

ЕКОЛОГІЯ

УДК 579.66+663.15

Л. М. БУЦЕНКО, Л. А. ПАСІЧНИК, В. П. ПАТИКА

Інститут мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ 03143

СКРИНІНГ ПРОДУЦЕНТІВ ТИРОЗИНАЗИ ТА ТИРОЗИНФЕНОЛЛІАЗИ СЕРЕД ШТАМІВ *PANTOEA AGGLOMERANS*

Визначено активні продуценти тирозинази: *P. agglomerans* 9630a, Б80 і 7245. Встановлено, що всі штами *P. agglomerans*, які синтезують тирозиназу, є вірулентними. Авірулентні штами *P. agglomerans* тирозиназну активність не проявляють. Виявлено продуценти тирозинфенолліази (ТФЛ): *P. agglomerans* 9630a, 7245, 123a, 9668. ТФЛ-активність проявляється лише при додаванні до поживного середовища вітаміну В₆. Використання ТФЛ-активних штамів *P. agglomerans* 123a та 9668, що не мають тирозиназної активності, дозволяє вирішити питання усунення дифенольної активності і додавання стабілізуючих агентів до синтетичної реакційної суміші при отриманні *L*-Дофа.

Ключові слова: *Pantoea agglomerans*, тирозиназа, тирозинфенолліаза, *L*-Дофа, хвороба Паркінсона, протипаркінсонічний препарат

Хвороба Паркінсона (ХП) та синдром паркінсонізму є чи не найчастішою формою рухової патології людини. За оцінками, у 2005 році більш ніж 4 млн. людей у всьому світі страждали на ХП. До 2030 року очікується майже подвоєння кількості хворих (між 8,7 та 9,3 млн.). Така динаміка хвороби передбачає навантаження не тільки на хворих, але й на оточуючих їх близьких людей [1].

Зараз терапія ХП передбачає компенсацію недостатчі дофаміну в мозку. Це досягається за рахунок Леводопи (*L*-Дофа) – попередника дофаміну [2].

Для отримання протипаркінсонічних препаратів в промислових масштабах широко використовують хімічний каталіз, який з одного боку є швидким способом, а з іншого, у зв'язку з необхідністю розділення рацематів, – високовартісним [4, 14].

Бажання вдосконалити виробництво *L*-Дофа та знизити витрати на сам процес каталізу змушує шукати нові ефективніші шляхи його виробництва. Окислення *L*-тироzinу ферментами з утворенням *L*-Дофа можна розглядати, як одну з можливостей вдосконалення його синтезу [8].

Отримання *L*-Дофа можливе з використанням таких ферментів, як тирозиназа (КФ. 1.14.18.1; синоніми: фенолаза, поліфенолаза, катехолазата) та тирозинфенолліаза (КФ.4.1.99.2; синонім: β - тирозиназа). Застосування *Pantoea agglomerans* як продуцентів цих ферментів дозволяє по-новому поглянути на процес отримання *L*-Дофа та зробити синтез більш простішим.

Метою даної роботи був пошук продуцентів тирозинфенолліази (ТФЛ) та тирозинази серед штамів *P. agglomerans*.

Матеріал і методи досліджень

В роботі використані 45 штамів *Pantoea agglomerans* з колекції живих культур відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології та вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України.

Використані в роботі штами виділені з 11 областей України (рис. 1).

51% штамів *P. agglomerans* виділені з пшениці різних сортів, 36% – з жита, 23% - з волошки світлолюбивої (рис. 2). Серед них були як абсолютно здорові, так і рослини, що мали ознаки ураження бактеріозом. 64% використаних в роботі штамів є вірулентними (рис. 3).

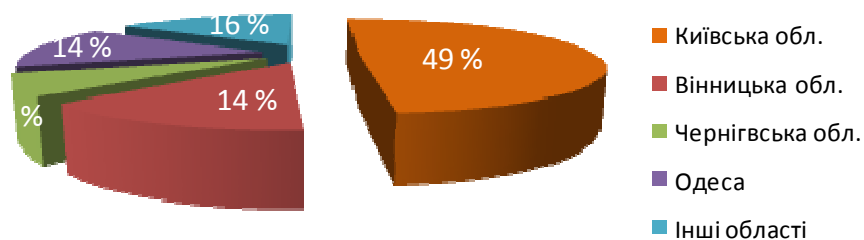


Рис. 1. Регіони виділення штамів *P. agglomerans*

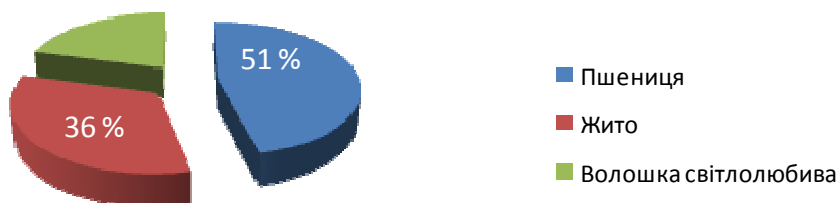


Рис. 2. Джерело виділення штамів *P. agglomerans*

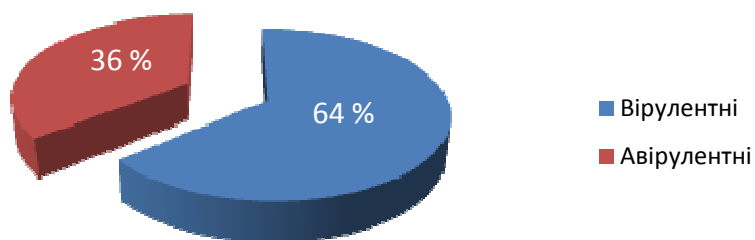


Рис. 3. Вірулентні властивості досліджуваних штамів *P. agglomerans*

Агресивність використаних в роботі штамів 1 – 2 бали . Отже, дані штами характеризуються слабкою агресивністю.

Культивування *P. agglomerans* для скринінгу тирозинази здійснювали при 27°C на середовищі з L-тирозином наступного складу (г/л): гліцерин – 5мл, гідролізат казеїну – 10,0,

K_2HPO_4 – 0,5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,25, *L*-тирозин – 1,0, агар-агар. –15,0. рН середовища 7,2 – 7,4 [9].

Візуальний прояв тирозиназної активності відбувався на 6, 8 та 14 день після посіву.

Культивування *P. agglomerans* для визначення ТФЛ активності здійснювали на середовищі наступного складу (%): гліцерин – 1,0 KH_2PO_4 – 0,05, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,05, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,001, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,001, Фумарова кислота – 0,2, *L*-тирозин – 0,2, соєвий гідролізат – 1,5 [12]. А також на модифікованому середовищі з додаванням вітаміну B_6 (0,01 %).

В першому випадку культивування бактерій здійснювали в колбах об'ємом 500 мл з 60 мл середовища на качалці (220 об/хв) при 30°C протягом 28 год. В другому випадку – протягом 48 год [12].

Наявність ТФЛ активності визначали за утворенням *L*-тироzinу після взаємодії бактеріальних клітин з реакційним середовищем. Для цього культуральну рідину, одержану після вирощування *P. agglomerans* на рідкому середовищі, центрифугували (5000 g, 30 хв, 4°C). Отриманий осад клітин відмивали від залишків середовища 0,05 М K^+ -фосфатним буфером (рН 7,0), центрифугуючи (5000 g, 30 хв, 4°C). Осад клітин кожного штаму вносили в пробірки з 10 мл середовища наступного складу (мг/мл) [12]: Фенол – 10, *L*-Серин – 20, Хлорид амонію – 5, Сульфат натрію – 2, ЕДТА – 1, Інтактні клітини – 7-10 (рН 8,0). Тривалість реакції 16 год при температурі 31°C [12].

Реакційну суміш після проведення реакції центрифугували (5000 g, 30 хв, 4°C). Осад клітин відділяли, а супернатант використовували для хроматографічного аналізу.

Якісне визначення *L*-тироzinу здійснювали паперовою хроматографією у системі розчинників бутанол – оцтова кислота – вода (4:1:2). Для контролю використовували розчини 0,5% *L*-тироzinу та 0,5% *L*-серину. Пластини проявляли у розчині нінгідрину. Визначали електрофоретичну рухливість. R_f кожного досліджуваного зразка співставляли з R_f контрольних розчинів амінокислот. Як контроль на пластинку наносили розчин *L*-тироzinу, реакційну суміш без клітин *P. agglomerans* та розчин *L*-серину.

Результати досліджень та їх обговорення

Тирозиназа (КФ. 1.14.18.1) – фермент, що належить до класу оксидоредуктаз та каталізує реакції синтезу меланінів, з утворенням *L*-Дофа та Дофа-хінону, як проміжних продуктів.

Тирозиназа трапляється у представників всіх царств живої природи. Тирозинази у різних видів різняться за структурою, молекулярною масою і властивостями. Тим не менше, для всіх тирозиназ характерним є однакова будова активного центру. Він являє собою два катіона міді, кожен з яких орієнтований з допомогою трьох гістидиновмісних залишків [16]. Активний центр тирозинази здатний захоплювати одну молекулу кисню, яка потім використовується для окислення субстрату.

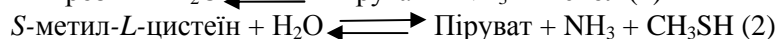
Тирозиназа характеризується високою субстратною специфічністю, фермент не взаємодіє з *D*-тирозином та *L*-триптофаном. Але недоліком його використання в мікробіологічному процесі отримання *L*-Дофа є дифенольна активність, тобто здатність вступати в реакцію з утворенням *L*-Дофа, що збільшує вихід побічних продуктів – меланінів [15].

У зв'язку з дифенольною активністю використання тирозинази є досить обмежене і потребує додаткових заходів стабілізації процесу. Як альтернатива у біотрансформації *L*-тироzinу на *L*-Дофа може бути використаний інший мікробний фермент – тирозинфенолліаза [5].

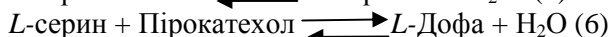
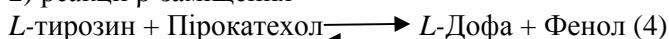
Тирозинфенолліаза (ТФЛ) (КФ.4.1.99.2) – фермент, що належить до тетрометричних піридоксаль-5-фосфат-залежних ферментів, з молекулярною масою 170 000, що каталізують реакції в процесі метаболічного перетворення амінокислот [6].

ТФЛ каталізує кілька типів хімічних реакцій [10]:

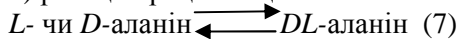
1) реакції α -, β -елімінації



2) реакції β -заміщення



3) реакцію рацемізації



Реакцію β -елімінації *L*-тирозины (1) використовують для виробництва фенолу, амонію та пірувату [11].

Відновлювальна реакція β -заміщення за участі ТФЛ використовується для одноетапного синтезу деяких гетероциклічних похідних *L*-тирозины. До них належать протипухлинні препарати, синтезовані з 3-гідроксипіридину, та *L*-Дофа (3,4-дигідроксифеніл-*L*-аланін), утворений з пірокатехолу (6) [7, 11].

Фітопатогенні бактерії при патологічному процесі можуть спричинювати появу плям бурого кольору, які пов'язані з утворенням пігментів меланінового ряду. Це пояснюється наявністю у фітопатогенних бактерій дифенольної ферментної системи, зокрема тирозиназної активності [3]. З урахуванням цього, перший етап наших досліджень полягав у виявленні продуцентів тирозинази серед 45 умовно-патогенних штамів *P. agglomerans*.

Для виявлення тирозиназної активності штамів *P. agglomerans* використовували тирозиновий агар. Мікроорганізми окисляють присутній в поживному середовищі *L*-тирозин і воно набуває коричневого забарвлення різної інтенсивності. Саме зміна забарвлення дозволяє якісно оцінити тирозиназну активність того чи іншого штаму *P. agglomerans*.

На 6-й день після посіву штамів *P. agglomerans* 9630a та *P. agglomerans* 7245 зафіксовано почорніння тирозинового агару (рис. 4). Це свідчить про здатність цих мікроорганізмів розщеплювати тирозин та виділяти тирозиназу в поживне середовище. Колонії *P. agglomerans* не змінили забарвлення (рис. 4). Серед інших штамів тирозиназної активності не спостерігали.

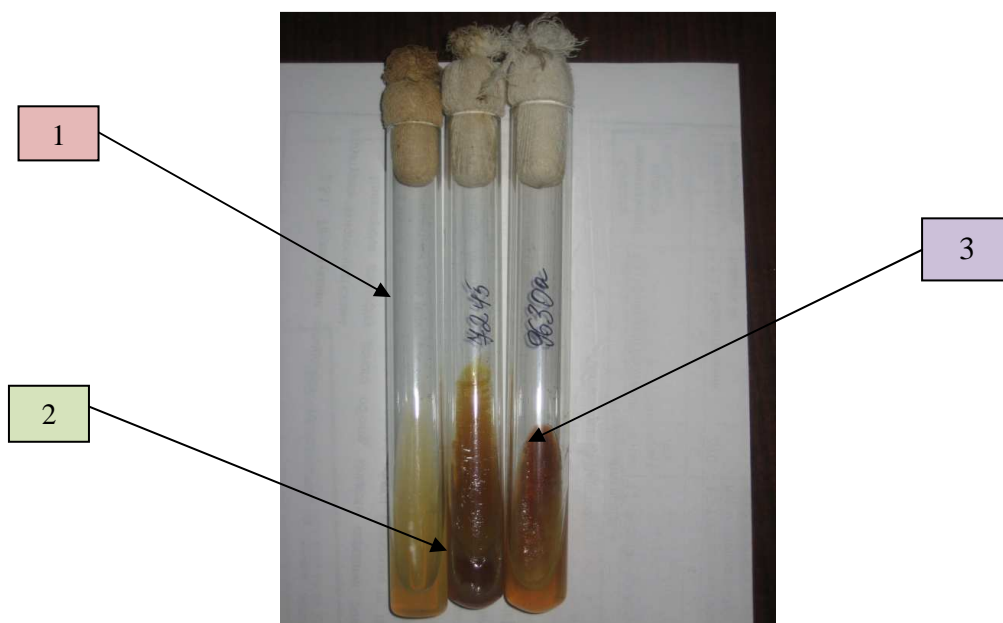


Рис. 4. Прояв тирозиназної активності штамами *P. agglomerans* 9630a та *P. agglomerans* 7245

1- контроль (тирозиновий агар), 2- *P. agglomerans* 7245, 3- *P. agglomerans* 9630a

Чітке почорніння тирозинового агару на 14 день культивування зафіксовано ще у одного штаму – *P. agglomerans* Б80 (рис. 5). Серед інших штамів такої активності не виявлено.

Можна відмітити, що слабкою тирозиназною активністю володіли всі взяті для дослідження штами *P. agglomerans*, оскільки тирозиновий агар вже на 6 день огляду в усіх пробірках був дещо темнішим за контроль.

Отже встановлено, що найбільшою тирозиназною активністю характеризуються штами:
P. agglomerans 9630a (Київська обл., пшениця, уражений колос);
P. agglomerans Б80 (м. Одеса, *Centaurea solstitialis*, уражені стебла з бурими плямами);
P. agglomerans 7245 (Полтавська обл., жито, уражене насіння).

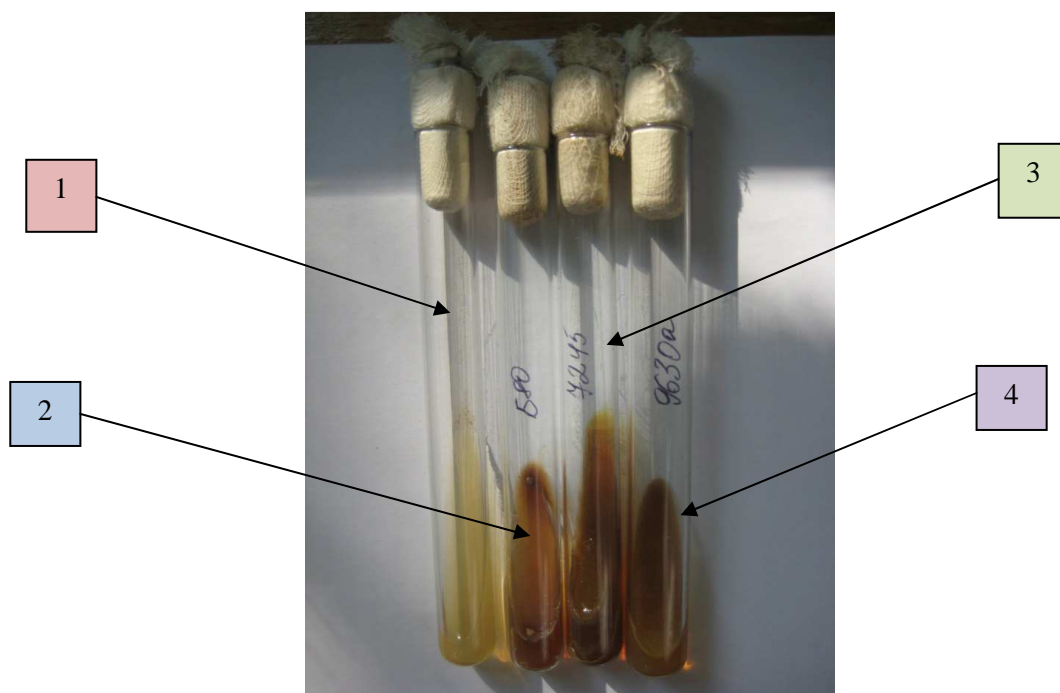


Рис. 5. Прояв тирозиназної активності на 14 день досліджень

1- контроль (тирозиновий агар), 2- *P. agglomerans* Б80, 3- *P. agglomerans* 7245, 4- *P. agglomerans* 9630a

Порівняльна характеристика тирозиназної активності штамів представлена в таблиці 1.

Таблиця 1

Порівняльна характеристика тирозиназної активності *P. agglomerans*

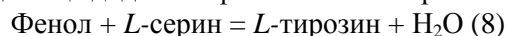
Характеристики	Продуценти тирозинази		
	<i>P. agglomerans</i> 9630a	<i>P. agglomerans</i> Б80	<i>P. agglomerans</i> 7245
Тирозиназна активність	+	++	+++
Вірулентність	+2	+2	+2

Отже, отримані результати підтверджують гіпотезу про те, що найбільшу тирозиназну активність мають вірулентні штами.

Не зважаючи на перспективність мікробіологічного отримання ТФЛ та *L*-Дофа, у літературі є небагато інформації про визначення ТФЛ-активності бактерій та умови їх культивування.

За даними літератури, бактерії роду *Pantoea* поряд з тирозиназною проявляють також ТФЛ-активність, що необхідно враховувати при розробці технології одержання *L*-Дофа [13].

Першим кроком дослідження ТФЛ-активності був пошук оптимального середовища для культивування *P. agglomerans*. Нами був використаний спрощений варіант визначення ТФЛ-активності – не за реакцією з утворення *L*-Дофа (9), а за утворенням в результаті реакції *L*-тирозином (8), що дозволить значно заощадити на реактивах. Для цього в синтетичне реакційне середовище додавали фенол замість пірокатехолу.





Реакційну суміш після 16-годинної реакції наносили на хроматографічну пластинку.

Було встановлено що, при вирощуванні клітин *P. agglomerans* на середовищі 1 (без вітаміну B₆) протягом 28 годин ТФЛ-активність відсутня або ж дуже низька і паперова хроматографія є не чутливою до тієї кількості *L*-тирозину, що утворилася.

Проаналізувавши структуру та біохімічні особливості ферменту в методику його одержання були внесені наступні зміни:

- до середовища додатково вносили вітамін B₆, який є кофактором ТФЛ
- час культивування збільшено з 28 до 48 год, що пов'язано з тим, що за даними літератури [17], максимум в утворенні ТФЛ припадає на стаціонарну фазу росту клітин продуценту.

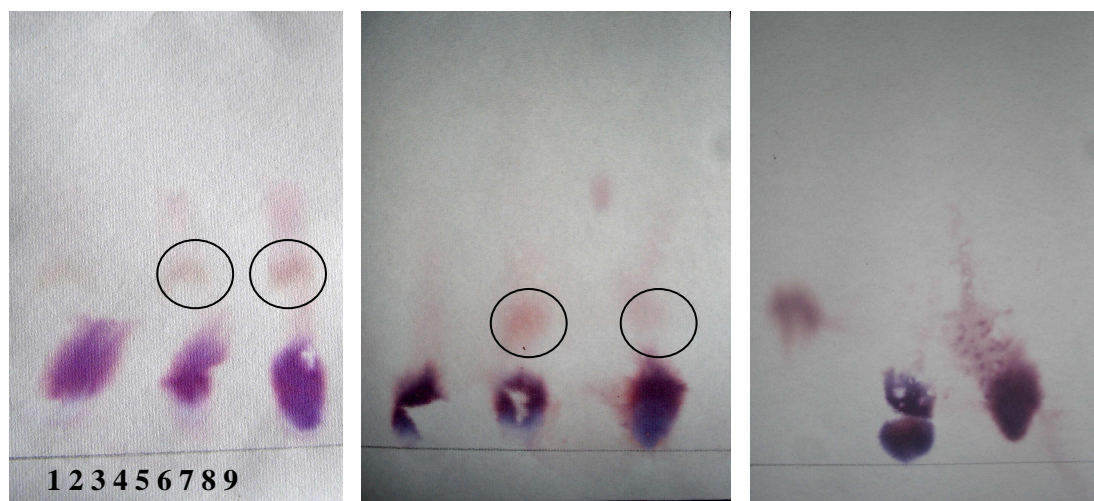


Рис. 6. Хроматографія реакційної суміші з клітинами *P. agglomerans*.

1 – *P. agglomerans* 7434; 2 – *P. agglomerans* 9630a; 3 – *P. agglomerans* 9668; 4 – *P. agglomerans* Б 80; 5 – *P. agglomerans* 123a; 6 – *P. agglomerans* 7245; 7 – *L*-тирозин; 8 – реакційна суміш без внесення клітин *P. agglomerans*; 9 – *L*-серин.

В результаті проведених модифікацій методики культивування, здатність каталізувати утворення тирозину було виявлено у 4 штамів *P. agglomerans* (рис. 6).

Для кожного з 4 штамів *P. agglomerans* та контрольних розчинів *L*-серину, *L*-тирозину, та синтетичного середовища було визначено R_f (табл. 2). З таблиці, як і з хроматограми видно, що ці 4 штами в результаті взаємодії з синтетичним середовищем утворюють *L*-тирозин.

Таблиця 2

Порівняння R_f контрольних амінокислот та речовин, що утворилися в реакційній суміші за додавання клітин *P. agglomerans*

Речовина	R _f
речовина, що утворилась в реакційній суміші за додавання клітин <i>P. agglomerans</i> 9630a	0,39
речовина, що утворилась в реакційній суміші за додавання клітин <i>P. agglomerans</i> 7245	0,40
речовина, що утворилась в реакційній суміші за додавання клітин <i>P. agglomerans</i> 123a	0,39
речовина, що утворилась в реакційній суміші за додавання клітин <i>P. agglomerans</i> 9668	0,39
<i>L</i> -тирозин	0,39
<i>L</i> -серин	0,19
реакційна суміш без внесення клітин <i>P. agglomerans</i>	0,20

Отже, додавання до поживного середовища вітаміну В₆ має стимулювальну дію в процесі утворення ТФЛ.

Штами *P. agglomerans* 9630a та *P. agglomerans* 7245 характеризуються також високою тирозиназною активністю, на противагу їм штами *P. agglomerans* 123a та *P. agglomerans* 9668 такої активності не мають (табл. 3).

Таблиця 3

Утворення тирозинази та ТФЛ штамами *P. agglomerans*

Штам	Утворення тирозинази	Утворення тирозинфенолліази
<i>P. agglomerans</i> 9630a	+	+
<i>P. agglomerans</i> 123a	-	+
<i>P. agglomerans</i> 7245	+	+
<i>P. agglomerans</i> Б80	+	-
<i>P. agglomerans</i> 9668	-	+

Для синтезу *L*-Дофа в промисловості більш доцільним буде використання штамів *P. agglomerans* 123a та *P. agglomerans* 9668, які за реакцією утворення *L*-Дофа з *L*-тирозину (4) будуть давати можливість отримати чистий продукт без подальших перетворень *L*-Дофа.

Можливим варіантом використання штамів *P. agglomerans* 7245 та *P. agglomerans* 9630a в технології отримання *L*-Дофа є застосування синтетичного середовища з пірокатехолом та *L*-серином (6) в якості субстрату, на який не діє тирозиназа.

Висновки

Серед досліджених 45 штамів *P. agglomerans* експериментально визначено активних продуцентів тирозинази. До них належать штами *P. agglomerans* 9630a, Б80 і 7245. Ці штами є вірулентними для рослин. Авірулентні штами *P. agglomerans* тирозиназну активність не проявляють.

Виявлено 4 продуценти тирозинфенолліази: *P. agglomerans* 9630a, 7245, 123a, 9668. Встановлено, що ТФЛ-активність проявляється тільки при додаванні до поживного середовища вітаміну В₆.

Використання ТФЛ-активних штамів *P. agglomerans* 123a та 9668, що не мають тирозиназної активності, дозволяє вирішити питання усунення дифенольної активності і додавання стабілізуючих агентів до синтетичної реакційної суміші.

1. Волошин П. В. Аналіз поширеності та захворюваності на нервові хвороби в Україні / П. В. Волошин, Т. С. Міщенко, Є. Ф. Лекомцева // *Международный неврологический журнал*. — 2006. — № 3. — С. 44—49.
2. Иллориошкина С. Н. Болезнь Паркинсона и расстройства движений. Руководство для врачей. / С. Н. Иллориошкина, Н. Н. Яхно. — М.: Мир, 2008. — 405 с.
3. Пасичник Л. А. Возбудители бактериозов семян ржи в условиях УССР / Л. А. Пасичник, И. Б. Королева // *Микробиол. журн.* — 1986. — Т. 48. — № 6. — С. 8—12.
4. Шпак В. С. Пути получения и использования синтетических аминокислот / В. С. Шпак, И. Я. Тюрчев // *Вестник АН СССР*. — 1986. — № 2. — С. 107—114.
5. Anghileri A. Tyrosinase-catalyzed grafting of sericin peptides onto chitosan and production of protein-polysaccharide bioconjugates / A. Anghileri, K. Lantto, C. Kruus // *J. Biotechnol.* — 2007. — 127. — P. 508—519.
6. Dalibor M. F. Structures of apo and holo tyrosine phenol-lyase reveal a catalytically critical closed conformation and suggest a mechanism for activation by K⁺ ions / M. F. Dalibor, T. M. Demidkina // *Biochemistry*. — 2006. — № 45 (24). — P. 7544—7552.
7. Effective production of 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine (*L*-DOPA) with *Erwinia herbicola* cells carrying a mutant transcriptional regulator TyrR / Т. Koyanagi, Т. Katayama, Н. Suzuki, Н. Nakazawa // *J. Biotechnol.* — 2005. — 115. — P 303—306.

8. *Production of 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine by using the β -tyrosinase of Citrobacter freundii overexpressed in recombinant Escherichia coli* / S. G. Lee, H. S. Ro, S. P. Hong, K. J. Lee // Microbiol. Biotechnol. — 1996. — 24. — P. 44—49.
9. *Singh H. Mechanism of oxidation of L-tyrosine by fungal tyrosinases* / H. Singh // J. Chem. — 1999. — 172. — P. 83—87.
10. *Thompson J. D. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice* / J. D. Thompson, D. G. Higgins // Eur. Food Res. Technol. — 1999. — 22. — P. 4673—4680.
11. *Hidehico K. Studies on tyrosine phenol lyase* / K. Hidehico, V. Takashi // Biological chemistry. — 1985. — № 5. — P. 166—1667.
12. *Kumagai H. Formation of tyrosine phenol-lyase by bacteria* / H. Kumagai, H. Matsui, H. Yamada // Agric. Biol. Chem. — 1970. — 34. — P. 1259—1261.
13. *Patil S. S. Potatophenolases. Purification and properties* / S. S. Patil, M. Zucker // J. Biol. Chem. — 1985. — 240. — P. 3938—3943.
14. *Pialis P. Production of L-DOPA from tyrosinase immobilized on nylon 6,6: Enzyme stability and scaleup* / P. Pialis, B. Saville // Enzyme Microb. Technol. — 1998. — № 22. — P. 261—268.
15. *Robb D. A. Tyrosinase* / D. A. Robb // Copper Proteins and Copper Enzymes — 1984. — Vol. 2— P. 207—240.
16. *Rodrigo O. F. The biotechnological potential of mushroom tyrosinases* / O. F. Rodrigo, R. M. Vivian, M. A. Lopes de Almeida // Biotechnol. — 2007. — № 45 (3). — P. 287—294.
17. *Pat. 4716246 USA. Process for L-dopa* / Reinhold, Donald F. — Publ. 17.03.86.

Л. Н. Буценко, Л. А. Пасичник, В. Ф. Патыка

Институт микробиологии и вирусологии имени Д. К. Заболотного НАН Украины

СКРИНИНГ ПРОДУЦЕНТОВ ТИРОЗИНАЗЫ И ТИРОЗИНФЕНОЛЛИАЗЫ СРЕДИ ШТАММОВ PANTOEA AGGLOMERANS

Отобраны активные продуценты тирозиназы: *Pantoea agglomerans* 9630a, B80 и 7245. Установлено, что все штаммы *P. agglomerans*, которые синтезируют тирозиназу, являются вирулентными. Авирулентные штаммы *P. agglomerans* тирозиназную активность не проявляют. Выявлены продуценты тирозинфеноллиазы (ТФЛ): *P. agglomerans* 9630a, 7245, 123a, 9668. ТФЛ-активность проявляется только при добавлении в питательную среду витамина B₆. Использование ТФЛ-активных штаммов *P. agglomerans* 123a и 9668, что не имеют тирозиназной активности, позволяет решить вопрос устранения дифенольной активности и добавление стабилизирующих агентов к синтетической реакционной смеси при получении L-Дофа.

Ключевые слова: Pantoea agglomerans, тирозиназа, тирозинфеноллиаза, L-Дофа, болезнь Паркинсона, противопаркинсонический препарат

L. N. Butsenko, L. A. Pasichnyk, V. F. Patyka

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine

SCREENING OF PRODUCERS TYROSINASE AND TYROSINEFENOLLIASE AMONG STRAINS PANTOEA AGGLOMERANS

Biosynthesis of L-DOPA, the primary drug for treatment of Parkinson's disease can be realized by using one of two enzymes: tyrosinase (EC 1.14.18.1.) or tirozinfenolliaze (EC 4.1.99.2). The task of this work was to search for the producers of these enzymes among bacteria the species *Pantoea agglomerans*. Screening of producers was carried out among 45 virulent and avirulent strains of *Pantoea agglomerans*, which have been identified in various regions of Ukraine from wheat and rye. They were selected active producers of tyrosinase: *Pantoea agglomerans* 9630a, B80 and 7245. It is established that all strains of *P. agglomerans* that synthesize tyrosinase, are virulent. Avirulent strains of *P. agglomerans* tyrosinase activity do not show. Since the enzyme tyrosinase is also diphenol activity, biosynthesis of L-DOPA with tyrosinase producers require additional stabilization process. They were identified active producers of tirozinfenolliaze (TFL): *P. agglomerans* 9630a, 7245, 123A, 9668. Among them, two strains *P. agglomerans* 123a and *P. agglomerans* 9668 have only tirozinfenolliaze activity and have no tyrosinase activity. It is shown that the TFL-activity occurs only

when added to the culture medium of vitamin B6. The use of TFL-active strains of *P. agglomerans* 123a and *P. agglomerans* 9668 that do not have tyrosinase activity, allows to solve the problem of eliminating diphenolic activity and addition of stabilizing agents to the synthetic reaction mixture in obtaining L-DOPA.

Key words: Pantoea agglomerans, tyrosinase, tirozinfenolliaze, L-DOPA, Parkinson's disease, antiparkinsonian drug

Рекомендує до друку
В. В. Грубінко

Надійшла 23.05.2016

УДК 581.1+535.346

А. І. ГЕРЦ, Н. В. ГЕРЦ

Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка
вул. Кривоноса, 2, Тернопіль, 46027

ВИЯВЛЕННЯ ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ НЕОДНОРІДНОСТІ ФОТОСИНТЕТИЧНОГО АПАРАТУ РОСЛИН МЕТОДОМ ФОТОРЕЄСТРАЦІЇ СПЕКТРУ ВІДБИТТЯ СВІТЛА

В роботі описано метод фото- та відеореєстрації відбиття світлового випромінювання поверхнею листка, який в комплексі з методом реєстрації індукції флуоресценції хлорофілу, може використовуватись для виявлення рослин, що перебувають в умовах стресу.

Ключові слова: вегетаційний індекс, NDVI, відбиття світла, спектри відбиття листків, флуоресценція хлорофілу, індукція флуоресценції хлорофілу

Вступ. Контроль стану рослин є важливим при вирішенні сільськогосподарських та екологічних завдань. Особливий інтерес становить використання спектрів відбиття в червоній та ближній інфрачервоній (БЧ) ділянках, як джерела інформації про стан фіто- та агроценозів [1].

Сьогодні продовжується розробка методів оцінки різноманітних показників стану рослин за їх спектрами відбиття. Розроблені індекси для тестування вмісту не лише пігментів, а й загального азоту, визначення біомаси, листового індексу, вмісту води тощо [1-3, 5].

Перевагою використання методів вимірювання відбиття світла для оцінки фізіологічних параметрів є те, що при цьому не руйнуються посіви, вимірювання здійснюється автоматично, швидко та легко, а сам метод має високий ступінь об'єктивності та є репрезентативним [5].

Водночас, залишається відкритим питання можливості використання вегетаційного індексу нормалізованої різниці в лабораторних умовах з метою забезпечення експрес-оцінки стану фізіологічних показників рослин закритого ґрунту та питання щодо можливості застосування для реєстрації спектрів відбиття побутових засобів фото- та відеореєстрації.

Матеріал і методи досліджень

Для оцінки функціональної неоднорідності фотосинтетичного апарату листків використовували метод реєстрації спектрів відбиття світлових променів від листків та метод індукції флуоресценції хлорофілу (ІФХ).

Реєстрація спектрів відбиття рослин закритого ґрунту здійснювалась за допомогою модифікованої камери Mobius Action Cam з червоним фільтром типу Rosco #19 "Fire" (рис. 1) [10].