corvidae) v umovakh transformovanykh landshaftiv Zhitomyr's'koi oblasti. – Berkut, 2015. – 1 (24). – S. 58–65./
- Музыка Д.В., Стегний Б.Т. Дикі птахи, як один з головних факторів розповсюдження збудників інфекцій птиці, тварин і людей // Ветеринарна медицина. – 2012. – №96. – С. 222–224. /Muzyka D.V., Stegnyy B.T. Dyki ptakhy, yak odyn z golovnykh faktoriv rozpovsyudzhennya zbudnykiv infektsiy ptytsi, tvaryn i lyudey // Veterynarna medytsyna. – 2012. – No. 96. – S. 222–224./
- Неручев В.В. О синантропизме врановых в пустынях северо-восточного Прикаспия // Экология, биоценологическое и хозяйственное значение врановых птиц: Мат-лы I совещ. – Москва, 1984. – С. 50–52. /Neruchev V.V. O sinantropizme vranovykh v pustynnyakh severo-vostochnogo Prikaspiya // Ekologiya, biotsenoticheskoye i khozyaystvennoye znacheniye vranovykh ptits: Mat-ly I soveshch. – Moskva, 1984. – S. 50–52./
- Полуда А.М., Цуканова С.В. Особенности пространственно-временного распределения грачей (*Corvus frugilegus*), связанных с территорией Украины // Бранта. – 2012. – Вып.15. – С. 103–120. /Poluda A.M., Tsukanova S.V. Osoblyvosti prostорового ta chasovogo rozpodilu grachey (*Corvus frugilegus*), pov'yazanogo z terytoriyeyu Ukrainy // Branta. – 2012. – Vyp.15. – S. 103–120./

Рябов А.В., Пономарев В.А. Инвазионные болезни синантропных врановых птиц // Вестник Костромского государственного университета им. Н.А.Некрасова. – 2014. – Т.20, №7. – С. 37–41. /Ryabov A.V., Ponomarev V.A. Invazionnyye bolezni sinantropnykh vranovykh ptits // Vestnik Kostromskogo gosudarstvennogo universiteta im. N.A.Nekrasova. – 2014. – T.20, no. 7. – S. 37–41./

Сеник М.А. Особенности зимовок грача и других врановых в городе Львове // Экология врановых в естественных и антропогенных ландшафтах: Сб. материалов VIII Междунар. науч.-практ. конф. по врановым птицам. – Ставрополь: Изд-во Ставропол. гос. ун-та, 2007. – С. 143–146. /Senik M.A. Osobennosti zimovok gracha i drugikh vranovykh v gorode L'vove // Ekologiya vranovykh v estestvennykh i antropogennykh landshaftah: Sb. materialov VIII Mezhdunar. nauch.-prakt. konf. po vranovym ptitsam. – Stavropol': Izd-vo Stavropol'. gos. un-ta, 2007. – S. 143–146./

Яніш Є.Ю. Сучасний стан популяції воронових птахів (родина Corvidae) на території лісостепової України. Автореф. дис. ... канд. біол. наук / 03.00.08. – К., 2011. – 23с. /Yanish Ye.Yu. Suchasnyy stan populiyatsii voronovykh ptakhiv (rodyna Corvidae) na terytorii lisostepovoi Ukrainy. Avtoref. dys. ... kand. biol. nauk / 03.00.08. – K., 2011. – 23s./

Яніш Є.Ю., Лопарьов С.О. Зимівля воронових птахів (Corvidae) на території Києва в сучасних умовах // Вестник зоологии. – 2007. – Т.41, №2. – С. 143–152. /Yanish Ye.Yu., Lopar'ov S.O. Zymivlya voronovykh ptakhiv (Corvidae) na terytorii Kyeva v suchasnykh umovakh // Vestnik zoologii. – 2007. – T.41, no. 2. – S. 143–152./

Представлено: Є.Ю.Яніш / Presented by: Ye.Yu.Yanish

Рецензент: О.О.Брезгунова / Reviewer: O.O.Brezgunova

Подано до редакції / Received: 03.12.2017

УДК: 591.524.12. (282.247.32)

Гіллястовусі раки (Cladocera: Daphniidae, Chydoridae) Українського Розточчя: порівняльна характеристика О.Р.Іванець

Львівський національний університет імені Івана Франка (Львів, Україна)
oleh_ivanets@ukr.net

Вивчали таксономічну структуру гіллястовусих раків Українського Розточчя. Основою роботи слугували 1754 проби, зібрані у 1995–2016 рр. Всього у водоймах виявлено 42 види гіллястовусих раків, що належать до 7 родин і 19 родів. До родини Chydoridae належить 8 родів (*Acroperus*, *Alona*, *Alonella*, *Chydorus*, *Disparalona*, *Graproleberis*, *Pleuroxus*, *Tretocephala*), до родини Daphniidae – 5 родів (*Ceriodaphnia*, *Daphnia*, *Moina*, *Scapholeberis*, *Simocephalus*). До Chydoridae і Daphniidae належать, відповідно, 18 та 17 видів. Представленість родини Chydoridae за числом родів у кладоцерової становить 42%, а за числом видів – 43%. Для родини Daphniidae ці показники становлять відповідно 27% і 41%. На рівні родів першу за значимістю функціональну групу (15% від усього видового складу) утворюють *Daphnia*, *Ceriodaphnia* (Daphniidae), другу групу (10% від загальної кількості видів) утворюють *Alona*, *Chydorus*, *Pleuroxus* (Chydoridae). На рівні родин Chydoridae в структурі кладоцерової є поруч з родиною Daphniidae. Вони займають різні біотопи і не конкурують. Chydoridae – це, насамперед, літоральні форми, Daphniidae – пелагічні. Гіллястовусі другого трофічного рівня є своєрідним біофільтром, який очищає водойми і підтримує екологічний баланс екосистем. Показано, що трофічна сітка водойм добре розвинена. У водоймах регіону представлені, насамперед, форми, поширені в Голарктиці та Палеарктиці.

Ключові слова: зоопланктон, *Cladocera*, *Chydoridae*, *Daphniidae*, Українське Розточчя.

Cladocera (Daphniidae, Chydoridae) of Ukrainian Roztocze: comparative characteristics O.R.Ivanets

The taxonomic structure of Cladocera of Ukrainian Roztocze has been studied. The basis of the work was 1754 samples collected in 1995–2016. In total 42 species of Cladocera belonging to 7 families and 19 genera have been identified in reservoirs. The family Chydoridae has 8 genera (*Acroperus*, *Alona*, *Alonella*, *Chydorus*, *Disparalona*, *Graproleberis*, *Pleuroxus*, *Tretocephala*), the family Daphniidae has 5 genera (*Ceriodaphnia*, *Daphnia*, *Moina*, *Scapholeberis*, *Simocephalus*). Chydoridae and Daphniidae have 18 and 17 species respectively. The representation of the Chydoridae family by the number of genera in cladoceroocenosis is 42%, and by the number of species – 43%. For the Daphniidae family, these values are respectively 27% and 41%. Among genera, the first significant functional group (15% of the total species composition) is formed by *Daphnia*, *Ceriodaphnia* (Daphniidae), the second group (10% of the total species) is formed by *Alona*, *Chydorus*, *Pleuroxus* (Chydoridae). Among the families, Chydoridae in the structure of cladoceroocenosis is near the Daphniidae family. They occupy different habitats and do not compete. Chydoridae are, first of all, littoral form, and Daphniidae are pelagic. Cladocera of the second trophic level is a kind of biofilter, which cleans water bodies and maintains the ecological balance of ecosystems. It has been shown that the trophic network of reservoirs is well developed. In the reservoirs of the region there are represented primarily forms, distributed in the Holarctic and Palaearctic.

Key words: zooplankton, *Cladocera*, *Chydoridae*, *Daphniidae*, Ukrainian Roztocze.

Ветвистоусые раки (Cladocera: Daphniidae, Chydoridae) Украинского Расточья: сравнительная характеристика О.Р.Иванец

Изучали таксономическую структуру ветвистоусых раков Украинского Расточья. Основой работы послужили 1754 пробы, собранные в 1995–2016 г. В целом в водоемах выявлено 42 вида ветвистоусых раков, которые принадлежат к 7 семействам и 19 родам. К семейству Chydoridae принадлежит 8 родов (*Acroperus*, *Alona*, *Alonella*, *Chydorus*, *Disparalona*, *Graproleberis*, *Pleuroxus*, *Tretocephala*), к семейству Daphniidae – 5 родов (*Ceriodaphnia*, *Daphnia*, *Moina*, *Scapholeberis*, *Simocephalus*). К Chydoridae и Daphniidae принадлежат, соответственно, 18 и 17 видов.

Представленность семейства Chydoridae по числу родов в кладоцероценозе составляет 42%, а по числу видов – 43%. Для семейства Daphniidae эти показатели составляют соответственно 27% и 41%. На уровне родов первую по значимости функциональную группу (15% от всего видового состава) образуют *Daphnia*, *Ceriodaphnia* (Daphniidae), вторую группу (10% от общего числа видов) образуют *Alona*, *Chydorus*, *Pleuroxus* (Chydoridae). На уровне семейств Chydoridae в структуре кладоцероценозов находятся рядом с семейством Daphniidae. Они занимают разные биотопы и не конкурируют. Chydoridae – это, прежде всего, литоральные формы, Daphniidae – пелагические. Ветвистоусые второго трофического уровня – своеобразный биофильтр, который очищает водоемы и поддерживает экологический баланс экосистем. Показано, что трофическая сетка водоемов хорошо развита. В водоемах региона представлены, прежде всего, формы, распространенные в Голарктике и Палеарктике.

Ключевые слова: зоопланктон, Cladocera, Chydoridae, Daphniidae, Украинское Розточье.

Вступ

Проблема збереження біологічного різноманіття зоопланктоценозів, які є ключовими в гідроекосистемах, одна з найбільш актуальних. Популяції видів родин Chydoridae і Daphniidae відіграють важливу роль у трофодинаміці, формуванні вторинної продукції, самоочищенні водойм. Регіональні фауни водних екосистем вивчені недостатньо і вимагають спеціальної уваги для забезпечення, у відповідності з рекомендаціями Водної Рамкової Директиви ЄС (Directive 2000/60/EC), належної ефективності комплексного гідроекологічного моніторингу.

Особливе значення Українського Розточчя зумовлене проходженням по цих теренах Головного Європейського вододілу, еталонні екосистеми якого є визначальними у функціонуванні гідробіоценозів центральної і східної Європи в цілому. Для збереження біорізноманіття у цьому регіоні створений міжнародний Біосферний резерват ЮНЕСКО (Biosphere Reserve) «Розточчя».

Об'єкти та методи дослідження

У даній роботі представлено порівняльну характеристику родин Daphniidae і Chydoridae Українського Розточчя. Огляд фауни гіллястовусих, історія досліджень і гідрологічна характеристика Українського Розточчя викладені у попередніх публікаціях (Іванець, 2013, 2014). Матеріалом послужили 1754 проби, зібрані у водоймах Українського Розточчя протягом 1995–2016 років (рис. 1).

Відбір і обробку проб, розрахунок головних біоценотичних параметрів здійснювали за загальноприйнятими методиками (Методи..., 2006; Wetzel, Likens, 1979). Для визначення матеріалу використовували посібники (Мануйлова, 1964; Коровчинский, 2004; Смирнов, 1971, 1976; Władzki, Rybak, 2016; Flössner, 2000; Hudec, 2010).

Результати і обговорення

Проживання кожного виду у тому чи іншому біотопі детермінується певними пристосуваннями до умов середовища, що визначають його плавальні характеристики та спеціалізацію трофічного апарату відповідно до раціону. Схарактеризуємо, з використанням власних досліджень та літературних джерел, родини Daphniidae і Chydoridae, враховуючи особливості їх біологічного розвитку та критерії, що забезпечують оптимальну реалізацію трофічних параметрів (Іванець, 2013, 2017а, 2017б; Коровчинский, 2004; Смирнов, 1971, 1976; Władzki, Rybak, 2016; Flössner, 2000; Hudec, 1988, 2010; Ivanets, 2011; Koval, Ivanets, 2017; Kovalchuk, Ivanets, 2016).

У цілому у водоймах формуються донні, заростеві і пелагічні комплекси форм кладоцер. Таксони родини Daphniidae представлені переважно пелагічними формами, Chydoridae, як правило, трапляються серед водної рослинності.

У Daphniidae тіло дещо стиснене з боків, стулки іноді можуть мати шипоподібні вирости. Передні антени самки значно коротші, ніж у самця, або однакових розмірів у самця і самки. Верхня гілка задніх антен має чотири членики, нижня – три членики. П'ять пар ніг мають різну будову. Щетинки ендоподитів 3 і 4 пар розташовуються віялоподібно. Хвостові щетинки прикріплюються безпосередньо до основи постабдомена, верхній край якого озброєний шипами і більш-менш рівномірно випуклий. У *Daphnia magna* він має глибоку виїмку.

У деяких Daphniidae (*Daphnia*, *Simocephalus*) рostrum добре розвинений. У інших (*Ceriodaphnia*) він відсутній. На спинній стороні голови є кіль. Передня частина голови може бути

витагнута у вигляді шолома. Задня частина стулок іноді витагнута в більш-менш довгий шипоподібний виріст – хвостову голку.

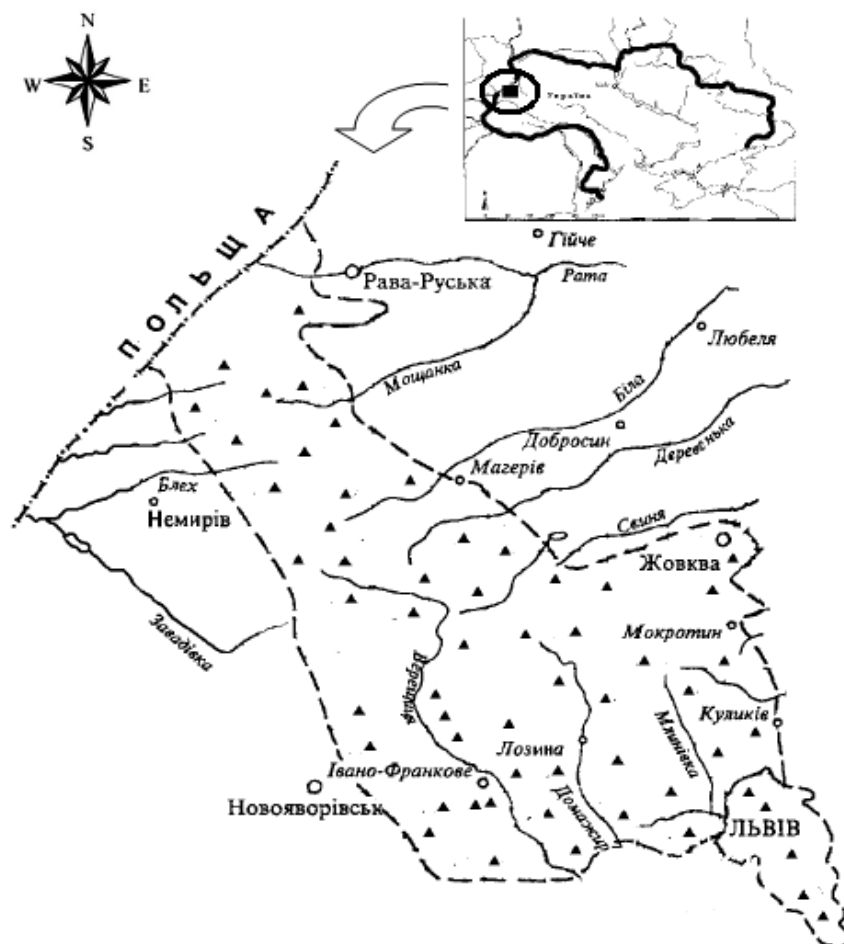


Рис. 1. Карта регіону досліджень (Ковальчук, Петровська, 2003; Buraczynski et al., 1997)
▲ – місця відбору гідробіологічних проб

У Chydoridae стулки позбавлені виростів. Голова з латеральним килем, з витагнутим, добре розвиненим ростром. Передні антени короткі, паличкоподібні. Задні антени короткі з трьохчлениковими гілками. Хвостові щетинки короткі. Постабдомен стиснений з боків, пластинкоподібний, озброєний зубцями, щетинками або гладкий. Кінцівки Chydoridae мають різноманітну будову як в окремих родів, так і видів, плавальні щетинки у більшості видів короткі. У Chydoridae постабдомен утворює поблизу проксимального краю анального отвору помітний виступ, що називається постанальним кутом.

Daphniidae і Chydoridae характеризуються певними особливостями фільтрувального апарата. З п'яти пар різної будови кінцівок родини Daphniidae тільки на ендоподитах 3 і 4 пар зберігаються гребінці з фільтруючих щетинок. Число таких щетинок досить велике і не однакове у різних родів і видів. Daphniidae мають найбільш складний і спеціалізований фільтрувальний апарат. У його спеціалізації в процесі еволюції значну роль відіграла модифікація метакронічного ритму руху кінцівок. Автоматичний характер дії апарата *Daphnia* забезпечує безперервність фільтрації лише в чистій воді відкритої частини водойм, яка містить відносно невелику кількість великих зважених частинок. Синхронність ударів певною мірою зберіглася лише у *Moina*, тому цей рід вважається філогенетично більш давнім.

Фільтрувальний апарат Chydoridae представляє собою спеціалізовану модифікацію апарата Daphniidae. Кількість фільтруючих щетинок невелика. Наприклад, *Chydorus* здатний фільтрувати і захоплювати часточки як в воді, так і з субстратів.

Daphniidae характеризуються прямим кишківником. Передня частина їх середньої кишки утворює парні сліпі відростки – печінкові вирости.

У Chydoridae середня кишка петлеподібно вигнута. Є сліпий відросток. Петля збільшує довжину травної системи і забезпечує краще засвоєння компонентів раціону.

Латентні стадії Daphniidae у вигляді ефіппіума з 1–2 яйцями. Ефіппіум сідлоподібний, у його формуванні бере участь тільки задня частина спинного краю черепашки.

Ефіппіум Chydoridae примітивний з одним яйцем. При утворенні такого примітивного ефіппіума у Chydoridae спинний край стулок потовщується, а внутрішня частина заповнюється клітинами різної форми, що оточують яйце щільною масою.

У Chydoridae і Daphniidae є статевий диморфізм. Самці завжди менші від самок. У багатьох Chydoridae черевний край стулок самця дещо звивистий. У самців *Daphnia* – витягнутий і опушений спереду.

Представники родів *Scapholeberis* і *Simocephalus* (Daphniidae) потребують певного субстрату для періодичного прикріплення. Поряд з Chydoridae вони є характерними формами заростевого комплексу Cladocera.

Здатність до плавання і активна діяльність очищувальної частини фільтрувального апарата Chydoridae дозволяє їм прожити як серед заростей, так і в пелагіалі.

Нерівномірність горизонтального розподілу Cladocera проявляється у відособленні різноманітних комплексів форм відповідно до існуючих у водоймах біотопів. Поряд з цим спостерігається значна відмінність у чисельності рачків різних частин водойм.

У заростях водної рослинності, завдяки наявності значної кількості їжі (бактерії і детрит), як правило, в усіх водоймах гіллястовусі раки більш чисельні, ніж у відкритій частині.

Менш за все населене рачками відкрите прибережжя. Тут завдяки хвилям постійно скаламучуються донні відклади, наявність в товщі води яких згубна для фільтраторів.

У багатьох хороших плавців періоди плавання чергуються із станом нерухомості, коли рачки тим чи іншим способом утримуються на субстраті. *Simocephalus* (Daphniidae) підвішується до стебел і листків рослин за допомогою присоски. Chydoridae прикріплюються до субстрату переднім краєм стулок. Chydoridae, які мають здатність до фільтрації, поряд із захопленням харчових часточок з дна або з поверхні рослин, трапляються у різних ділянках водойм, проте найбільш багато вони представлені серед заростей. Представники *Simocephalus*, поряд з Chydoridae, є характерними формами заростевого комплексу.

Здатність до плавання і активна діяльність очищувальної частини фільтрувального апарата *Ceriodaphnia* обумовлюють їх перебування як серед заростей, так і в пелагіалі.

Видова структура Daphniidae і Chydoridae представлена у табл. 1. Всього у водоймах виявлено 42 види гіллястовусих раків, що належать до 7 родин і 19 родів (Іванець, 2013, 2014; Ivanets, Chernobay, 2016; Ivanets, Koval, 2016;). До родин Chydoridae і Daphniidae належать відповідно 8 і 5 родів, 18 та 17 видів. Компаративний аналіз проводився з врахуванням особливостей біології та трофіки гіллястовусих. Представленість родини Chydoridae за числом родів у кладоцерової становить 42%, а за числом видів – 43%. Для родини Daphniidae ці показники становлять відповідно 27% і 41%.

На рівні родин Chydoridae в структурі кладоцерової є поруч з родиною Daphniidae. Вони займають різні біотопи і не конкурують. Chydoridae – це, насамперед, прибережні, літоральні форми, Daphniidae – пелагічні. На рівні родів першу за значимістю функціональну групу (15% від усього видового складу) утворюють *Daphnia*, *Ceriodaphnia* (Daphniidae), другу групу (10% від загальної кількості видів) утворюють *Alona*, *Chydorus*, *Pleuroxus* (Chydoridae). У першій і другій групах родів спостерігається збільшення кількості таксономічних одиниць нижчого рангу при вирівнюванні їхньої значимості у ценозі. Групи представлені відповідно двома і трьома таксонами, що становлять по 30% за кількістю видів. Це свідчить про добре розвинену трофічну сітку кладоцерової. Менш різноманітні групи родів нижчих рангів відіграють провідну роль у ценозах за стресових ситуацій, детермінуючи в цілому функціональну стабільність угруповань. Гіллястовусі другого трофічного рівня є своєрідним біофільтром, який очищає водойми і підтримує екологічний баланс екосистем.

Таблиця 1.

Видова структура Daphniidae і Chydoridae Українського Розточчя

Родина Daphniidae	Родина Chydoridae
<p>Рід Ceriodaphnia <i>Ceriodaphnia laticaudata</i> P. E. Muller, 1867 <i>Ceriodaphnia megops</i> Sars, 1862 <i>Ceriodaphnia pulchella</i> Sars, 1862 <i>Ceriodaphnia quadrangula</i> (O. F. Muller, 1785) <i>Ceriodaphnia dubia</i> Richard, 1894 <i>Ceriodaphnia reticulata</i> (Jurine, 1820)</p> <p>Рід Daphnia <i>Daphnia (Ctenodaphnia) carinata</i> King, 1853 <i>Daphnia (C.) magna</i> Straus, 1820 <i>Daphnia (D.) cucullata</i> Sars, 1862 <i>Daphnia (D.) hyalina</i> Leydig, 1860 <i>Daphnia (D.) longispina</i> (O. F. Muller, 1776) <i>Daphnia (D.) pulex</i> Leydig, 1860</p> <p>Рід Moina <i>Moina brachiata</i> (Jurine, 1820) <i>Moina micrura</i> Kurz, 1875</p> <p>Рід Scapholeberis <i>Scapholeberis mucronata</i> (O. F. Muller, 1776) <i>S. kingi</i> Sars, 1888</p> <p>Рід Simocephalus (Simocephalus) <i>Simocephalus (S.) vetulus</i> (O. F. Muller, 1776)</p>	<p>Рід Acroperus <i>Acroperus harpae</i> (Baird, 1834)</p> <p>Рід Alona <i>Alona affinis</i> (Leydig, 1860) <i>Alona guttata</i> Sars, 1862 <i>Alona quadrangularis</i> (O. F. Muller, 1776) <i>Alona rectangula</i> Sars, 1862</p> <p>Рід Alonella <i>Alonella excisa</i> Fischer, 1854 <i>Alonella nana</i> (Baird, 1843)</p> <p>Рід Chydorus <i>Chydorus globosus</i> Baird, 1850 <i>Chydorus latus</i> Sars, 1862 <i>Chydorus ovalis</i> Kurz, 1875 <i>Chydorus sphaericus</i> (O. F. Muller, 1776)</p> <p>Рід Disparalona <i>Disparalona rostrata</i> (Koch, 1841)</p> <p>Рід Graproleberis <i>Graproleberis testudinaria</i> (Fischer, 1851)</p> <p>Рід Pleuroxus <i>Pleuroxus (P.) trigonellus</i> (O. F. Muller, 1776) <i>Pleuroxus (P.) uncinatus</i> (Baird, 1850) <i>Pleuroxus (P.) truncatus</i> (O. F. Muller, 1776) <i>Pleuroxus (T.) aduncus</i> (Jurine, 1820)</p> <p>Рід Tretosephala <i>Tretosephala ambigua</i> (Lilljeborg, 1901)</p>

Структура домінування родин Daphniidae і Chydoridae у водоймах Українського Розточчя подана в табл. 2 і табл. 3. Домінуючий комплекс Daphniidae представлений родами *Daphnia* (*D. longispina*, *D. pulex*), *Ceriodaphnia* (*C. laticaudata*), *Simocephalus* (*S. vetulus*). Причому *Simocephalus* значно поширений, насамперед, у літоралі водойм і характеризується низкою адаптацій, котрі забезпечують йому оптимальні умови у прибережних заростях.

Зокрема, у представників цього таксону є здатність прикріплюватися до субстрату, що дозволяє оптимізувати енерговитрати. На стулках є шипи, котрі виконують захисну функцію.

Simocephalus має також досконалий фільтрувальний апарат, який забезпечує ефективне засвоєння великої кількості зважених часток, яких є багато у прибережній зоні (Orlova-Bienkowska, 2001; Young et al., 2012). У Chydoridae домінуючий комплекс представлений родом *Chydorus*. Причому керівну роль у цьому випадку відіграють види *Ch. ovalis* і *Ch. sphaericus*.

Матеріали по характеристиці родин Daphniidae і Chydoridae були враховані при підготовці визначника прісноводного планктону Європи із зазначенням особливостей екології та поширення організмів (Błędzki, Rybak, 2016).

Таблиця 2.

Структура домінування родини Daphniidae у водоймах Українського Розточчя

№	Таксони	В, %	Р, %	$P\sqrt{B_i}$
1	<i>Daphnia (D.) longispina</i> (O. F. Muller, 1776)	11,3	61,3	84,2
2	<i>Daphnia (D.) pulex</i> Leydig, 1860	11,2	58,4	79,3
3	<i>Ceriodaphnia laticaudata</i> P. E. Muller, 1867	6,7	21,3	55,3
4	<i>Simocephalus (S.) vetulus</i> (O. F. Muller, 1776)	5,4	42,2	44,2
5	<i>Moina brachiata</i> (Jurine, 1820)	5,3	35,4	41,1
6	<i>Ceriodaphnia quadrangula</i> (O. F. Muller, 1785)	4,2	19,4	17,1
7	<i>Daphnia (C.) magna</i> Straus, 1820	1,2	29,3	12,2
8	<i>Scapholeberis mucronata</i> (O. F. Muller, 1776)	0,4	14,2	6,3
9	<i>Ceriodaphnia pulchella</i> Sars, 1862	0,5	12,1	3,4
10	<i>Daphnia (D.) cucullata</i> Sars, 1862	0,5	10,3	2,1
11	<i>Daphnia (D.) hyalina</i> Leydig, 1860	0,5	9,3	2,1
12	<i>Ceriodaphnia megops</i> Sars, 1862	0,4	8,2	<1
13	<i>Ceriodaphnia dubia</i> Richard, 1894	0,4	7,4	<1
14	<i>Daphnia (Ctenodaphnia) carinata</i> King, 1853	0,3	7,2	<1
15	<i>Moina micrura</i> Kurz, 1875	0,2	5,1	<1
16	<i>Ceriodaphnia reticulata</i> (Jurine, 1820)	0,2	5,1	<1
17	<i>Scapholeberis kingi</i> Sars, 1888	0,2	5,1	<1

Примітка: В, % – частка біомаси виду від загальної біомаси у кладоцероценозі; Р, % – частота трапляння виду (відсоток проб, у яких траплявся вид); $P\sqrt{B_i}$ – індекс домінування (де Р – частота трапляння виду, B_i – біомаса виду); <1 – значення показника менше від одиниці.

Таблиця 3.

Структура домінування родини Chydoridae у водоймах Українського Розточчя

№	Таксони	В, %	Р, %	$P\sqrt{B_i}$
1	<i>Chydorus ovalis</i> Kurz, 1875	6,1	52,3	63,4
2	<i>Chydorus sphaericus</i> (O. F. Muller, 1776)	5,1	38,2	41,4
3	<i>Chydorus latus</i> Sars, 1862	1,2	9,2	3,4
4	<i>Alona rectangularis</i> Sars, 1862	1,2	8,2	2,3
5	<i>Pleuroxus (P.) truncatus</i> (O. F. Muller, 1776)	1,2	6,4	2,3
6	<i>Pleuroxus (T.) aduncus</i> (Jurine, 1820)	1,2	5,3	2,2
7	<i>Acroperus harpae</i> (Baird, 1834)	0,7	5,3	2,1
8	<i>Alona affinis</i> (Leydig, 1860)	0,7	4,1	2,1
9	<i>Alona guttata</i> Sars, 1862	0,7	4,1	1,2
10	<i>Alona quadrangularis</i> (O. F. Muller, 1776)	0,6	4,1	1,3
11	<i>Alonella excisa</i> Fischer, 1854	0,6	3,2	<1
12	<i>Alonella nana</i> (Baird, 1843)	0,5	3,2	<1
13	<i>Chydorus globosus</i> Baird, 1850	0,5	3,3	<1
14	<i>Disparalona rostrata</i> (Koch, 1841)	0,4	3,3	<1
15	<i>Graproleberis testudinaria</i> (Fischer, 1851)	0,4	2,3	<1
16	<i>Pleuroxus (P.) trigonellus</i> (O. F. Muller, 1776)	0,3	2,1	<1
17	<i>Pleuroxus (P.) uncinatus</i> (Baird, 1850)	0,2	1,2	<1
18	<i>Treptocephala ambigua</i> (Lilljeborg, 1901)	0,1	1,2	<1

Примітка: позначення такі ж, як в табл. 2.

Висновки

Таким чином, представленість родини Chydoridae за числом родів у кладоцерової становить 42%, а за числом видів – 43%. Для родини Daphniidae ці показники становлять відповідно 27% і 41%. На рівні родин Chydoridae в структурі кладоцерової є поруч з родиною Daphniidae. Вони займають різні біотопи і не конкурують. Chydoridae – це, насамперед, прибережні, літоральні форми, Daphniidae – пелагічні. На рівні родів першу за значимістю функціональну групу (15% від усього видового складу) утворюють *Daphnia*, *Ceriodaphnia* (Daphniidae), другу групу (10% від загальної кількості видів) утворюють *Alona*, *Chydorus*, *Pleuroxus* (Chydoridae). У першій і другій групах родів спостерігається збільшення кількості таксономічних одиниць нижчого рангу при вирівнюванні їхньої значимості у ценозі. Групи представлені відповідно двома і трьома таксонами, що становлять по 30% за кількістю видів. Це свідчить про добре розвинену трофічну сітку кладоцерової. Менш різноманітні групи родів нижчих рангів відіграють провідну роль у ценозах за стресових ситуацій, детермінуючи в цілому функціональну стабільність угруповань.

Домінуючий комплекс Daphniidae представлений родами *Daphnia* (*D. longispina*, *D. pulex*), *Ceriodaphnia* (*C. laticaudata*), *Simocephalus* (*S. vetulus*). Причому *Simocephalus* значно поширений, насамперед, у літоралі водойм і характеризується низкою адаптацій, котрі забезпечують йому оптимальні умови у прибережних заростях. У Chydoridae домінуючий комплекс представлений родом *Chydorus*. Причому керівну роль у цьому випадку відіграють види *Ch. ovalis* і *Ch. sphaericus*. Менш різноманітні групи родів нижчих рангів відіграють провідну роль у ценозах за стресових ситуацій, детермінуючи в цілому функціональну стабільність угруповань.

Гіллястовусі другого трофічного рівня є своєрідним біофільтром, який очищає водойми і підтримує екологічний баланс екосистем.

Список літератури

- Іванець О.Р. Фауна гіллястовусих раків (Crustacea, Cladocera) Українського Розточчя // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. – 2013. – Вип.63. – С. 110–117. /Ivanets' O.R. Fauna gillyastovusykh rakiv (Crustacea, Cladocera) Ukrain's'kogo Roztochchya // Visn. L'viv. un-tu. Ser. biol. – 2013. – Vyp.63. – S. 110–117./
- Іванець О.Р. Еколого-морфологічна характеристика роду *Daphnia* O.F. Müller, 1785 (Crustacea, Cladocera) Українського Розточчя // Біологічні Студії / Studia Biologica. – 2014. – Т.8, №2. – С. 169–186. /Ivanets' O.R. Ekologo-morphologichna kharakterystyka rodu *Daphnia* O.F. Müller, 1785 (Crustacea, Cladocera) Ukrain's'kogo Roztochchya // Biologichni Studii / Studia Biologica. – 2014. – T.8, no. 2. – S. 169–186./
- Іванець О.Р. Таксономія та еколого-морфологічна характеристика роду *Graptoleberis* (Sars, 1862) (Cladocera: Anomopoda: Chydoridae) Українського Розточчя // Вісник Львівського ун-ту. Сер. біол. – 2017а. – Вип.75. – С. 99–106. /Ivanets' O.R. Taksonomiya ta ekologo-morphologichna kharakterystyka rodu *Graptoleberis* (Sars, 1862) (Cladocera: Anomopoda: Chydoridae) Ukrain's'kogo Roztochchya // Visn. L'viv. un-tu. Ser. biol. – 2017a. – Vyp.75. – S. 99–106./
- Іванець О.Р. Компаративний аналіз таксономічної структури Chydoridae Dybowski & Grochowski, 1894 і Daphniidae Straus, 1820 Українського Розточчя // Наук. конфер. «Фауна України на межі ХХ–ХХІ ст. Нові концепції зоологічних досліджень». – Харків: Харківський національний ун-т імені В.Н.Каразіна, 2017б. – С. 16–17. /Ivanets' O.R. Komparatyvnyy analiz taksonomichnoi struktury Chydoridae Dybowski & Grochowski, 1894 i Daphniidae Straus, 1820 Ukrain's'kogo Roztochchya // Nauk. konfer. "Fauna Ukrainy na mezhi XX–XXI st. Novi kontseptsii zoologichnykh doslidzhen". – Kharkiv: Kharkivs'kyu natsional'nyy un-t imeni V.N.Karazina. – 2017b. – S. 16–17./
- Ковальчук І., Петровська М. Геоекологія Розточчя: монографія. – Львів: Вид. центр ЛНУ ім. І. Франка, 2003. – 192с. /Koval'chuk I., Petrovs'ka M. Geoekologiya Roztochchya: monografiya. – L'viv: Vyd. tsentr LNU im. I. Franka, 2003. – 192s./
- Коровчинский Н.М. Ветвистоусые ракообразные отряда Stenopoda мировой фауны (морфология, систематика, экология, зоогеография). – М.: Т-во науч. изданий КМК, 2004. – 410с. /Korovchinskiy N.M. Vetvistousyye rakoobraznyye otriyada Stenopoda mirovoy fauny (morfologiya, sistematika, ekologiya, zoogeografiya). – M.: T-vo nauch. izdaniy KMK, 2004. – 410s./
- Мануйлова Е.Ф. Ветвистоусые рачки (Cladocera) фауны СССР. – Л.: Наука, 1964. – 327с. /Manuylova E.F. Vetvistousyye rachki (Cladocera) fauny SSSR. – L.: Nauka, 1964. – 327s./
- Методи гідроекологічних досліджень поверхневих вод / О.М.Арсан, О.А.Давидов, Т.М.Дяченко та ін. – К.: Логос, 2006. – 408с. /Metody gidroekologichnykh doslidzhen' poverkhnevyykh vod / O.M.Arsan, O.L.Davydov, T.M.Dyachenko ta in. – K.: Logos, 2006. – 408s./
- Смирнов Н.Н. Chydoridae фауны мира // Фауна СССР. Ракообразные. – 1971. – Т.1, вып.2. – Л.: Наука. – 531с. /Smirnov N.N. Chydoridae phauny mira // Fauna SSSR. Rakoobraznyye. – 1971. – T.1, vyp.2. – L.: Nauka. – 531s./

- Смирнов Н.Н. Macrothricidae и Moinidae фауны мира // Фауна СССР. Ракообразные. – 1976. – Т.1, вып.3. – Л.: Наука. – 237с. /Macrothricidae i Moinidae fauna mira // Fauna SSSR. Rakoobraznyye. – 1976. – Т.1, вып.3. – Л.: Nauka. – 237s./
- Блędzki L.A., Rybak J.I. Freshwater Crustacean Zooplankton of Europe: Cladocera & Copepoda (Calanoida, Cyclopoida). Key to species identification, with notes on ecology, distribution, methods and introduction to data analysis. – Switzerland: Springer International Publishing Switzerland, 2016. – 918p.
- Buraczyński J., Hnatiuk R., Zinko J. Regiony geomorfologiczne Roztocza // Українська геоморфологія: стан і перспективи: Матер. міжнар. наук.-практ. конф. – Львів: Меркатор, 1997. – С. 91–95. /Buraczynski J., Hnatiuk R., Zinko J. Regiony geomorfologiczne Roztocza // Ukrains'ka geomorfologiya: stan i perspektyvy: Mater. mizhnar. nauk.-prakt. konf. – L'viv: Merkator, 1997. – S. 91–95./
- Flössner D. Die Haplopoda und Cladocera (ohne Bosminidae) Mitteleuropas. – Backhuys Publishers, Leiden, 2000. – 428s.
- Hudec I. Fauna Slovenska III. Anomopoda, Ctenopoda, Haplopoda, Onychopoda (Crustacea: Branchiopoda). – Bratislava: Veda, 2010. – 496p.
- Hudec I. *Graptoleberis testudinaria* (Cladocera, Chydoridae) in Slovakia // Věstník Československé společnosti zoologické. – 1988 (52). – P. 98–105.
- Ivanets O.R. Zooplankton of the water vegetation in the ponds of the west forest-steppe of Ukraine // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. – 2011. – Вип.56. – С. 148–156. /Ivanets O.R. Zooplankton of the water vegetation in the ponds of the west forest-steppe of Ukraine // Visn. L'viv. un-tu. Ser. biol. – 2011. – Vyp.56. – S. 148–156./
- Ivanets O.R., Chernobay D. The genus *Diaphanosoma* Fisher, 1850 (Ctenopoda: Sididae) from basin of Vereshchyn's'ya // Мат-ли XII Міжнар. конф. студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології». – Львів: Сполом, 2016. – С. 216–217. /Ivanets O., Chernobay D. The genus *Diaphanosoma* Fisher, 1850 (Ctenopoda: Sididae) from basin of Vereshchyn's'ya // M-ly XII Mizhnar. konf. studentiv i aspirantiv "Molod' i postup biologii". – L'viv: Spolom, 2016. – S. 216–217./
- Ivanets O.R., Koval Y. The genus *Sida* Straus, 1820 (Cladocera: Ctenopoda) in the conditions of Ukrainian Roztocze // Мат-ли XII Міжнар. конф. студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології». – Львів: Сполом, 2016. – С. 217–218. /Ivanets O., Koval Y. The genus *Sida* Straus, 1820 (Cladocera: Ctenopoda) in the conditions of Ukrainian Roztocze // M-ly XII Mizhnar. konf. studentiv i aspirantiv "Molod' i postup biologii". – L'viv: Spolom, 2016. – S. 217–218./
- Koval Y., Ivanets O. *Acroperus harpae* (Baird, 1834) (Cladocera: Anomopoda: Chydoridae) in the taxonomic structure of cladocerenocenes Ukrainian Roztocze // М-ли XIII Міжнар. конф. студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології». – Львів: Сполом, 2017. – С.164. /Koval Y., Ivanets O. *Acroperus harpae* (Baird, 1834) (Cladocera: Anomopoda: Chydoridae) in the taxonomic structure of cladocerenocenes Ukrainian Roztocze // M-ly XIII Mizhnar. konf. studentiv i aspirantiv "Molod' i postup biologii". – L'viv: Spolom, 2017. – S.164./
- Kovalchuk A.A., Ivanets O.R. The impact of damming and water poundage on the formation and structure of zooplanktocoenoses in the conditions of rivers in the Ukrainian Roztocze (the "outer" or "chunk" Carpathians) // Issues and challenges of small hydropower development in the Carpathians region (hydrology, hydrochemistry, and hydrobiology of watercourses). Monograph. – Uzhgorod-L'viv-Kyiv: Biological Faculty of L'viv National University & Hydroecological society "Uzh", 2016. – P. 138–151.
- Orlova-Bienkowskaja M.Y. Cladocera: Anomopoda, Daphniidae: genus *Simocephalus*. – Leiden, the Netherlands: Backhuys, 2001. – 130p.
- Young S.S., Ni M.H., Liu M.Y. Systematic study of the *Simocephalus* sensu stricto species group (Cladocera: Daphniidae) from Taiwan by morphometric and molecular analyses // Zoological Studies. – 2012. – Vol.51 (2). – P. 222–231.
- Wetzel R.G., Likens G.E. Limnological analyses. – W.B.Saunders Company, Philadelphia-London-Toronto, 1979. – 357p.

Представлено: А.С.Сусуловський / Presented by: A.S.Susulovsky

Рецензент: А.Ю.Утевський / Reviewer: A.Yu.Utevsky

Подано до редакції / Received: 03.11.2017

УДК: 599. 322.2 (477.54)

**Стан поселення, типи сімейних ділянок та перспективи збереження степового бабака у крейдяному ландшафті НПП «Дворічанський»
В.І.Ронкін^{1,2}, Г.О.Савченко^{1,2}, А.А.Атемасов¹**

¹Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна (Харків, Україна)

²Національний природничий парк «Дворічанський» (Харківська обл., Україна)
ronkinvl@discover-ua.com

Представлені дані багаторічних спостережень (2003–2017 рр.) за поселенням степового бабака, що розташовано на правому березі р. Оскіл (Харківська обл.). Виділення і картування сімейних ділянок проводилося за загальноприйнятою методикою. Мета роботи – обґрунтування і пропозиція заходів щодо запобігання зникнення поселень бабаків. Основні завдання: 1) підрахунок кількості сімей степового бабака; 2) аналіз просторової структури поселення і співвідношення типів сімейних ділянок; 3) виявлення основних тенденцій зміни цих параметрів. У статті наводиться список основних чинників, що мають позитивний вплив на популяції бабака. За 5-бальною шкалою оцінюється сила їх впливу на різні частини поселення, а також життєздатність цих частин. Ілюструється співвідношення трьох типів сімейних ділянок і його зміна в процесі трансформації поселення. Відзначається, що кількість сімей продовжує зменшуватися, стан поселення визнається незадовільним. На підставі даних про переважні типи ділянок та особливості структури поселення обґрунтовано заходи щодо збереження степового бабака. Як захід, що є альтернативою випасу копитних, розглядається введення режиму багаторазового косіння лугових травостоїв в межах кормових ділянок окремих сімей. Пропонується виключення степового бабака зі списку мисливсько-промислових видів і внесення його до Червоної книги України.

Ключові слова: бабак, випас, сінокосіння, степи, луки, кормова ділянка, кормові рослини, кормові потреби.

**Home range types, condition and outlook of the steppe marmot settlement in the chalky landscape of “Dvorichanskyi” NNP
V.I.Ronkin, G.A.Savchenko, A.A.Atemasov**

The results of long-term observations (2003–2017) in the settlement of the steppe marmot inhabiting the right bank of the Oskol River (Kharkov region) are given. Identification and mapping of marmot home ranges was carried out according to the standard method. The purpose of the work is to substantiate and propose measures to prevent the disappearance of marmot settlements. The main tasks: 1) to count the number of the marmot families; 2) to analyze the spatial structure of the settlement and the ratio of types of the home ranges; 3) to determine the main trends in the change of these parameters. In the article, the main factors that have a positive impact on marmot population are listed. According to the 5-point scale, the strength of their influence in different parts of the settlement is assessed, as well as the viability of the settlement parts. The ratio of the three types of home ranges is illustrated, and its change in the transformation process of the settlement. It is noted that the number of families continues to decrease; the condition of the settlement is recognized as unsatisfactory. Based on the data about prevailing type of home ranges and features of the settlement structure, measures to preserve the steppe marmot are justified. As the measure similar to cattle grazing, the repeated mowing of meadow grass stands within the foraging areas of concrete families is considered. It is proposed to exclude steppe marmot from the list of hunting and commercial species and introduce it into the Red Book of Ukraine.

Key words: marmot, grazing, moving, steppes, meadows, foraging area, foraging plants, foraging needs.

**Состояние поселения, типы семейных участков и перспективы сохранения степного сурка в меловом ландшафте НПП «Дворечанский»
В.И.Ронкин, Г.А.Савченко, А.А.Атемасов**

Представлены данные многолетних наблюдений (2003–2017 гг.) за поселением степного сурка, расположенным на правом берегу р. Оскол (Харьковская обл.). Выделение и картирование семейных участков проводилось по общепринятой методике. Цель работы – обоснование и предложение мер по предотвращению исчезновения поселений сурка. Основные задачи: 1) подсчет числа семей степного

сурка; 2) анализ пространственной структуры поселения и соотношение типов семейных участков; 3) выявление основных тенденций изменения этих параметров. В статье приводится список основных факторов, оказывающих положительное влияние на популяции сурка. По 5-балльной шкале оценивается сила их воздействия на различные части поселения, а также жизнеспособность этих частей. Иллюстрируется соотношение трех типов семейных участков и его изменение в процессе трансформации поселения. Отмечается, что число семей продолжает уменьшаться, состояние поселения признается неудовлетворительным. На основании данных о преобладающем типе участков и особенностях структуры поселения обоснованы меры по сохранению степного сурка. В качестве меры, альтернативной выпасу копытных, рассматривается введение режима многократного кошения луговых травостоев в пределах кормовых участков отдельных семей. Предлагается исключение степного сурка из списка охотничье-промысловых видов и внесение его в Красную книгу Украины.

Ключевые слова: степной сурок, выпас, сенокосение, степи, луга, кормовой участок, кормовые растения, кормовые потребности.

Введение

Первые данные о численности поселений степного сурка (*Marmota bobak* Müller, 1776) в Двуречанском районе Харьковской области содержатся в рукописи И.А.Кривицкого и В.А.Токарского (1983), однако сведений о поселении, изучению которого посвящена настоящая работа, в ней нет. Учет сурка на территории, входящей в настоящее время в национальный природный парк (НПП) «Двуречанский», был проведен В.А.Токарским в 1996–1997 гг. (Токарский, 1997; Токарский и др., 2011). По данным автора, на тот момент здесь обитало 375 семей.

Своеобразие поселения НПП «Двуречанский» и его окрестностей состоит в том, что степной сурок здесь обитает на стыке меловой степи и пойменного луга, и в настоящее время этот вид рассматривается как неотъемлемая часть уникального мелового ландшафта национального парка. Однако общей тенденцией для популяций европейского подвида степного сурка на современном этапе является падение численности. Главной причиной такого упадка является резкое ухудшение кормовой базы, вызванное прекращением выпаса скота в местообитаниях степного сурка (Токарский и др., 2011; Ronkin et al., 2009). Основной целью настоящей работы является обоснование и предложение мер по поддержанию кормовой базы, способных предотвратить в ближайшем будущем возможное исчезновение степного сурка на территории НПП «Двуречанский» и в других поселениях. В задачи работы входило: 1) подсчет числа семей степного сурка; 2) анализ пространственной структуры поселения и соотношение типов семейных участков; 3) выявление основных тенденций изменения этих параметров.

Методика

Наблюдения за состоянием поселения степного сурка НПП «Двуречанский» и его окрестностей проводились в 2003–2017 гг. При сборе материала отмечались основные растительные сообщества в пределах того или иного семейного участка, оценивались факторы, воздействующие на популяцию (выпас, сенокосение, выжигание сухой растительности и т.д.), и сила их влияния по 5-балльной шкале (0 – отсутствие влияния, 1 – очень слабое влияние, 2 – слабое, 3 – среднее, 4 – сильное, 5 – очень сильное). Отнесение того или иного фактора к категории положительных для степного сурка производилось на основании ранее опубликованных данных и обобщений по этим вопросам (Середнева, 1986; Ronkin, Savchenko, 2004; Токарский и др., 2011; Колесников, 2011). В 2015 г. все семейные участки сурка от с. Новомлынск до с. Тополи были зартированы с помощью GPS-навигатора (Garmin Oregon). При обработке данных использовалась программа QGIS v.2.18.8.

Выделение участков проводилось по общепринятой методике (Середнева, 1986). Главным атрибутом участка считалась зимовочная нора; ее координаты вводились в базу данных. Постоянные норы, расположенные на расстоянии менее 35 м друг от друга, рассматривались как атрибуты одного и того же участка. По внешним признакам участки делились на три группы: 1 – жилые, 2 – заброшенные, 3 – участки, статус, которых остался невыясненным. Хорошо разработанные и расчищенные лазы нор, обжитые бутаны, натоптанные тропы, сеть временных нор являлись показателями жилого семейного участка. Параметры обжитого бутана: наличие внешних уборных и экскрементов, следы роющей деятельности, следы лежки, свежий пробочный и гнездовой материал, уплотненный грунт, притоптанная растительность.

Жизнеспособность поселения рассматривалась в данном исследовании как интегральный показатель его состояния. Она оценивалась по 5-балльной шкале на основании сравнения данного поселения с параметрами поселений, расположенных в зоне оптимума, жизнеспособность которых принималась за максимальную. Для Украины зоной оптимума признаны местообитания, где территория поселения используется семьями максимально полно и заброшенные участки отсутствуют. Расстояние между соседними участками составляет 67 ± 7 м, число постоянных нор, находящихся в распоряжении каждой семьи, – $2 \pm 0,2$ (Середнева, 1986). Поскольку к зоне оптимума относятся, как правило, постоянно выпасаемые местообитания, высота травостоя в этой зоне составляет в середине сезона активности 4–9 см (Ronkin, Savchenko, 2016), тропы не просматриваются, подушка ветоши отсутствует. В контексте вышеизложенного следующие характеристики служили составляющими для оценки жизнеспособности поселения: 1) «коэффициент заброшенности» (K_z), т.е. доля суммы заброшенных участков и участков с невыясненным статусом от общего числа всех зарегистрированных. $K_z = (B+C) * 100\% / (A+B+C)$, где А – жилые участки, В – заброшенные, С – участки с невыясненным статусом; 2) расстояние между соседними жилыми участками; 3) преобладающая в период наживочной активности сурков высота травостоя; 4) наличие подушки ветоши в весенний и раннелетний период.

Результаты и обсуждение

Поселение степного сурка НПП «Двуречанский» и его окрестностей имеет типичную ленточную (Бибииков, 1967) структуру и простирается вдоль правого коренного берега р. Оскол. В настоящее время его ширина почти на всем протяжении соответствует продольному размеру одного семейного участка. Ранее поселение имело боковые ответвления во все балочные системы, имеющие выход в пойму р. Оскол. Обширность этих балочных систем способствовала многочисленности данного поселения.

Вплоть до 2000-х гг. все местообитания степного сурка в той или иной степени использовались как пастбища для поголовья крупного рогатого скота, находящегося в ведении народнохозяйственных животноводческих комплексов. Основным местом выпаса были луга, в результате чего их растительный покров в течение всего сезона вегетации сохранялся зеленым и постоянно стравливался скотом на высоте 3–5 см. Наблюдения, начатые в 2003 г., позволили проследить за трансформацией поселения после прекращения тотального интенсивного выпаса, которое произошло в результате ликвидации животноводческих комплексов и летних лагерей крупного рогатого скота. Отметим, что фактор выпаса сохранялся в период исследований лишь на ограниченных территориях поселения сурков вблизи с. Красное, с. Каменка и с. Тополи, благодаря тому, что местное население продолжало выпасать здесь домашний скот.

Было отмечено, что в первые годы после прекращения выпаса многие семейные участки боковых ответвлений (в балках) были полностью заброшены. В то же время, практически все семейные участки прирусловой части продолжали выглядеть обитаемыми. Высота луговых травостоев в летний период в первый же год после прекращения выпаса достигала 75–105 см. Визуальные наблюдения за использованием наиболее обжитой зоны семейного участка (куда входят постоянные и некоторые временные норы, связанные между собой сетью тропинок) во временном аспекте позволили установить, что многие участки используются животными не весь сезон активности (чаще всего лишь в первую его половину.) Ранее, при работе с мечеными сурками на территории стационара возле с. Нестеривка (Великобурлукский район, Харьковская обл.), мы наблюдали, что после отлова всех членов той или иной семьи и передерживания животных в клетках их норы занимают соседями. При наблюдении за несколькими семьями, обитающими на отрезке поселения между с. Новомлынск и с. Красное, подтвердилось предположение, что здесь имеет место то же явление. Было зарегистрировано несколько случаев, когда одна семья использует участки, на которых прежде обитали соседние семьи. Впоследствии мы учли этот аспект при указании числа семей и исходили из совокупности двух-трех подсчетов в разные сезоны года. Из них следовало, что в прирусловой части в первые годы после снятия пастбищной нагрузки происходило снижение плотности поселения, которое сопровождалось расширением территорий оставшихся семей за счет использования освободившихся соседних участков. Это соответствует данным Т.А.Середневой (1986), которая указывает, что в местообитаниях, отличных от оптимальных, расстояние между норами соседних семей возрастает в 2–3 раза.

В последующие годы в прирусловой части поселения стали возникать протяженные участки, не заселенные животными, в результате чего оно становилось все более фрагментированным. По результатам учетов В.А.Токарского (Токарский и др., 2011), к 2005–2006 гг. плотность населения в прирусловой части упала в 5 раз по сравнению с 2003 г. и более чем в 5,5 раз по сравнению с 1996–1997 гг.

К настоящему времени поселение разделено на четыре обособленные части, в основном локализованные вблизи сел, по имени которых они названы («Новомлынский», «Красное», «Каменка», «Тополь»), и включает 60 семей. Расстояние между жилыми участками, расположенными на границах фрагментов, составляет от 1178 до 4644 м (рис. 1).

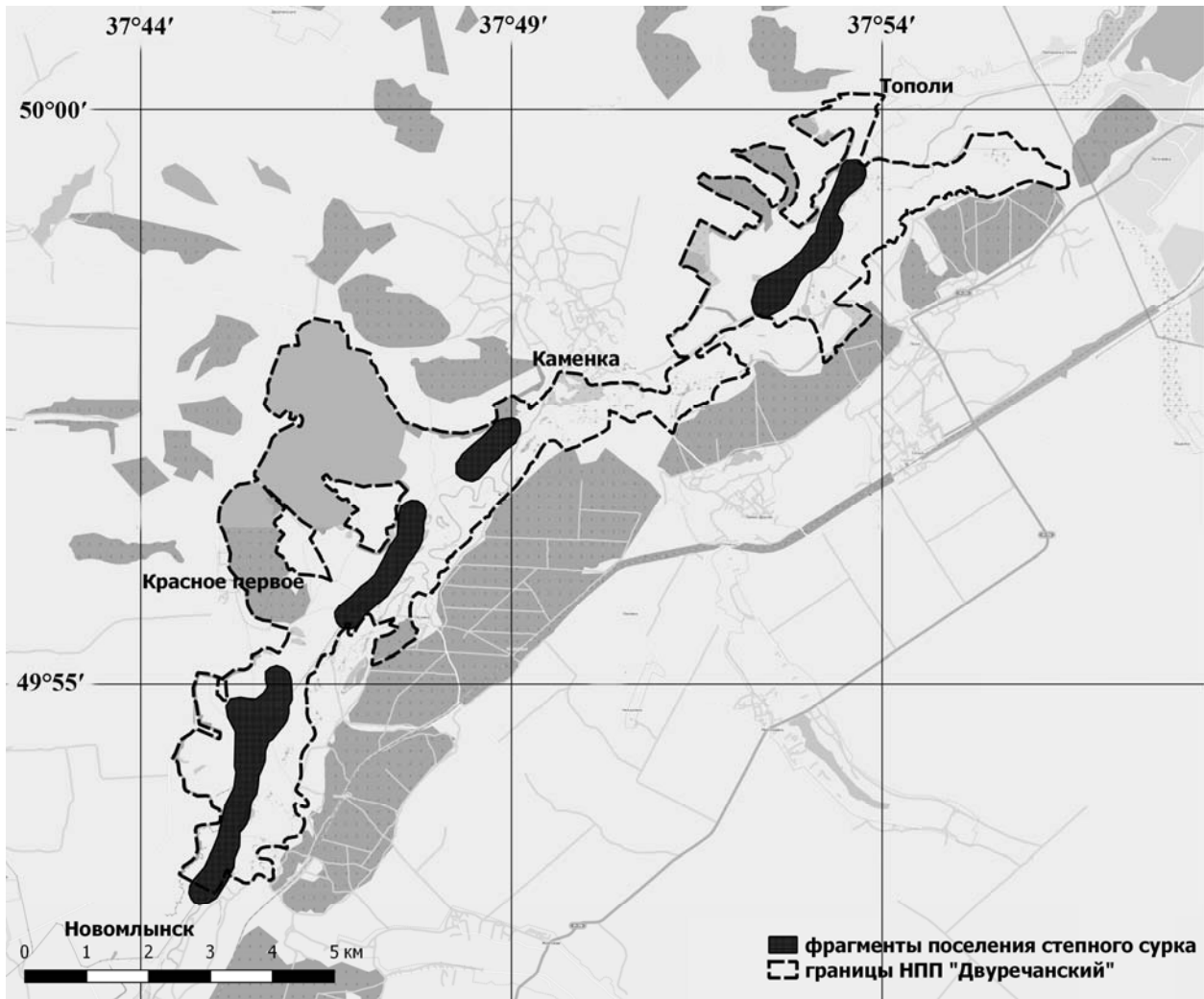


Рис. 1. Локализация фрагментов поселения степного сурка НПП «Двуречанский».

В табл. 1 приведены основные факторы, которые оказывают позитивное влияние на кормовую базу степного сурка в каждом из выделенных фрагментов.

Почти все приведенные факторы, так или иначе, обсуждаются в литературе, кроме «лоскутного» выкашивания, которое представляет собой небольшие по площади, но регулярные покосы продуктивных травостоев (например, пырейников, мятликовников, беззостокостровников). Безусловно, «лоскутные» покосы представляют собой локальное явление, которое имеет значение лишь для небольшого числа семей, расположенных вблизи населенных пунктов. Тем не менее, для поддержания жизнеспособности отдельных семей этот фактор может иметь решающее значение, поскольку благодаря ему в течение всего периода активности сурков в их зоне

фуражирования появляются участки молодой зелени, что кардинально улучшает кормовые условия.

Таблица 1.

Оценка силы факторов, воздействующих на различные части поселения степного сурка НПП «Двуречанский» и его окрестностей (жизнеспособность фрагментов поселения оценена по 5-балльной шкале)

Фактор	Фрагменты			
	«Новомлыньск»	«Красное»	«Каменка»	«Тополи»
Выпас домашнего скота	0–2	0	3	0–2
Кошение на сено 1 раз в год	2–4	1	0	0–3
«Лоскутное» выкашивание на зеленый корм в течение сезона вегетации	3	0	0	0
Сеть грунтовых дорог с кормовой придорожной растительностью	2	1	1	1
Выжигание сухой фитомассы	2	0	0	1
Участки сорной и/или залежной растительности, отвечающей кормовым потребностям байбака, (например, на месте бывших хозяйственных построек, на залежах и т.п.)	3	0	0	1
Оценка жизнеспособности фрагмента поселения	2–3	1–2	3–4	1–3

Основные местообитания сурка в НПП «Двуречанский» – это подножия меловых склонов, примыкающие к пойменному лугу правого берега р. Оскол. На основании локализации зимовочных нор и кормовых зон нами выделены три основных типа семейных участков. 1. Норы расположены на склонах балок; зоной кормежки являются склоны и днища балок. 2. Норы находятся на меловых склонах либо у их подножий, примыкающих к обширным лугам (в основном включающим формации пырея ползучего, мятлика узколистного, овсяницы бороздчатой), на которых и располагаются кормовые участки. 3. Норы устроены на возвышенных местах обширных лугов, кормовые участки расположены вокруг них. Первый тип мы назвали мелово-степным, второй – комбинированным (так как в каждый участок обязательно входят как мелово-степные, так и луговые биотопы), третий – луговым.

Ниже мы приводим соотношение различных типов семейных участков НПП «Двуречанский» и его окрестностей и долю жилых участков внутри каждого из типов (рис. 2). Необходимо добавить, что, исходя из отмеченного выше процесса расширения территории оставшихся семей за счет освободившихся семейных участков, число нежилых участков, отраженное на рис. 2, не соответствует реальным показателям общего сокращения числа семей.

Как видно из рис. 2, в структуре изучаемого поселения преобладает комбинированный тип семейных участков, который является наиболее типичным для мелового ландшафта и предоставляет животным наибольший спектр условий для обеспечения жизненных потребностей. Подножия меловых холмов удобны для норения, а для кормежки животными используются те участки пойменного луга, где имеются их кормовые растения: пырей ползучий *Elytrigia repens* (L.) Nevski, мятлик узколистный *Poa angustifolia* L., клевер луговой *Trifolium pratense* L., василек луговой *Centaurea jacea* и др. (Ронкин, Савченко, 2014). Однако число участков комбинированного типа так же, как и обоих других типов, постепенно уменьшается. По итогам наблюдений, самым уязвимым оказался мелово-степной тип, что можно объяснить тем, что реакция растительности на прекращение выпаса в условиях меловой степи совершенно не отвечает кормовым потребностям сурков. Суммарная доля ксерофитов и ксеромезофитов в меловой степи значительно выше (73%), чем в типичной балочной степи на черноземах с различной степенью смытости (52%) (Ronkin, Savchenko, 2016). Почти все кормовые растения мелово-степных биотопов быстро прекращают вегетацию, и кормежка к середине лета возможна только на днищах балок, где влага сохраняется дольше. Но в условиях отсутствия выпаса копытных участки с повышенной влажностью проявляют

тенденцію к быстрому зарастанию древесно-кустарниковой растительностью, что приводит к окончательной непригодности данных местообитаний для сурков. Меньше всего сократилось число жилых участков лугового типа, растительность которых соответствует более влажным местообитаниям. Этот тип участков ранее был самым редким, но в настоящее время соотношение числа участков мелово-степного и лугового типа значительно изменилось. Если луг продолжает выпасаться, то здесь в изобилии на протяжении всего периода активности сурков присутствуют тысячелистник почтиобыкновенный *Achillea submillefolium* Klok. et Krytzka, одуванчик лекарственный *Taraxacum officinale* Webb. ex Wigg., клевер ползучий *Trifolium repens* L. Эти виды могут длительно вегетировать, что позволяет суркам продлить активный кормовой период почти на весь октябрь (при благоприятных погодных условиях) и дает возможность нажироваться молодняку. В тех редких на сегодняшний момент случаях, когда выпас на лугу, заселенном сурками, все еще продолжается, число жилых участков остается стабильным (это в равной степени относится также к участкам комбинированного типа). Однако по итогам наблюдений, к осени 2017 г., выпас в пределах кормовых участков сурков практически везде прекратился.

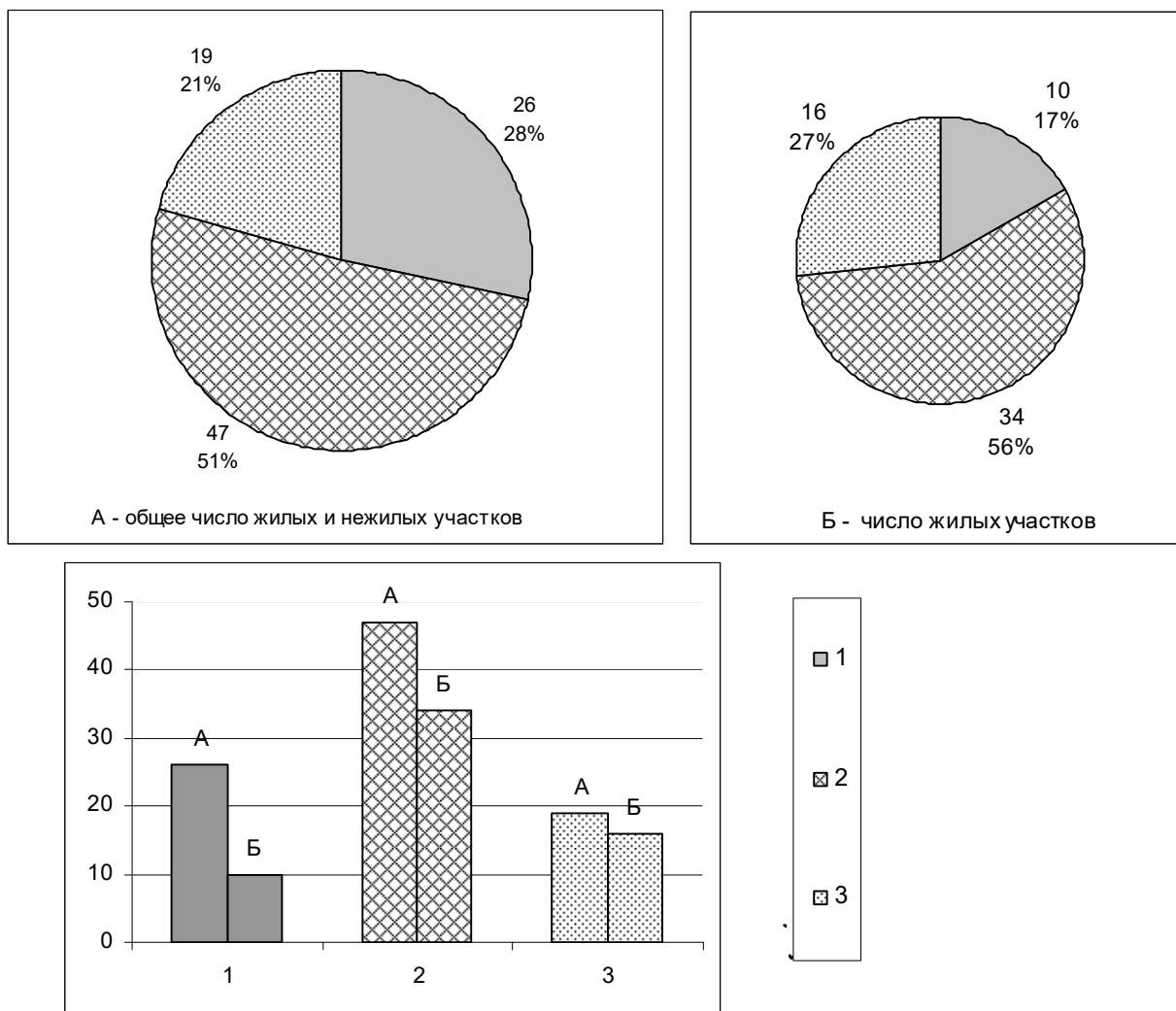


Рис. 2. Соотношение различных типов семейных участков степного сурка на территории НПП «Двуречанский» и его окрестностей по данным 2014–2016 гг. (вверху) и изменение этих соотношений внутри каждого из типов в результате перехода части участков в разряд нежилых (внизу)

1 – мелово-степной тип; 2 – комбинированный; 3 – луговой.

На настоящий момент состояние поселения в целом является неудовлетворительным. Число семей на большей части поселения продолжает снижаться. Если проанализировать прирусловую ленту поселения, то число семей в ней сократилось по сравнению с 2005–2006 гг. (Токарский и др., 2011) по приблизительным оценкам с 67 до 54. Значительная часть семейных участков находится в зоне, которую на данный момент следует оценивать как пессимальную с точки зрения кормовых потребностей сурков. Современная структура поселения в этой зоне характеризуется тем, что каждая семья занимает территорию, которую раньше использовали 2–3 семьи. В то же время, на одном отрезке поселения (прилегающего к пастбищам с. Каменка) пока сохраняются благоприятные условия для проживания сурков. К факторам риска на данной территории относятся потенциальная возможность браконьерства, а также бродячие собаки и лисы, которые могут изымать значительную часть молодняка. Необходимо также отметить, что несмотря на внесение степного сурка в Красную книгу Харьковской области (Червона книга..., 2013), он продолжает относиться к охотничье-промысловым животным Украины. Данное положение означает потенциальную возможность изъятия поголовья (и без того сокращающегося) в окрестностях парка. Поскольку падение численности степного сурка характерно для всего ареала и связано с катастрофическим изменением его среды обитания, по нашему мнению, необходимо разработать специальные меры по его сохранению, исключить из списка охотничье-промысловых видов и внести в Красную книгу Украины в статусе «уязвимый».

Оценивая перспективы рассматриваемого поселения, мы должны признать их неоптимистичными. Если не будет предпринято никаких мер, то через несколько лет могут сохраниться лишь фрагмент, расположенный на пастбище вблизи с. Каменка, и несколько семей в ближайших окрестностях с. Новомлынск. Это возможно лишь при условии сохранения основных положительных факторов, перечисленных выше. В сложившейся ситуации мы видим два пути стабилизации поселения. Наилучшим и наиболее эффективным способом является возобновление интенсивного выпаса домашних копытных на лугах, входящих в кормовые зоны сурков. Второй – компромиссный вариант – это введение режима многократного кошения луговых травостоев в пределах кормовых территорий отдельных семейных участков. Второй вариант, по нашему мнению, на современном этапе более реалистичен, чем возобновление выпаса скота. Такое биотехническое мероприятие, осуществляемое по мере отрастания растительности техникой, разработанной для кошения газонов, способно поддерживать состояние травостоя, максимально отвечающее кормовым потребностям всех возрастных групп сурков (Савченко и др., 2015). Это воздействие создает имитацию «подстригающего» эффекта, возникающего при постоянной пастьбе крупных копытных. Для семьи, состоящей из 5–8 особей (включая сеголетков), достаточно 0,3–0,5 га такого «газона» в зависимости от продуктивности конкретного фитоценоза. Заметим, что практика дотационного кошения давно применяется в европейских заповедниках, как мероприятие, призванное поддерживать биоразнообразие травяных экосистем (Bonaria et al., 2017). Периодическое сенокосение, как мера для сохранения видового разнообразия степных растительных сообществ, применяется на некоторых ООПТ, в частности в биосферном Центрально-Черноземном заповеднике (Курская обл., Россия).

Список литературы

- Бибиков Д.И. Горные сурки Средней Азии и Казахстана. – М.: Наука, 1967. – 199с. /Bibikov D.I. Gornyye surki Sredney Azii i Kazakhstana. – M.: Nauka, 1967. – 199s./
- Колесников В.В. Ресурсы и управление популяциями степного (*Marmota bobak*), серого (*M. baibacina*) и монгольского (*M. sibirica*) сурков. Автореф. дисс. ...докт. биол. наук / 06.02.09. – ВНИИОЗ. – Киров, 2011. – 43с. /Kolesnikov V.V. Resursy i upravleniye populyatsiyami stepnogo (*Marmota bobak*), serogo (*M. baibacina*) i mongol'skogo (*M. sibirica*) surkov. Avtoref. diss. ...dokt. biol. Nauk / 06.02.09. – VNIIOZ. – Kirov, 2011. – 43s./
- Кривицкий И.А., Токарский В.А. Распространение и численность байбака в Харьковской области. – Харьков, 1983. Депонир.: Державна республіканська науково-технічна бібліотека УРСР. 845Ук-Д83. /Krivitskiy I.A., Tokarskiy V.A. Rasprostraneniye i chislennost' baybaka v Khar'kovskoy oblasti. – Khar'kov, 1983. Deponir.: Derzhavna respublikans'ka naukovu-tekhnichna biblioteka URSR. 845Uk –D83./
- Ронкин В.И., Савченко Г.А. К характеристике балочной степи национального природного парка «Двуречанский» // Вісник Харківського національного університету ім. В.Н.Каразіна. – 2014. – Серія «Біологія». – Вип.19 (1097). – С. 75–80. /Ronkin V.I., Savchenko G.A. K kharakteristike balochnoy stepi natsional'nogo prirodnoho parka «Dvurechanskiy» // Visnyk Kharkivs'kogo natsional'nogo universytetu im. V.N.Karazina. – 2014. – Seriya «Biologiya». – Vyp.19 (1097). – S. 75–80./

Савченко Г.А., Ронкин В.И., Грубник В.В. Анализ альтернативных выпасу способов поддержания оптимального состояния растительного покрова для степного сурка // Сурки Евразии: экология и практическое значение: Мат-лы XI Межд. совещ. по суркам специалистов стран бывшего Советского Союза. – М., 2015. – С. 127–130. /Savchenko G.A., Ronkin V.I., Grubnik V.V. Analiz al'ternativnykh vypasu sposobov podderzhaniya optimal'nogo sostoyaniya rastitel'nogo pokrova dlya stepnogo surka // Surki Evrazii: ekologiya i prakticheskoye znachenije: Mat-ly XI Mezhd. soveshch. po surkam spetsialistov stran Sovetskogo Soyuz. – M., 2015. – S. 127–130./

Середнева Т.А. Определение абсолютной плотности населения и численности сурков (*Marmota*) // Зоол. журн. – 1986. – Т.65, вып.10. – С. 1559–1567. /Seredneva T.A. Opredeleniye absolyutnoy plotnosti naseleniya i chislennosti surkov (*Marmota*) // Zool. zhurn. – 1986. – T.65, vyp.10. – S. 1559–1567./

Токарский В.А. Байбак и другие виды рода Сурки. – Харьков: Изд-во Харьковского териологического об-ва, 1997. – 303с. /Tokarskiy V.A. Baybak i drugiye vidy roda Surki. – Khar'kov: Izd-vo Khar'kovskogo teriologicheskogo ob-va, 1997. – 303s./

Токарский В.А., Ронкин В.И., Савченко Г.А. Европейский степной сурок: история и современность. – Харьков, 2011. – 256с. /Tokarskiy V.A., Ronkin V.I., Savchenko G.A. Yevropeyskiy stepnoy surok: istoriya i sovremennost'. – Khar'kov, 2011. – 256s./

Червона книга Харківської області. Тваринний світ / За ред. Г.О.Шандикова, Т.А.Атемасової. Гол. ред. В.А.Токарський. – Харків: ХНУ ім. В.Н.Каразіна, 2013. – 486с. /Chervona knyga Kharkivs'koi oblasti. Tvarynnyy svit / Za red. G.O.Shandikova, T.A.Atemasovoi. Gol. red. V.A.Tokars'kyy. – Kharkiv: KhNU im. V.N.Karazina, 2013. – 486s./

Bonaria G., Fajmonc K., Malenovsky I. et al. Management of semi-natural grasslands benefiting both plant and insect diversity: The importance of heterogeneity and tradition // Agriculture, Ecosystems and Environment. – 2017. – Vol.246. – P. 243–252.

Ronkin V.I., Savchenko G.A. Effect of cattle grazing on habitats for the steppe marmot (*Marmota bobak*) in north-eastern Ukraine // Vestnik zoologii. – 2004. – Vol.38 (1). – P. 55–60.

Ronkin V., Savchenko G. Flora and vegetation of dry grasslands of Northeastern Ukraine, and problems of diversity conservation // Hacquetia. – 2016. – Vol.15 (2). – P. 49–62.

Ronkin V., Savchenko G., Tokarsky V. The place of the steppe marmot in steppe ecosystems of Ukraine: An historical approach // Ethology Ecology & Evolution. – 2009. – Vol.21. – P. 277–284.

Представлено: О.В.Брандлер / Presented by: O.V.Brandler

Рецензент: В.А.Токарський / Reviewer: V.A.Tokarsky

Подано до редакції / Received: 20.11.2017

••• КОРОТКІ ПОВІДОМЛЕННЯ ••• BRIEF COMMUNICATIONS •••

УДК: 574.64:504.064

Екотоксикологічна оцінка якості ґрунтів м. Маріуполь
I.A.Кривицька

Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна (Харків, Україна)
ivkrivicka@gmail.com

У роботі наведено результати визначення фітотоксичності проб ґрунту селітебних та рекреаційних зон м. Маріуполь на тест-об'єктах *Zea mays* L. та *Raphanus sativus* L. Дослідження проводили у типових ландшафтах м. Маріуполь, що знаходяться під сумісним впливом таких потужних джерел емісії важких металів, як ПрАТ «Маріупольський металургійний комбінат імені Ілліча», комбінат «Азовсталь», ОАО «Маркохім», а також локальних стаціонарних та пересувних забруднювачів місцевої інфраструктури. Токсичні властивості ґрунту (фітотоксичність) визначено в усіх селітебних зонах м. Маріуполь; в паркових зонах не виявлено токсичних властивостей ґрунту, окрім рекреаційної зони парку імені Лепорського, який розташований у Лівобережному районі, де зосереджені металургійні комбінати. Статистичну значущість впливу джерела ґрунтової витяжки та різниці між дослідом та контролем визначали за допомогою двохфакторного дисперсійного аналізу (ANOVA), де незалежними факторами виступали місце відбору проб ґрунту та тип серії (дослід або контроль), а залежною змінною – довжина кореня або проростка. Для підвищення вірогідності статистичної помилки I роду застосували метод Хольма. Усього розглядалося 40 порівнянь дослідів та контролю (12 місць було досліджено з впливу витяжок ґрунту на *Zea mays*, 8 – на *Raphanus sativus*; в усіх випадках оцінювали вплив на довжину коренів та проростків). Виявлено значущими, із врахуванням поправки за методом Хольма, 8 відмінностей між контролем та дослідом. Показана тенденція щодо залежності рівня токсичності ґрунту від його відстані від підприємств.

Ключові слова: біотестування, фітотоксичність, токсикант, забруднюючі речовини, рекреаційна зона, тест-об'єкт, ґрунт.

Ecotoxicological assessment of soil quality in Mariupol
I.A.Krivitskaya

The results of the determination of the phytotoxicity of soil samples of residential and recreational areas in Mariupol using the test objects *Zea mays* L. and *Raphanus sativus* L. are presented in the article. Researches were conducted in the typical landscapes of Mariupol, which are under the mutual influence of such powerful sources of heavy metal emissions as Mariupol Illich Metallurgical Plant, Metallurgical Combine Azovstal, Mariupol Coke and Chemical Plant, and also local stationary and mobile pollutants of local infrastructure. The toxic properties of the soil (phytotoxicity) were determined in all residential areas of Mariupol; in the park zones there were no toxic soil properties except the recreational zone of the Park Leporsky, which is located in the Left Bank district, where metallurgical plants are concentrated. The statistical significance of the influence of the source of soil extract and the difference between experiment and control were determined by using two-factor analysis of variance (ANOVA) where independent factors were the place of soil sampling and the type of the series (experiment or control), and the dependent variable was the length of the root or seedling. Holm's method was applied to increase the reliability of the statistical error of the first kind. In all, 40 comparisons of experiment and control were examined (12 sites were examined for the effects of soil extracts on *Zea mays*, 8 sites on *Raphanus sativus*, in all cases, the effect on the length of roots and shoots was evaluated). Eight significant differences between control and experiment were found, with considering of an amendment by Holm's method. The trend of dependence of the soil toxicity level on its distance from the enterprises was shown.

Key words: biotesting, phytotoxicity, toxicant, pollutants, recreational zone, test object, soil.

Экотоксикологическая оценка качества почв г. Мариуполь
И.А.Кривицкая

В работе приведены результаты определения фитотоксичности проб почвы селитебных и рекреационных зон г. Мариуполь на тест-объектах *Zea mays* L. и *Raphanus sativus* L. Исследования

проводились на типових ландшафтах г. Маріуполь, що знаходяться під спільним впливом таких потужних джерел емісії важких металів, як ЗАО «Маріупольський металургічний комбінат імені Ільича», комбінат «Азовсталь», ОАО «Маркохім», а також місцевих стаціонарних і переміжних забруднювачів місцевої інфраструктури. Токсичні властивості ґрунту (фітотоксичність) визначені у всіх сільськогосподарських зонах г. Маріуполь; в паркових зонах виявлено токсичні властивості ґрунту, крім рекреаційної зони парку імені Лепорського, який знаходиться в Левобережному районі, де концентруються металургічні комбінати. Статистичну значимість впливу джерела забруднення ґрунту та різниці між досвідом і контролем визначали за допомогою двохфакторного дисперсійного аналізу (ANOVA), де незалежними факторами виступали місце збору проб ґрунту та тип серії (досвід або контроль), а залежною змінною – довжина кореня або проростка. Для підвищення достовірності статистичної помилки I роду застали метод Хольма. Усього розглядалось 40 порівнянь досвіду та контролю (12 місць було досліджено за впливом витяжок ґрунту на *Zea mays*, 8 – на *Raphanus sativus*; у всіх випадках оцінювали вплив на довжину кореня та побігів). Встановлено значимі, з урахуванням поправки за методом Хольма, 8 різниць між контролем і досвідом. Показано тенденцію залежності рівня токсичності ґрунту від його відстані від підприємств.

Ключові слова: біотестування, фітотоксичність, токсикант, забруднюючі речовини, рекреаційна зона, тест-об'єкт, ґрунт.

Вступ

Найбільш інформативним і стабільним компонентом ландшафту вважаються ґрунти. Л.О.Карпачевський підкреслював, що серед структурних елементів біосфери центральною ланкою є ґрунти, і як дзеркало ландшафту вони відіграють визначальну роль і суттєво впливають на перерозподіл речовини і енергії в інших компонентах природного середовища (Карпачевський, 1983).

Більшість методів, що використовуються для нормування забруднення ґрунтів забруднюючими речовинами, зводяться до визначення гранично допустимої концентрації речовини у ґрунті. Однак у силу об'єктивних причин, таких як поліфункціональність і гетерогенність ґрунту, різноманітність забруднюючих речовин, явища синергізму та антагонізму між ними, здатність ґрунту до самоочищення, використання ГДК поллютантів для оцінки рівня забруднення не є інформативним показником.

Доцільність використання біологічних методів оцінки якості компонентів ландшафту, зокрема ґрунтів, підкреслюється у численних роботах вітчизняних і зарубіжних авторів (Теоретическіе..., 1983; Manual for..., 1991; Biologische..., 1992; Клименко та ін., 2004). В роботі М.О.Клименка при визначенні переліку показників для оцінки якості компонентів довкілля в умовах антропогенного навантаження рекомендується використовувати, поряд з іншими, біологічні методи: «...біоіндикація і біотестування, на відміну від відомих аналітичних методів контролю за станом середовища, являються незамінними у визначенні токсичності і шкідливості факторів для живих організмів, бо ці характеристики є біологічними, а тому визначають біологічну повноцінність (або неякісність) середовища» (Клименко та ін., 2004).

Метою роботи було провести екотоксикологічні дослідження ґрунтів одного з найбільш екологічно забруднених міст країни – Маріуполя з оцінкою рівня і ступеня їх токсичності методом біотестування.

Методика досліджень

Фітотоксичність ґрунтів визначали шляхом біотестування водних витяжок з ґрунтів. Для визначення фітотоксичності ґрунтів попередньо було проведено вибір рослин, широким колом яких рекомендується міжнародним стандартом ISO 11269-2 (ISO...).

Фітотоксичні властивості ґрунтів визначали у водних витяжках з використанням попередньо підготовленого ($t=27^{\circ}\text{C}$, 24-годинна експозиція) насіння тест-культур кукурудзи (*Zea mays* L.) та редьки посівної (*Raphanus sativus* L.). Критерієм токсичності є зниження на 20 і більше відсотків довжини проростків і коренів рослин у досліді порівняно з контролем (зволоження питною водою) за 96 год. біотестування.

Основними показниками згідно з (ISO...), за якими проводили оцінку фітотоксичності ґрунтів, були: кількість пророслих рослин, довжина коренів та паростків, також враховувалась енергія проростання (кількість пророслого насіння, виражена у відсотках до проби, що аналізувалась). Дані

тест-параметри рекомендуються як найбільш чутливі багатьма авторами, в тому числі і закордонними (Baran et al., 2009; Michaud et al., 2008). Фітотоксичними вважались ґрунти, за результатами біотестування яких значення будь-якого з перелічених критеріїв значуще відрізнялось від контролю.

На підставі підрахунку довжини коренів у контролі і досліді розраховувались середні арифметичні, котрі використовують для розрахунку відхилення довжин коренів у досліді щодо контролю:

$$A = (X_k - X_d) / X_k \times 100\%, \quad (1)$$

де A – довжина коренів (паростків) у досліді відносно контролю, %;

X_k – середнє арифметичне довжини коренів (паростків) у контролі, см;

X_d – середнє арифметичне довжини коренів (паростків) у досліді, см.

Статистичну значущість впливу джерела ґрунтової витяжки та різниці між дослідом та контролем визначали за допомогою двохфакторного дисперсійного аналізу (ANOVA), де незалежними факторами виступали місце відбору проб ґрунту та тип серії (дослід або контроль), а залежною змінною – довжина кореня або проростка.

Статистична значущість впливу досліджуваних факторів визначалася в цілому для усього досліджуваного комплексу проб. Для кожного місця відбору проб ґрунту статистична значущість різниці між дослідом та контролем (окремо для кореня і паростку, а також для кожного тест-об'єкта) визначалася за Стьюдентом. Множинні порівняння підвищують вірогідність статистичної помилки I роду (прийняття альтернативної гіпотези у той час, коли є вірною нульова). Щоб виправити це, ми застосували метод Хольма (Holm, 1979). Усього розглядалося 40 порівнянь досліді та контролю (12 місць було досліджено з впливу витяжок ґрунту на *Zea mays*, 8 – на *Raphanus sativus*; в усіх випадках оцінювали вплив на довжину коренів та паростків). З них виявилось значущими, із врахуванням поправки за методом Хольма, 8 відмінностей між контролем та дослідом.

Результати та обговорення

Дослідження проводили у типових ландшафтах міста Маріуполь, що знаходяться під сумісним впливом таких потужних джерел емісії важких металів, як комбінат ім. Ілліча, комбінат «Азовсталь», ОАО «Маркохім», а також локальних стаціонарних та пересувних забруднювачів місцевої інфраструктури (табл. 1, 2; рис. 1).

Таблиця 1.

Токсикологічна оцінка ґрунтів селітебної зони м. Маріуполь на *Zea mays* L.

Місце відбору проб ґрунту	Довжина, мм				Відхилення довжини відносно контролю, %	
	Корені, середнє арифметичне		Паростки, середнє арифметичне		Корені	Паростки
	Контроль	Дослід	Контроль	Дослід		
вул. 9-ї Авіадивізії	77,70	52,60	42,00	29,15	32,30	30,60
вул. Бахчиванджі	72,45	56,70	31,55	15,00	21,74	52,46
пр. Гурова	72,45	57,15	31,55	21,05	21,12	33,28
вул. Лавицького	72,45	55,35	31,55	16,10	23,60	48,97
вул. Нахімова	63,75	39,35	19,05	10,65	38,27	44,09
вул. Азовстальська	44,15	13,25	21,00	7,00	69,99	66,67
вул. Київська	44,15	6,05	21,00	1,60	86,30	92,38
вул. Олімпійська	44,15	31,75	21,00	12,50	28,09	40,48

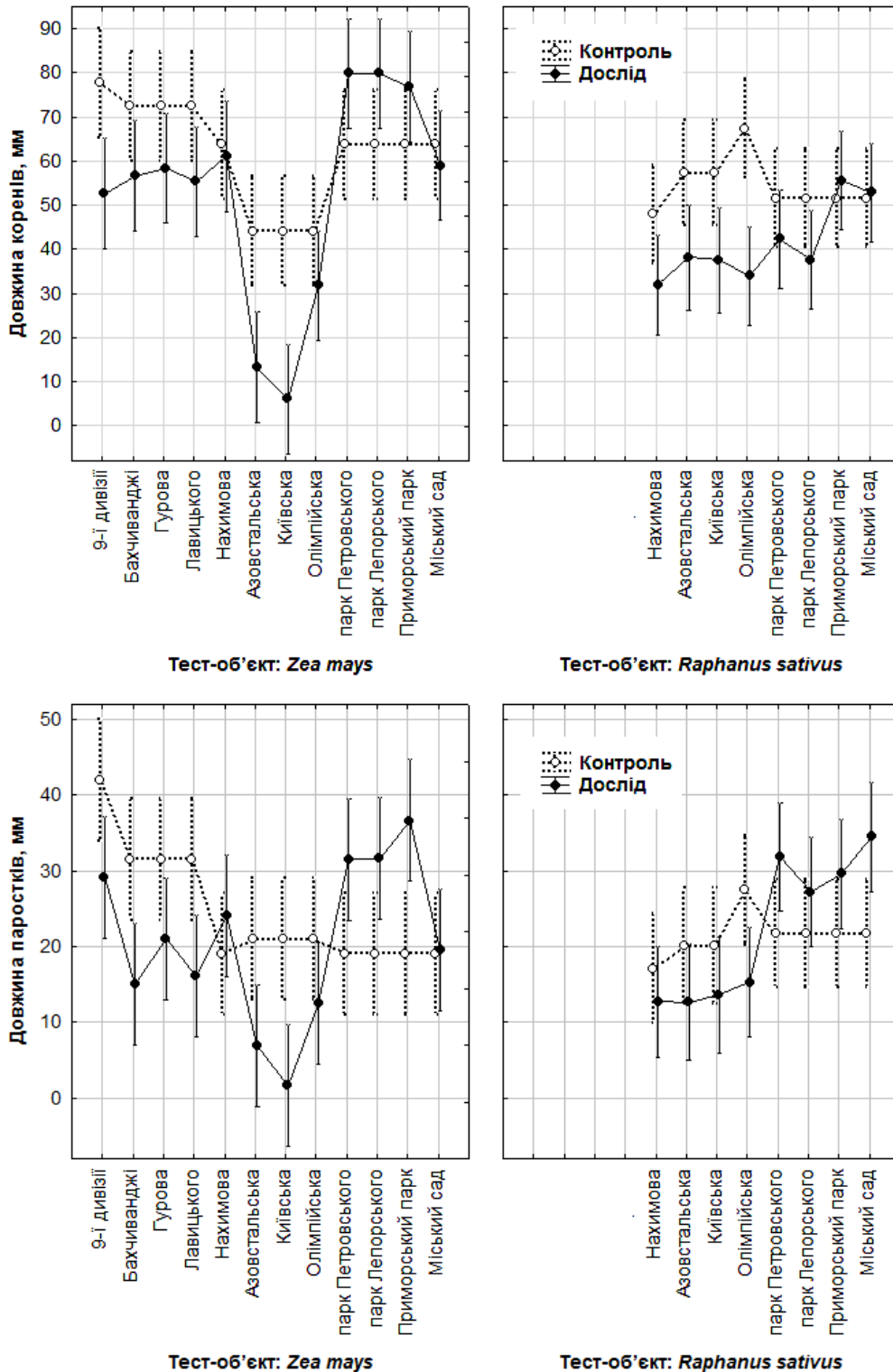


Рис. 1. Результати досліджень. Вгорі – вплив витяжки ґрунту на корені, внизу – на паростки; ліворуч тест-об'єктом була *Zea mays* L., праворуч – *Raphanus sativus* L.

В цілому місце відбору проб ґрунту та тип серії (дослід або контроль) значуще впливали на досліджувані ознаки ($p < 0,001$). Значущий вплив (із врахуванням поправки за методом Хольма) зареєстрований на *Zea mays* L. на пробах з вул. Київської (корені та паростки), Азовстальської і 9-ї Авіадивізії (корені), Бахчиванджі та Лавицького (паростки), а також на *Raphanus sativus* L. (паростки) на пробі з вул. Олімпійської.

Таблиця 2.
Токсикологічна оцінка ґрунтів селітебної зони м. Маріуполь на *Raphanus sativus* L.

Місце відбору проб ґрунту	Довжина, мм				Відхилення довжини відносно контролю, %	
	Корені, середнє арифметичне		Паростки, середнє арифметичне		Корені	Паростки
	Контроль	Дослід	Контроль	Дослід		
вул. Нахімова	39,90	25,53	14,27	10,17	36,01	28,74
вул. Азовстальська	57,27	38,09	20,05	12,64	33,49	36,96
вул. Київська	57,27	37,50	20,05	13,68	34,52	31,75
вул. Олімпійська	56,17	28,30	22,87	12,77	49,61	44,17

Для отримання комплексної оцінки тестування визначали індекс інтегральної фітотоксичності (табл. 3):

$$I\Phi = \lg \left[\frac{(D_n + D_k + E_n)_{\text{дослід}}}{(D_n + D_k + E_n)_{\text{контроль}}} \right], \quad (2)$$

де D_n – довжина паростків;
 D_k – довжина коренів;
 E_n – енергія проростання.

Таблиця 3.
Індекс інтегральної фітотоксичності при біотесуванні антропогенно перетворених ґрунтів селітебних зон м. Маріуполь

№	Місце відбору проб	Індекс фітотоксичності (IΦ)		IΦ _{ср}
		<i>Zea mays</i> L.	<i>Raphanus sativus</i> L.	
1.	вул. 9-ї Авіадивізії	0,11		0,11
2.	вул. Бахчиванджі	0,16		0,16
3.	пр. Гурова	0,12		0,12
4.	вул. Лавицького	0,17		0,17
5.	вул. Нахімова	0,0099	0,44	0,22
6.	вул. Азовстальська	0,46	0,23	0,34
7.	вул. Київська	0,82	0,28	0,55
8.	вул. Олімпійська	0,13	0,18	0,15

Таким чином, ми бачимо, що найвищий індекс фітотоксичності зареєстровано на вул. Київській, а найменший – на вул. 9-ї Авіадивізії.

Мешканці міста однозначно мають потребу у місцях, де можливо відпочити без шкоди для здоров'я. Рекреаційні зони набувають особливого значення в межах урбосистеми. Адже вони мінімізують загальне навантаження на систему та створюють оптимальні умови існування для біотичних організмів. Найбільш репрезентативною, для встановлення екологічного благополуччя, є ґрунтова система. Саме в ній накопичується інформація щодо надходження поллютантів, їх взаємодія та вплив на живі організми. У даному контексті розглядаються паркові зони міста Маріуполь, які розташовані у різних районах.

Міський сад – найстаріший парк м. Маріуполь, який було закладено понад 150 років тому. У цьому парку поєднані різноманітні багаторічні рослини – акація, клен та горіх, іноді зустрічаються голкові рослини. Площа Міського саду – 60100 м².

У парку імені Петровського поєднані багаторічні рослини – клен, туї, піхти, каштани. Площа цієї території складає 101200 м².

Парк імені Лепорського розміщено у районі, де зосереджені металургійні комбінати «Азовсталь» та «Ілліча». На території парку висаджені широколистяні рослини – горіх, клен та каштан. Площа парку складає 155700 м².

Приморський парк є найбільшим за площею – 721000 м². На території парку переважають верби, тополі, акації.

За допомогою біотестування на вищих рослинах (табл. 4, 5) визначено, що токсичні властивості виявив тільки ґрунт з парку імені Лепорського. Це пов'язано з тим, що ця рекреаційна зона розташована поблизу з потужними джерелами забруднення, також у цьому парку була проведена реконструкція і тим самим було порушено багато природних ділянок, які і забезпечують процеси розкладання забруднюючих речовин.

Таблиця 4.

Токсикологічна оцінка ґрунтів рекреаційних зон м. Маріуполь на *Zea mays* L.

Місце відбору проб ґрунту	Довжина, мм				Відхилення довжини відносно контролю, %	
	Корені, середнє арифметичне		Паростки, середнє арифметичне		Корені	Паростки
	Контроль	Дослід	Контроль	Дослід		
Приморський парк	63,75	76,85	19,05	36,65	-20,55	-92,39
Парк ім. Лепорського	63,75	79,90	19,05	31,60	-25,33	-65,88
Парк ім. Петровського	63,75	79,85	19,05	31,55	-25,25	-65,62
Міський парк	63,75	59,05	19,05	19,55	7,37	-2,62

Таблиця 5.

Токсикологічна оцінка ґрунтів рекреаційних зон м. Маріуполь на *Raphanus sativus* L.

Місце відбору проб ґрунту	Довжина, мм				Відхилення довжини відносно контролю, %	
	Корені, середнє арифметичне		Паростки, середнє арифметичне		Корені	Паростки
	Контроль	Дослід	Контроль	Дослід		
Приморський парк	51,48	55,52	21,72	29,64	-7,85	-36,46
Парк ім. Лепорського	51,48	37,64	21,72	27,24	26,88	-25,41
Парк ім. Петровського	51,48	42,32	21,72	31,88	17,79	-46,78
Міський парк	51,48	52,96	21,72	34,52	-2,87	-58,93

При розрахунках ми неодноразово отримували результати з від'ємним знаком. Це говорить про те, що тест-об'єкти у досліджуваних зразках витяжки ґрунту показали кращі значення тест-реакцій, ніж у контролі. Звертає на себе увагу, що витяжка ґрунтів з парків м. Маріуполь у більшості випадків стимулювала зростання коренів та пагонів; особливо цей ефект помітний на *Zea mays* L. Можна зробити висновок, що дані території є екологічно стабільними, тобто на них ще збереглися процеси самовідновлення.

Використавши два тест-об'єкти: кукурудза (*Zea mays* L.) та редька (*Raphanus sativus* L.) на однакових ділянках, можливо стверджувати, що редька виявилась більш чутливою до полютантів.

Висновки

Біотестування дає можливість швидкого отримання інтегральної оцінки токсичності, що робить дуже привабливим його застосування при скринінгових дослідженнях.

На всіх селітебних ділянках, що досліджувалися з використанням вищих рослин в якості тест-об'єктів, встановлено зниження довжини коренів та паростків, тобто усі проби ґрунту виявили токсичні властивості.

Ґрунт у паркових зонах не виявив токсичних властивостей, окрім парку ім. Лепорського, що розташований у Лівобережному районі, де зосереджені металургійні комбінати м. Маріуполь. Це свідчить про збереження процесів самовідновлення в більшості великих рекреаційних зон міста.

Незважаючи на те, що Маріуполь є промисловим містом, де зосереджені підприємства, які негативно впливають на стан навколишнього середовища та на стан здоров'я людей, парки, які були проаналізовані, виявилися стійкими до забруднень.

Список літератури

- Карпачевский Л.О. Зеркало ландшафта. – М.: Мысль, 1983. – 156с. /Karpachev's'kyu L.O. Zerkalo landshafta. – M.: Mysl', 1983. – 156s./
- Клименко М.О., Трушева С.С., Гроховська Ю.Р. Відновна гідроекологія порушених річкових та озерних систем (гідрохімія, гідробіологія, гідрологія, екологія, управління). – Рівне, 2004. – Т.III. – 211с. /Klimenko M.O., Trusheva S.S., Grokhov's'ka Yu.R. Vidnovna gidroekologiya porushenykh richkovykh ta ozernykh system (gidrokhimiya, gidrobiologiya, gidrologiya, ekologiya, upravlinnya). – Rivne, 2004. – T.III. – 211s./
- Теоретические вопросы биотестирования / Под ред. В.И.Лукьяненко. – Волгоград: Волгоградская правда, 1983. – 200с. /Teoreticheskiye voprosy biotestirovaniya / Pod red. V.I.Luk'yanenko. – Volgograd: Volgogradskaya pravda, 1983. – 200s./
- Baran A., Jasiewicz C., Antonkiewicz J. Testing toxicity of oily grounds using phytotoxkit tests // The First Joint PSE-SETAC Conference on Ecotoxicology. Book of Abstracts. – Poland, 2009, poster.
- Biologische Testverfahren / Eds. K.G.Steinhauser, P.D.Hansen. – Stuttgart: Gustav-Fisher Verlag, 1992. – 884p.
- Holm S. A simple sequentially rejective multiple test procedure // Scandinavian Journal of Statistics. – 1979. – Vol.6, no. 2. – P. 65–70.
- ISO 11269-1995 Soil quality – Determination of the effects of pollutants on soil flora – Part 1. Method for the measurement of inhibition of root growth.
- ISO 11269-1995 Soil quality – Determination of the effects of pollutants on soil flora – Part 2. Effects of chemicals on the emergence and growth of higher plants.
- Manual for the evaluation of laboratories performing aquatic toxicity tests // U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development. EPA/600/4-90/031. – Cincinnati, 1991. – 108p.
- Michaud A., Chappelaz C., Hinsinger P. Copper phytotoxicity affects root elongation and iron nutrition in durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) // Plant and soil. – 2008. – Vol.310, no. 1–2. – P. 151–165.

Представлено: А.А.Лісняк / Presented by: A.A.Lisnyak

Рецензент: Д.А.Шабанов / Reviewer: D.A.Shabanov

Подано до редакції / Received: 10.11.2017

УДК: 615.916:577.121.9

Показники загального обміну і оксидативного стресу у щурів при тривалій дії малих концентрацій Cd²⁺**У Сі¹, Ю.Кот¹, К.Кот¹, Р.Морс², О.Доран², Хамдаллах Амжад¹, Є.Перський¹**¹Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна (Харків, Україна)²Університет Західної Англії (Бристоль, Велика Британія)

kot.juriy@gmail.com

У даній роботі було вивчено вплив тривалої дії доз кадмію в концентраціях, близьких до MRL (рівень мінімального ризику) на показники загального обміну і оксидативного стресу у лабораторних щурів. В сироватці крові визначали вміст загального білку, альбуміну, креатиніну, сечовини, холестерину, тригліцеридів, Ca²⁺, тиреотропного гормону та вільного тироксину, 8-ізопростану, карбонільованих білків, а також активності аланінамінотрансферази, аспартатамінотрансферази, лужної фосфатази, супероксиддисмутази і каталази. Введення 3-місячним щурам *per os* іонів кадмію в дозах 0,1 і 1 мкг/кг маси протягом 36 діб призводить спочатку до зниження маси тіла, а після досягнення мінімуму – до його зростання. На 36 добу кінцева маса тіла піддослідних тварин нижча, ніж у контрольних. За дією обох доз Cd²⁺ у сироватці крові піддослідних тварин знижуються показники білкового та ліпідного обміну, підвищується вміст TSH, зменшується вміст вільного T₄ та індукується розвиток оксидативного стресу. Ступінь вираження цих ефектів вище при дії дози 1, ніж 0,1 мкг/кг маси тіла тварин.

Ключові слова: кадмій, сироватка, білки, ліпіди, трансферази, лужна фосфатаза, Ca²⁺, TSH, T₄, оксидативний стрес.

Total metabolism and oxidative stress parameters in rats at long-term exposure to low concentrations of Cd²⁺**Wu Si, Yu.Kot, K.Kot, R.Morse, O.Doran, Hamdallah Amjad, E.Persky**

The effect of long-term action of cadmium doses in concentrations close to MRL (minimum risk level) on total metabolism and oxidative stress parameters in laboratory rats was studied. The content of total protein, albumin, creatinine, urea, cholesterol, triglycerides, Ca²⁺, thyrotropic hormone and free thyroxine, 8-isoprostane, carbonyl proteins, and the activity of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase, superoxide dismutase and catalase were determined in the blood serum. The introduction of cadmium in doses of 0.1 and 1 µg/kg of weight to 3-month rats *per os* during 36 days leads initially to a decrease in body weight, and after reaching a minimum – to its growth. At the 36th day, the final body weight of experimental animals is lower than in the control animals. The blood serum analysis of experimental animals showed the decrease of protein and lipid metabolism parameters, increase of TSH level, decrease of free T₄ content and inducing of oxidative stress under the influence of both doses of Cd²⁺. The degree of these effects' expression is higher at a dose 1, than 0.1 µg/kg body weight of animals.

Key words: Cd²⁺, serum, proteins, lipids, transferases, alkaline phosphatase, Ca²⁺, TSH, T₄, oxidative stress.

Показатели общего обмена и оксидативного стресса у крыс при длительном воздействии малых концентраций Cd²⁺**У Си, Ю.Кот, Е.Кот, Р.Морс, О.Доран, Хамдаллах Амжад, Е.Перский**

В данной работе было изучено влияние длительного воздействия доз кадмия в концентрациях, близких к MRL (уровень минимального риска) на показатели общего обмена и оксидативного стресса у лабораторных крыс. В сыворотке крови определяли содержание общего белка, альбумина, креатинина, мочевины, холестерина, триглицеридов, Ca²⁺, тиреотропного гормона и свободного тироксина, 8-изопростана, карбонилированных белков, а также активности АлАТ, АсАТ, щелочной фосфатазы, супероксиддисмутази и каталазы. Введение 3-месячным крысам *per os* ионов кадмия в дозах 0,1 и 1 мкг/кг в течение 36 суток приводит сначала к снижению массы тела, а после достижения минимума – к его росту. На 36 сутки конечная масса тела подопытных животных ниже, чем у контрольных. При действии обеих доз Cd²⁺ в сыворотке крови подопытных животных снижаются

показатели белкового и липидного обмена, повышается содержание TSH, уменьшается содержание свободного T₄ и индуцируется развитие оксидативного стресса. Степень выраженности этих эффектов выше при действии дозы кадмия в концентрации 1 мкг/кг массы тела животных.

Ключевые слова: кадмий, сыворотка, белки, липиды, трансферазы, щелочная фосфатаза, Ca²⁺, TSH, T₄, оксидативный стресс.

Вступ

Відомо, що надходження в організм людини та лабораторних тварин кадмію в концентраціях, що значно перевищують MRL – minimal risk level – рівень мінімального ризику – відсутності видимого негативного ефекту, і накопичення цього металу згодом викликають оксидативний стрес. Останній же є однією з важливих причин розвитку різноманітних патологій у всіх без винятку системах органів (Nair et al., 2013; Cuypers et al., 2010; Tribowo et al., 2014). У той же час практично немає досліджень хронічної дії кадмію в концентраціях, близьких до MRL – незначно більших або менших за нього, на процеси метаболізму, що відображають інтегральну картину патологічного стану. У даній роботі й було вивчено вплив тривалої дії таких доз кадмію на показники загального обміну і оксидативного стресу у лабораторних щурів.

Об'єкти і методи дослідження

Дослідження проведені на 3-місячних білих щурах-самцях породи Вістар, які утримувалися в стандартних умовах віварію Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. В експериментах дотримувалися рекомендацій проведення медико-біологічних досліджень відповідно до закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (Закон України №3447-IV, 2006) зі змінами, внесеними згідно із Законом №1759-VI (Зміни, внесені до Закону №3447-IV..., 2010).

Величина MRL кадмію для людини і лабораторних тварин при надходженні в організм протягом часу до року становить 0,5 мкг Cd/кг/добу (Toxicological profile for Cadmium, 2012). Тому в експериментах використовували 2 дози Cd²⁺ – 0,1 мкг/кг/добу (доза I) і 1,0 мкг/кг/добу (доза II), які вводили розчинами CdCl₂ з концентраціями 0,3025×10⁻⁶ М/л і 3,025×10⁻⁶ М/л відповідно. Тварини були поділені на 3 групи по 12 особин у кожній. У групі 1 – контрольній – вони отримували чисту воду; у групах 2 і 3 – розчини CdCl₂ в дозі I і II відповідно. В кожній групі 6 тварин отримували воду або розчини CdCl₂ протягом 15 діб, останні 6 – протягом 36 діб. Розчини хлориду кадмію і воду об'ємом 1 мл вводили через внутрішньошлунковий зонд щодня після зважування тварин в один і той же час.

Загальні показники обміну визначали в сироватці крові, яку отримували стандартним методом після декапітації тварин під тіопенталовим наркозом (Greene, 2002). Вміст загального білка, альбуміну, креатиніну, сечовини, холестерину, тригліцеридів, Ca²⁺, активності аланінамінотрансферази (ALT), аспартатамінотрансферази (AST) і лужної фосфатази (ALP) вимірювали на біохімічному аналізаторі STAT FAX 1904+ відповідними наборами реактивів фірми DAC-SpectroMed (Наборы производства ..., 2015). Вміст тиреотропного гормону (TSH) та вільного тироксину (T₄) – на імуоферментному аналізаторі STAT FAX 303+ наборами реактивів фірми Хема-Медика (Комплекты реагентов ..., 2015).

В сироватці крові визначали також показники оксидативного стресу. Вимірювали вміст 8-ізопростану (8 isoprostane ..., 2013), карбонільованих білків флуориметричним методом набором Protein Carbonyl Content (Protein Carbonyl Content Assay Kit, 2011), спектрофотометрично – активності супероксиддисмутази (SOD) набором (Superoxide Dismutase Assay Kit, 2016) і каталази (CAT) H₂O₂/оксидоредуктазним методом набором (Catalase Assay Kit, 2017) відповідно. Всі ці вимірювання проводили на мікропланшетному флуориметрі BioTek FL-600.

Статистичну обробку результатів вимірювань проводили за програмою Origin Pro 8. Перевірку нормальності - за Шапіро-Уїлкі. Використовували парний Т-тест (Glantz, 2007).

Результати

Відповідно до найбільш поширеної періодизації постнатального онтогенезу щурів лінії Вістар, у молодих 3-місячних тварин, що знаходяться в репродуктивному періоді, середній щоденний приріст маси тіла становить, в середньому, 0,15–1,5 % (Авдеева и др., 2013). Приріст маси

контрольних тварин протягом експерименту відбувався безперервно і за цей час склав до 36 діб 11%, що вкладається у ці межі (табл. 1).

Таблиця 1.

Вплив Cd^{2+} (мкг/кг маси) на масу тіла щурів (г) та її приріст (%)

Доба	Доза					
	0		0,1		1	
	Маса	Приріст маси між добами	Маса	Приріст маси між добами	Маса	Приріст маси між добами
1	197±3		220±7		207±2	
15	208±4*	15→1: +6	202±5*	15→1: - 8	200±3*	15→1: - 3
36	218±5*,**	36→1: +11	240±5*,**	36→1: +9	218±8*,**	36→1: +5

Примітка: * – зміни вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з контролем;
** – зміни вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з 15-ю добою.

Введення Cd^{2+} різко змінює динаміку маси тварин. Спочатку, при дії обох доз, їх маса не збільшується, а зменшується, і тільки після досягнення мінімуму починає підвищуватися. В обох випадках приріст маси до 36 доби експерименту у цих тварин нижче, ніж у контрольних. При цьому нижче і приріст маси у тварин, які отримували 1 мкг Cd^{2+} /кг маси, що вказує на виражену дозову залежність ступеня впливу на ріст тварин.

Оскільки виявлений ефект є інтегральним наслідком порушення метаболічних процесів в різних системах органів, особливості цих порушень були охарактеризовані за біохімічними показниками крові (табл. 2–5).

Таблиця 2.

Вплив Cd^{2+} (мкг/кг маси) на вміст загального білка (г/л), альбуміну (г/л), креатиніну (мМ/л) і сечовини (мМ/л) у сироватці крові щурів

Доба	Доза	Показники				
		Загальний білок	Альбумін	Альбумін Заг. білок	Креатинін	Сечовина
15	0	64,8±3,64	36,7±4,47	0,57	90,2±1,94	9,02±0,25
	0,1	54,5±1,41*	28,7±0,42*	0,52	95,7±1,91*	9,30±0,20
	1	58,7±2,23*	30,3±1,38*	0,52	86,6±2,80*,**	8,80±0,20**
36	0	62,60±3,93	37,0±2,83	0,59	88,3±3,59	8,58±0,29
	0,1	55,7±2,43*	28,3±0,95*	0,51	90,7±3,59	9,30±0,50*
	1	65,4±3,64**	36,7±4,47	0,50	81,8±2,65*,**	8,60±0,30**

Примітка: у цій і в усіх подальших таблицях: * – зміни вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з контролем; ** – зміни вірогідні ($p < 0,05$) у порівнянні з дозою 0,1 мкг Cd^{2+} /кг маси.

Так, в середньому, за дією обох доз Cd^{2+} вміст загального білка у сироватці знижується протягом всього часу експерименту. Таким чином, і використовувані дози, і час їх дії призводять до пригнічення синтезу білка в організмі тварин, що корелює із затримкою їх росту (табл. 1). При цьому вміст у загальному білку найбільшої його фракції – альбуміну – також зменшується, що свідчить про зміну фракційного складу сироваткових білків. Серед різних органів, патології яких призводять до гіпопротеїнемії і зсуву цього складу, важливе місце займають порушення функцій печінки і нирок. Вміст креатиніну в крові під впливом дози 1 мкг Cd^{2+} /кг маси знижується і на 15-у, і на 36-ту добу, що може вказувати на зрушення білкового обміну в м'язовій тканині (Камышников, 2007; Макаров и др., 2013). На тлі цих змін вміст сечовини в сироватці залишається постійним протягом всього експерименту, що може вказувати на зрушення узгодженості між різними сторонами білкового обміну.

Зміни характеру білкового обміну, перш за все у печінці та нирках, підтверджуються і зниженням активності AST і ALT, найбільш вираженим за дії дози 1 мкг Cd²⁺/кг маси протягом 36 діб. При цьому коефіцієнт де Рітца (AST/ALT) не змінюється протягом усього часу дії обох доз, що свідчить про синхронну зміну активності цих ферментів (табл. 3). Активність ALP протягом експерименту теж різко, принаймні вдвічі, знижується при дозі 1 мкг Cd²⁺/кг маси (табл. 3). Оскільки ізоформа, присутня в сироватці, знаходиться головним чином, в печінці і кістках, це вказує на зниження процесів дефосфорилування в цих тканинах. У кістках, зокрема, це може призводити до їх демінералізації (Lum, 1995). У проведених експериментах не виявлено впливу Cd²⁺ на вміст Ca²⁺ у сироватці крові.

Таблиця 3.

Вплив Cd²⁺ (мкг/кг маси) на активності ALT (Од/л), AST (Од/л), ALP(Од/л) і вміст Ca²⁺ (мМ/л) у сироватці крові щурів

Доба	Доза	Показники				
		AST	ALT	AST/ALT	ALP	Ca ²⁺
15	0	257,5±12,2	68,65±2,46	3,75	665,2±32,1	2,17±0,24
	0,1	246,7±19,1	74,83±1,68*	3,30	725,6±19,5*	2,26±0,13
	1	267,7±22,8	73,77±1,58*	3,63	666,1±29,2**	2,14±0,21
36	0	195,8±15,6	59,66±1,70	3,28	630,5±42,8	2,17±0,25
	0,1	174,5±5,6*	54,67±1,52*	3,20	518,3±17,7*	1,84±0,41
	1	172,9±4,1*	50,32±4,14*	3,44	382,4±26,9**	1,93±0,24

Доза 1 мкг Cd²⁺/кг маси, яку тварини отримували протягом 36 діб, привела до збільшення вмісту загального холестерину і тригліцеридів у сироватці в 1,5 і 1,3 рази відповідно (табл. 4), що є ризиком атеросклерозу і захворювань коронарних артерій.

Таблиця 4.

Вплив Cd²⁺ (мкг/кг маси) на вміст загального холестерину (мМ/л) і тригліцеридів (мМ/л) у сироватці крові щурів

Доба	Доза	Показники	
		Загальний холестерин	Тригліцериди
15	0	1,13±0,04	0,85±0,06
	0,1	1,15±0,05	0,74±0,08
	1	1,15±0,04	0,87±0,14
36	0	1,08±0,03	0,84±0,09
	0,1	1,12±0,04	0,77±0,03
	1	1,66±0,03***	1,06±0,08***

Цікаво, що раніше у морських свинок було виявлено аналогічні зміни білкового та ліпідного обміну при дії значно більших доз Cd²⁺ – 2мг/кг маси протягом 30 діб (Hristev et al., 2008). Таким чином, накопичення в організмі щурів Cd²⁺ у кількості, у 2000 разів меншій, ніж 2мг/кг маси і у 5 разів меншій, ніж MRL, призводить до якісно подібних спотворень у них показників загального обміну.

Нирки відіграють значну роль в метаболізмі багатьох гормонів, зокрема, тиреоїдних (Katz et al., 1975; Vasu, Mohapatra, 2012). Тому, в зв'язку з виявленими особливостями порушень білкового обміну в нирках, було вивчено вміст цих гормонів в сироватці крові в умовах дії Cd²⁺ (табл. 5). Обидві дози призводять до підвищення вмісту TSH у сироватці і на 15-у, і на 36-у добу та до зниження T₄ на 15-у, причому тенденція до його подальшого зниження зберігається до 36-ї доби. Таким чином, навіть при зсуві абсолютних значень концентрації TSH і вільного T₄ між вмістом цих гормонів у крові зберігається стандартна обернено пропорційна залежність.

Cd²⁺ індукує розвиток оксидативного стресу. І доза I, і доза II підвищують у сироватці до 15-ї доби вміст 8-ізопростану у 1,9 і 2,4, а до 36-ї – у 2 і 3,7 разів відповідно. Аналогічно, хоча і з меншим приростом збільшується в ці терміни рівень карбонілювання білків сироватки. Протидією

цьому є не занадто велике зростання активності CAT і лише тенденція до підвищення активності SOD (табл. 6).

Таблиця 5.

Вплив Cd²⁺ (мкг/кг маси) на вміст TSH (мОд/мл) і вільного T₄ (пг/л) у сироватці крові щурів

Доба	Доза	Показники	
		TSH	T ₄
15	0	0,49±0,04	20,22±1,30
	0,1	0,47±0,04	16,60±0,30*
	1	0,89±0,27*	14,50±2,10*
36	0	0,43±0,06	18,44±1,11
	0,1	0,86±0,06*	17,20±0,70*
	1	0,70±0,17*	16,10±1,90*

Таблиця 6.

Вплив Cd²⁺ (мкг/кг маси) на вміст 8-ізопростану (пг/мл), карбонільованих білків (нМ/мл), активності SOD (од/мл/мін) і CAT (мкМ H₂O₂/мл/мін) у сироватці крові щурів

Доба	Доза	Показники			
		8-ізопростан	Карбонільовані білки	SOD	CAT
15	0	3,72±0,48	13,81±0,66	1,01±0,24	2,71±0,35
	0,1	7,01±0,19*	14,37±0,68	0,87±0,01*	4,36±0,66*
	1	8,98±0,48***	15,67±0,71*	1,17±0,24**	2,81±0,08***
36	0	3,91±0,65	12,07±0,48	0,87±0,05	3,80±0,75
	0,1	7,98±0,33*	17,10±1,05**	0,96±0,01*	5,11±0,38*
	36	14,49±0,64***	19,06±0,90***	1,04±0,02***	3,21±0,09***

Висновки

1. Введення 3-місячним щурам *per os* Cd²⁺ в дозах 0,1 і 1 мкг/кг маси протягом 36 днів призводить спочатку до зниження маси тіла, а після досягнення мінімуму – до його зростання. У 36 днів кінцева маса тіла піддослідних тварин нижче, ніж у контрольних.

2. За дією обох доз Cd²⁺ у сироватці крові піддослідних тварин знижуються показники білкового та ліпідного обміну, підвищується вміст TSH, зменшується – вільного T₄ та індукується розвиток оксидативного стресу.

3. Ступінь вираження цих ефектів вище за дії дози 1, ніж 0,1 мкг/кг маси тіла тварин.

Список літератури

Авдеева О.И., Ходько С.В., Рыбакова А.В., Ковалева М.А. Биометрические показатели. Динамика веса экспериментальных животных в онтогенезе // В кн.: Доклинические исследования. Справочник. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных. – СПб: Изд-во «ЛЕМА», 2013. – С. 12–16. /Avdeyeva O.I., Khod'ko S.V., Rybakova A.V., Kovaleva M.A. Biometricheskiye pokazateli. Dinamika vesa eksperimentalnykh zhiivotnykh v ontogeneze // V kn.: Doklinicheskiye issledovaniya. Spravochnik. Fiziologicheskkiye, biokhimicheskkiye i biometricheskkiye pokazateli normy eksperimentalnykh zhiivotnykh. – SPb: Izd-vo "Lema", 2013. – S.12–16./

Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження» №3447-IV від 21.02.2006. – ВВР. – 2006. – №27. – Ст.230. /Zakon Ukrainy «Pro zakhyst tvaryn vid zhorstokogo povodzhennya». – No. 3447-IV vid 21.02.2006. – VVR. – 2006. – No. 27. – St.230./

Зміни, внесені до Закону №3447-IV згідно із Законом №1759-VI від 15.12.2009. – ВВР. – 2010. – №9. – Ст.76. /Zminy, vneseni do zakonu No. 3447-IV zgidno iz Zakonom No. 1759-VI vid 15.12.2009. – VVR. – 2010. – St.76./

Камышников В.С. Клинические лабораторные тесты от А до Я и их диагностические профили: Справочное пособие. – М.: «МЕДпресс-информ», 2007. – 320с. /Kamyshnikov V.S. Klinicheskkiye laboratornyye testy ot A do Ya i ikh diagnosticheskkiye profili: Spravochnoye posobiye. – M.: MEDpress-inform, 2007. – 320s./

Комплекты реагентов Хема-Medica. 2015. (<http://xemamedica.com/html/reagents/xema/>)

Макаров В.Г., Абрашова Т.В., Соколова А.П., Ковалева М.А. Биохимические показатели. Методы оценки биохимических показателей крови. // В кн. Доклинические исследования. Физиологические,

- биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных. – СПб: Изд-во «ЛЕМА», 2013. – С. 44–45, 51–59, 62, 64, 68. /Makarov V.G., Abrashova T.V., Sokolova A.P., Kovaleva M.A. Biochimicheskiye pokazateli. Metody otsenki biokhimicheskikh pokazateley krovi // V kn.: Doklinicheskiye issledovaniya. Spravochnik. Fiziologicheskkiye, biokhimicheskiye i biometricheskkiye pokazateli normy eksperimentalnykh zhivotnykh. – SPb: Izd-vo "Lema", 2013. – S. 44–45, 51–59, 62, 64, 68./
- Наборы производства DAC-SPECTROMED, 2015. (http://www.micromed.ua/product-category/produkcija_dlya_laboratoriy/serologicheskie_lateks_testi__agglutinacionnie_testi_proizvodstva_dac_spectromed_moldova/)
- Basu G., Mohapatra A. Interactions between thyroid disorders and kidney disease // Indian J. Endocrinol. Metab. – 2012. – Vol.16 (2). – P. 204–213.
- Catalase Assay Kit. 2017. (<https://www.caymanchem.com/pdfs/707002.pdf>)
- Cuypers A., Plusquin M., Remans T. et al. Cadmium stress: an oxidative challenge // Biometals. – 2010. – Vol.23 (5). – P. 927–940.
- Hristev H., Penkov D., Hallak A.K. et al. Serum protein changes in rabbits after chronic administration of lead and cadmium // J. Cent. Eur. Agric. – 2008. – Vol.9 (1). – P. 141–145.
- 8 isoprostane ELISA Kit. Instructions for Use. A competitive immunoenzymatic assay for the quantitative measurement of 8 isoprostane in urine, serum, plasma, cells and tissues. Abcam, 2013. ([http://www.abcam.com/ps/products/175/ab175819/documents/ab175819%20-%208%20isoprostane%20ELISA%20Kit%20-%20protocol%20\(website\).pdf](http://www.abcam.com/ps/products/175/ab175819/documents/ab175819%20-%208%20isoprostane%20ELISA%20Kit%20-%20protocol%20(website).pdf))
- Glantz S.A. Primer of biostatistics. 4th edition. – McGraw-Hill, 2007. – 298p.
- Greene S.A. Veterinary anesthesia and pain management secrets. – Henlay & Belfuc Inc., 2002. – P.266.
- Katz A.I., Emmanouel D.S., Lindheimer M.D. Thyroid hormone and the kidney // Nephron. – 1975. – Vol.15. – P. 223–249.
- Lum G. Significance of low serum alkaline phosphatase activity in a predominantly adult male population // Clin. Chem. – 1995. – Vol.41 (4). – P. 515–518.
- Nair A.R., DeGheselle O., Smeets K. et al. Cadmium-induced pathologies: where is the oxidative balance lost (or not)? // Int. J. Mol. Sci. – 2013. – Vol.14 (3). – P. 6116–6143.
- Protein Carbonyl Content Assay Kit. 2011. (<http://www.interchim.fr/ft/G/GV7160.pdf>)
- Superoxide Dismutase Assay Kit. 2016. (<https://www.caymanchem.com/pdfs/706002.pdf>)
- Toxicological Profile for Cadmium. U.S. Department of Health and Human Services, 2012. (<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp5.pdf>)
- Tribowo J.A., Arizal M.H., Nashrullah M. et al. Oxidative stress of cadmium-induced ovarian rat toxicity // International Journal of Chemical Engineering and Applications. – 2014. – Vol.5, no. 3. – P. 254–258.

Представлено: О.П.Білозоров / Presented by: A.P.Belozorov
Рецензент: Н.І.Буланкіна / Reviewer: N.I.Bulankina
Подано до редакції / Received: 05.11.2017

**ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРІВ
журналу «Вісник Харківського національного
університету імені В.Н.Каразіна. Серія «Біологія»**

У серії Вісника публікуються результати досліджень за всіма напрямками біологічних наук.

До публікації приймаються:

- закінчені оригінальні роботи, що досі ніде не видавалися (статті об'ємом 5–10 сторінок друкованого тексту, включаючи перелік посилань);
- описання оригінальних методів та приладів;
- теоретичні та проблемно-оглядові статті об'ємом до 20 сторінок друкованого тексту, включаючи перелік посилань;
- матеріали та повідомлення про події наукового життя;
- рецензії на книги.

Статті друкуються українською, російською та англійською мовами.

Текст експериментальної статті повинен складатися з наступних розділів: **«Вступ», «Методика» («Об'єкти та методи дослідження»), «Результати», «Обговорення»** (можливий об'єднаний розділ **«Результати та обговорення»**), **«Перелік посилань»**.

Текст статті починається з індексу УДК, далі заголовки звичайним шрифтом (**Arial – 12 pt**), ініціали та прізвища авторів (**Arial – 10 pt**), повні назви наукових установ, адреси електронної пошти (**Arial – 9 pt**) – **наявність контактної електронної адреси обов'язкова**.

Анотація розміщується під «шапкою» статті мовою оригіналу (**Arial – 9 pt**). Її обсяг – орієнтовано до 10 рядків. Під анотацією курсивом друкується список ключових слів (не більше 10). Анотація повинна бути побудована як реферат у реферативних журналах та відображати суть експериментів, основні результати та їх інтерпретацію. Анотація не повинна містити баластні слова, ввідні фрази та неінформативні вислови. Далі друкуються анотації (**Arial – 9 pt**) англійською і російською (якщо стаття написана українською) мовами разом із транскрипціями прізвищ авторів, перекладом назви роботи і відповідними списками ключових слів (**всього в статті мають бути резюме трьома мовами – українською, англійською, російською**).

Розділ **«Вступ»** повинен містити постановку проблеми у загальному вигляді та її зв'язок з важливими науковими або практичними завданнями; короткий аналіз останніх досліджень і публікацій, у яких розпочато рішення даної проблеми, виділення конкретних невирішених питань, яким присвячена стаття, формулювання мети роботи. Інакше кажучи, вступ повинен відповідати на питання: що відомо у даній області; що залишається невідомим; яка задача даної роботи. Бажано, щоб у експериментальних роботах формулюванню мети передувала робоча гіпотеза.

Розділ **«Методика»** повинен містити відомості про об'єкт (об'єкти) дослідження (з обов'язковим вказуванням повних латинських назв видів та авторів класифікації), умови експериментів, аналітичні методи, прилади та реактиви. У цьому ж розділі даються відомості про повтори експериментів, методи статистичного аналізу результатів.

У розділі **«Результати»** необхідно лише описати виявлені ефекти, не коментуючи їх, усі коментарі та пояснення виносяться в обговорення. Викладення результатів не повинно зводитись до переказу вмісту таблиць та графіків, воно повинно відображувати закономірності, які витікають з отриманих даних. Результати рекомендується представляти у минулому часі.

Задачею розділу **«Обговорення»** є узагальнення та інтерпретація результатів, аналіз причинно-наслідкових зв'язків між виявленими ефектами. Отриману інформацію необхідно порівняти з наявними літературними даними та показати її новизну. Обговорення повинно завершуватись відповіддю на питання, яке поставлено у вступі.

Таблиці друкуються у тексті, кожна повинна мати свій заголовок.

Рисунки виконуються у чорному кольорі, розміщуються у тексті. Кожний рисунок повинен мати свій заголовок. На кривих (крім безперервних реєстрацій) повинні бути нанесені експериментальні точки.

Посилання на літературу у тексті подаються у круглих дужках з вказуванням прізвища автора та року видання. Список посилань складається за абеткою, спочатку кирилицею, потім латиницею. Список не нумерується.

Електронні версії статей надсилаються до редакції електронною поштою.

Тексти статей повинні бути виконані у редакторі Ms Word з використанням шрифту **Arial – 10 pt**; абзац – **1 см**; міжрядковий інтервал – **одинарний**; поля: **верхнє та нижнє – 3,5**; **ліве та праве – 2 см**. Разом з електронною версією до редакції надсилається тверда копія у двох примірниках, один з яких має бути підписаний авторами.

До статті прикладається рецензія фахівця у даній області досліджень (**зовнішня рецензія**).

На окремій сторінці вказують повністю **імена, по батькові та прізвища усіх авторів, телефони, факси, адреси електронної пошти та повні поштові адреси**.

Стаття, яка надходить до редакції, реєструється та направляється до наукового рецензента, який підписує статтю до друку. При наявності зауважень статтю повертають авторам для доопрацювання. Виправлений варіант (у двох примірниках) автор повинен повернути до редакції разом з початковим варіантом статті та відповіддю на всі зауваження.

Черговість виходу статей визначається датою надходження останнього варіанту.

Редакція залишає за собою право **виправляти та скорочувати рукопис, а також повертати авторам роботи, які не відповідають вимогам редакції**.

Вартість публікації статті розраховується наступним чином: 200 грн за роботу редакції (сума є фіксованою, не залежить від обсягу статті) + 40 грн за публікацію однієї сторінки (помножується на кількість сторінок) + вартість пересилання авторського екземпляра. Оплата приймається після отримання автором інформації про прийняття статті до друку.

Оплата приймається у вигляді поштового переказу на ім'я відповідального секретаря.