

ISSN 1814-3237

Categoria C

UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA

STUDIA UNIVERSITATIS

Revistă științifică

SERIA

Științe reale
și ale
naturii

- **Biologie**
- **Chimie**

Fondată în anul 2007

Chișinău
CEP USM

Nr.1(51)
2012

Articolele ce formează prezentul număr al Revistei au fost recomandate de subdiviziunile didactico-științifice primare ale USM și de consiliile științifice ale instituțiilor în cadrul cărora activează autorii, recenzate de specialiști în domeniu și aprobate spre publicare de către Senatul USM (proces-verbal nr. nr.10 din 26 iunie 2012).

Adresa redacției:
str. A.Mateevici, 60
MD 2009, Chișinău, Republica Moldova
Tel. (37322) 577414; 577442; FAX (37322) 577440
e-mail: lgorceac@yahoo.com
www.usm.md

© Universitatea de Stat din Moldova,
2012

Redactor-șef

Mihail REVENCO, profesor universitar, doctor habilitat

Colegiul de redacție

Teodor FURDUI, profesor universitar, academician

Ion TODERAȘ, profesor universitar, academician

Aurelia CRIVOI, profesor universitar, doctor habilitat

Victor ȘALARU, profesor universitar, doctor habilitat

Mihail LEȘANU, conferențiar universitar, doctor

Mihail COȘCODAN, profesor universitar, doctor

Vasile CIOBANU, profesor universitar, doctor

Aurelian GULEA, profesor universitar, membru corespondent al AȘM

Vasile GUȚANU, profesor universitar, doctor habilitat

Valentin BOBEICA, conferențiar universitar, doctor habilitat

Galina DRAGALINA, conferențiar universitar, doctor

Maria GONȚA, conferențiar universitar, doctor habilitat

Alexandru CECAL, profesor universitar, doctor (Universitatea „Al.I. Cuza” din Iași, România)

Coordonatori

Leonid GORCEAC, conferențiar universitar, doctor

Raisa CREȚU

Lilia CEBAN

Redactori literari

Ariadna STRUNGARU (limba română)

Valentina MLADINA (limba rusă)

Dumitru MELENCIUC, conferențiar universitar, doctor (limba engleză)

Anatol LENȚA, conferențiar universitar, doctor (limba franceză)

Asistență computerizată

Ludmila REȘETNIC

Alina LÎȘÎ

Viorel MORARU

ÎNDRUMAR PENTRU AUTORI

Articolele prezentate vor reflecta realizările științifice obținute în ultimii ani în cadrul catedrelor, centrelor și laboratoarelor de cercetări științifice ale USM, a instituțiilor științifice din afara USM și în colaborare cu acestea.

Articolele trebuie să fie însoțite de rezumate: în limba franceză sau engleză – pentru articolele scrise în limba română; în limbile română și engleză sau franceză – pentru articolele scrise în limba rusă; în limba română – pentru articolele scrise în alte limbi.

O persoană poate fi autor sau coautor la un singur articol în cadrul fiecărui număr al revistei.

Articolul (până la 15 pagini) trebuie scris clar, succint, fără corectări și să conțină data prezentării. Materialul cules la calculator în editorul *Word* se prezintă pe dischetă împreună cu un exemplar imprimat (cu contrast bun), semnat de toți autorii. Pentru relații suplimentare se indică telefoanele de la serviciu și domiciliu ale unuia din autori.

Articolele se vor prezenta cu cel puțin 30 de zile înainte de luna în care va fi scos de sub tipar volumul, în blocul 2 (Anexă) al USM, biroul 21: Raisa Crețu, șef. secție, DCI (tel.57.74.42), sau Lilia Ceban, specialist coord., DCI (tel.57.74.40).

Structura articolului:

TITLUL (se culege cu majuscule).

Prenumele și NUMELE autorilor (complet);

Afilierea (catedra sau LCȘ – pentru colaboratorii universității, instituția – pentru autorii sau coautorii din afara USM).

Rezumatele (până la 200 de cuvinte).

Textul articolului (la 1,5 interval, corp – 12, încadrat în limitele 160×260 mm²).

Referințe

Figurile, fotografiile și tabelele se plasează nemijlocit după referința respectivă în text sau, dacă autorii nu dispun de mijloace tehnice necesare, pe foi aparte, indicându-se locul plasării lor în text. În acest caz, desenele se execută în tuș, cu acuratețe, pe hârtie albă sau hârtie de calc; parametrii acestora nu vor depăși mai mult de două ori dimensiunile lor reale în text și nici nu vor fi mai mici decât acestea; fotografiile trebuie să fie de bună calitate.

Sub figură sau fotografie se indică numărul de ordine și legenda respectivă.

Tabelele se numerotează și trebuie să fie însoțite de titlu.

În text referințele se numerotează prin cifre încadrate în paranteze pătrate (de exemplu: [2], [5-8]) și se prezintă la sfârșitul articolului într-o listă aparte în ordinea apariției lor în text. Referințele se prezintă în modul următor:

a) articole în reviste și în culegeri de articole: numele autorilor, titlul articolului, denumirea revistei (culegerii) cu abrevierile acceptate, anul ediției, volumul, numărul, paginile de început și sfârșit (ex.: Zakharov A., Müntz K. Seed legumanis are expressed in Stamens and vegetative legumains in seeds of *Nicotiana tabacum* L. // J. Exp. Bot, 2004, vol.55, p.1593-1595);

b) cărțile: numele autorilor, denumirea completă a cărții, locul editării, anul editării, numărul total de pagini (ex.: Смирнова О.В. Структура травяного покрова широколистных лесов. - Москва: Наука, 1987.);

c) referințele la brevete (adeverințe de autor): în afară de autori, denumire și număr se indică și denumirea, anul și numărul Buletinului de invenții în care a fost publicat brevetul (ex.: Popescu I. Procedeu de obținere a sorbentului mineral pe bază de carbon / Brevet de invenție nr.588 (MD). Publ. BOPI, 1996, nr.7);

d) în cazul tezelor de doctorat, referințele se dau la autoreferat, nu la teză (ex.: Karsten Kling. Influența instituțiilor statale asupra sistemelor de ocrotire a sănătății / Autoreferat al tezei de doctor în științe politice. - Chișinău, 1998.)

Lista referințelor trebuie să se încadreze în limite rezonabile.

Nu se acceptă referințe la lucrările care nu au ieșit încă de sub tipar.

Articolele prezentate fără respectarea stilului și a normelor gramaticale, a cerințelor expuse anterior, precum și cu întârziere vor fi respinse.

PARTICULARITĂȚILE STRUCTURII TAXONOMICE ȘI ALE ECOBIOMORFELOR ALGELOR EDAFICE DIN VEGETAȚIA DE STEPĂ DUPĂ O PERIOADĂ DE PĂSTRARE ÎNDELUNGATĂ ÎN STARE DE ANHIDROBIOZĂ

Victor ȘALARU, Victor MELNIC

Catedra Ecologie, Botanică și Silvicultură

The paper presents the results obtained in the years 2000- 2002 of analysis of edaphic algal communities and their life forms which were contained in soil samples collected in the steppe vegetation in the years 1894-1987 and were kept in laboratory able to desiccation. There was a determinate taxonomic structure of communities of algae and the life forms with germination capacity after a desiccation period of 15-18 years.

Introducere

Algele edafice joacă un rol incontestabil în procesele pedogenetice ale solului, în sporirea fertilității și protejării lui împotriva eroziunilor acvatică. Este bine cunoscut faptul că algele, indiferent de apartenența lor taxonomică, contribuie la îmbogățirea solului cu cele mai diverse substanțe organice, menținând nivelul natural al humusului atât de necesar pentru dezvoltarea plantelor superioare. Totodată, algele, constituind una dintre principalele verigi în cadrul lanțurilor trofice, sunt bogate în substanțe proteice, pigmenți, aminoacizi, imunostimulatori și în alte substanțe biologic active. Reducerea diversității speciilor de alge se soldează cu pierderi considerabile nu doar de resurse de materie primă pentru diverse ramuri ale economiei, dar și de material genetic acumulat pe parcursul mai multor milioane de ani de evoluție. Din aceste considerente, problemele legate de păstrarea îndelungată a culturilor de alge în sol uscat în condiții de laborator și menținerea vitalității lor cu reactivarea ulterioară a funcțiilor în cazul condițiilor favorabile sunt de o importanță majoră.

În conformitate cu cele menționate, scopul investigațiilor rezidă în studierea efectului păstrării îndelungate a probelor de sol în condiții de laborator asupra componenței algoflorei edafice din vegetația de stepă.

Material și metode

În calitate de material de cercetare au servit probele de sol colectate în anii 1984-1987 în vegetația de stepă. Analiza lor a avut loc în aceeași perioadă conform metodelor aplicate în algologia edafică [1-7]. Solul rămas în aceleași pachete din hârtie dură de tip „Craft”, în care a fost colectat, a fost depozitat în dulapuri speciale pentru păstrare nelimitată. Probele au fost păstrate la temperatura și umiditatea camerei timp de 15-18 ani, perioadă după care, în 2000-2002, solul a fost transferat în condiții favorabile și studiat după aceleași metode care au fost aplicate în cazul primei analize.

Au fost utilizate culturile cu lamele de sticlă din vasele „Petri” crescute în condiții de laborator. Metoda respectivă nu este complicată și se caracterizează prin faptul că condițiile în care se dezvoltă algele se apropie maximal de cele naturale. Această metodă constă în faptul că solul, după o păstrare îndelungată, se introduce în vasele „Petri”, după care este umezit cu apă distilată, apoi vasele se expun la lumină. Pe suprafața solului din vasele Petri, în același timp cu umezirea lui și expunerea la lumină, se introduc 7 lamele de sticlă cu dimensiunile de 18×18 mm în prealabil sterilizate cu respectarea următoarelor condiții: a) suprafața solului nu trebuie să fie îndesită și complet nivelată; b) lamelele nu trebuie presate puternic pe suprafața solului, pentru a nu veni în contact cu solul cu toată suprafața lor; c) solul era umezit periodic cu apă distilată. Analiza lamelelor la microscop începe cu ziua a 5-a – a 6-a și continuă peste fiecare 5-6 zile în decurs de o lună.

În același timp, în laborator se însămânțau, din fiecare probă colectată, culturi pe mediile lichide. În acest scop erau folosite mediile nutritive Bristol (în modificarea lui M.M. Gollerbah), Cnop, Prat și Fitzgerald. În calitate de cultură martor se folosea cultura care era umezită cu apă distilată. Mediile nutritive se introduceau în cantitate de 60-70 ml în baloane preventiv sterilizate cu volum corespunzător de 100 ml. Solul uscat în condiții de laborator se mărunțea insistent, se amesteca și se împărțea în patru părți egale. După aceasta, cu o linguriță sterilizată, preventiv trecută prin flacăra spirtierei, se luau porții nu prea mari de sol din patru puncte ale fiecărei părți și se introduceau în baloane cu mediul lichid. Baloanele se închideau cu dopuri sterile con-

fecționate din vată și tifon trecute preventiv și ele prin flacăra spirtierei. Fiecare probă de sol se însămânța în trei repetări. După introducerea solului în mediu lichid baloanele atent se agitau, fără a umezi dopul din vată, și se expuneau la lumină. Evidențierea speciilor de alge din culturile acvatice începea de la 3-5 săptămâni după însămânțare, după care se mai analizau încă de 2-3 ori cu un interval de o lună și jumătate de fiecare dată. În procesul evidențierii la microscop a speciilor de alge se analizau preparate de pe pereții vasului, de la fundul lui, din grosimea stratului de mediu și de pe suprafața lui.

Rezultate și discuții

Fitocenozele de stepă ca tip de vegetație zonală au ocupat cândva teritorii largi și erau reprezentate, în partea de nord a Moldovei – prin stepă de graminee cu tufă bogată din punct de vedere floristic, și în cea de sud – prin stepa de negară cu păiuși. Speciile dominante de plante sunt *Stipa capillata* L., *S. lessingiana* Trin. et Rupr., *Festuca valesiaca* Scheich. et Gaudin. Printre speciile însoțitoare sunt întâlnite plante ca *Salvia nutans* L., *Achillea setacea* Waldst. et Kit., *Euphorbia glareosa* Pall. ex Bieb., *Linum tenuifolium* L., *Linum villosa* (L.) DC. ș.a.

Analiza solului colectat în fitocenozele de stepă și păstrat timp de 15-18 ani în condiții de laborator ne-a permis să stabilim prezența a 19 specii de alge din 9 familii, 15 genuri: Cyanophyta – 9, Xanthophyta – 5, Chlorophyta – 5 (Fig.1). Acestea constituie aproximativ 44% din numărul inițial de specii prezente în solul vegetației de stepă în perioada anilor 1984-1987. În relevele de sol proaspăt colectate numărul speciilor era de 2 ori și ceva mai mare decât cel stabilit de noi. Inițial, comunitatea de alge edafice reunea 43 specii și varietăți de alge din 13 familii, 25 genuri: Cyanophyta – 19, Xanthophyta – 9, Chlorophyta – 10, Bacillariophyta – 5 specii (Fig.1).

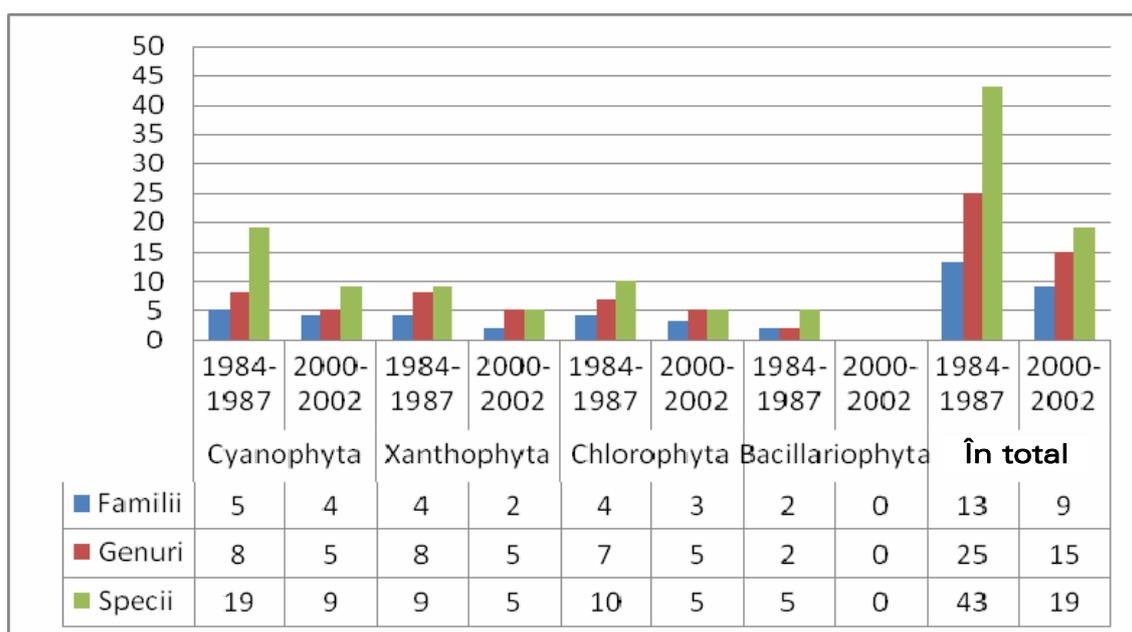


Fig.1. Structura taxonomică a comunităților de alge edafice în vegetație de stepă.

Un rol important în structura comunităților de alge edafice în solurile ocupate cu vegetație de stepă revine cianofitelor, care de cele mai dese ori reunesc 44-48% din numărul total de specii evidențiate. Cele mai diverse în specii sunt familiile Oscillatoriaceae – 4 specii, Nostocaceae și Schizothrichaceae – cu câte 2 specii fiecare și genurile Phormidium – 4 specii, Nostoc – 2 specii. Câte o specie revine familiei Rivulariaceae și genurilor Calothrix, Schizothrix și Microcoleus. Cel mai des întâlnite specii au fost *Nostoc linckia*, *Schizothrix lardacea* f. *diplosifon* cu coeficientul de răspândire 75%, *Nostoc punctiforme*, *Calothrix marchica*, *Microcoleus vaginatus* – cu câte 50% fiecare. O frecvență mai joasă a fost stabilită pentru speciile *Phormidium jadinianum*, *Ph. foveolarum*, *Ph. fragile*, *Ph. tenue*, al cărui coeficient de răspândire a fost de 25%. În comparație cu anii 1984-1987, diversitatea cianofitelor s-a micșorat de 2 ori, din cauza reducerii, în primul rând, a numărului de

forme filamentoase care aparțin ecobiomorfei „P” (Fig.2.). Din lista speciilor complet dispar speciile genurilor Oscillatoria și Cyndropermum. Se micșorează diversitatea speciilor genului Phormidium.

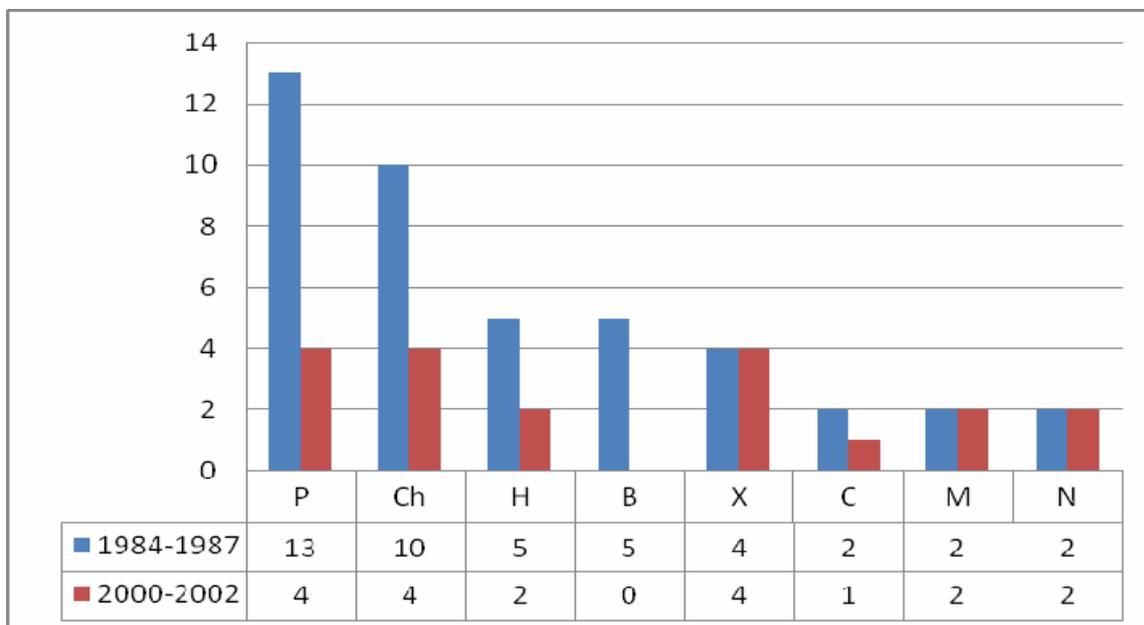


Fig.2. Numărul ecobiomorfelor evidențiate în anii 1984-1987 și 2000-2002 în vegetația de stepă.

Un rol aproximativ egal în formarea comunităților algale din solurile ocupate de stepă revine algelor verzi și xantofite. Majoritatea lor sunt reprezentanți ai familiilor Pleurochloridacea din filumul Xanthophyta și Chlorococcaceae din clorofite. Toate acestea specii, cu excepția speciei Gongrosira leptothricha, aparțin formelor monocelulare din ecobiomorfele „Ch” și „X”, care la fel ca și speciile grupei ecologice „P”, includ câte 21% din numărul algelor evidențiate.(Fig.3).

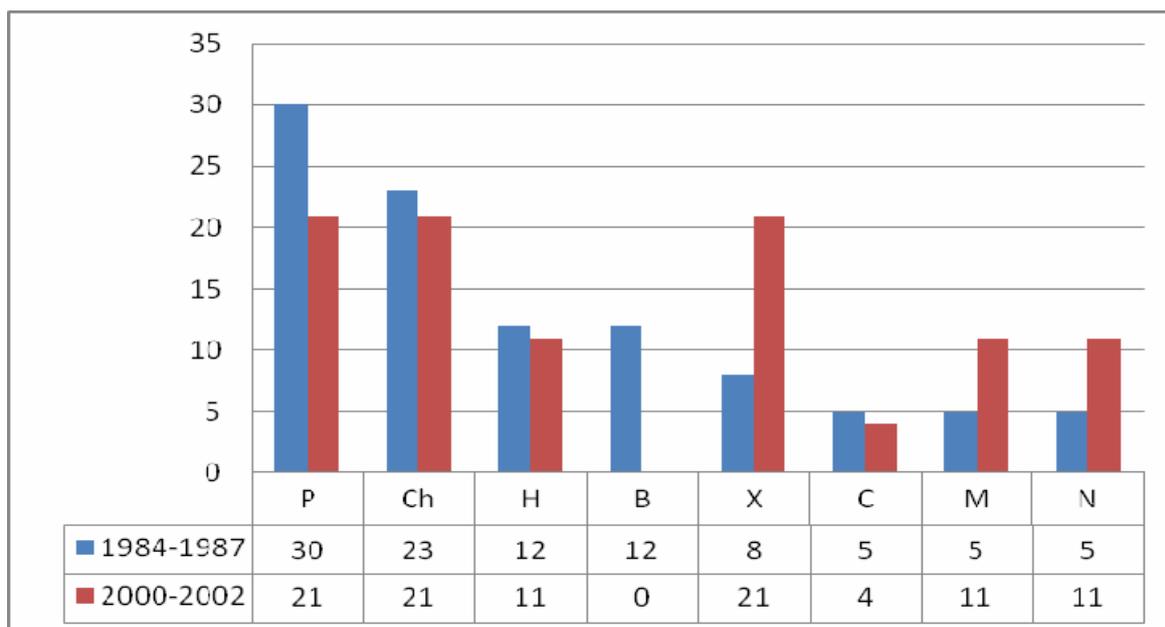


Fig.3. Conținutul, în %, al ecobiomorfelor din numărul total de specii evidențiate în anii 1984-1987 și 2000-2002 în vegetația de stepă.

Toate genurile de alge verzi și xantofite sunt reprezentate printr-o singură specie, cel mai des întâlnite fiind *Pleurochloris commutata*, *Chloridella simplex*, *Pseudopleurococcus botryoides*, cu coeficientul de răspândire de 50% fiecare. Mai rar sunt prezente speciile *Botrydiopsis eriensis*, *Vischeria stelata*, *Chloropedia incrustans*, *Dyctiococcus pseudovarians*, *Chlorella vulgaris*, *Gongrosira leptothricha*, fiecare cu un coeficient de răspândire de 25%. Complet dispar reprezentanții genurilor *Botryochloris*, *Gloeobotrys*, *Chlorobotrys* din xantofite și ai genurilor *Ulothrix*, *Klebsormidium* din clorofite. Aceste specii se referă la forme coloniale ale familiilor *Botryochloridaceae*, *Gloeobotrydaceae* sau la forme filamentoase din familia *Ulothrichaceae*.

Din cele 5 specii de alge bacilariofite evidențiate în anii 1984-1987, în 2000-2002 nu a fost prezentă nici una din ele.

Concluzii

În probele de sol proaspăt colectate numărul speciilor era de 2 ori și ceva mai mare decât cel stabilit de noi.

Un rol important în structura comunităților de alge edafice în solurile ocupate cu vegetație de stepă revine cianofitelor, care de cele mai dese ori reunesc 44-48% din numărul total de specii evidențiate.

În comparație cu anii 1984-1987, diversitatea cianofitelor s-a micșorat de 2 ori, cauza fiind reducerea, în primul rând, a numărului de forme filamentoase care aparțin ecobiomorfei „P”.

Un rol aproximativ egal în formarea comunităților algale din solurile ocupate de stepă revine algelor verzi și xantofite care, în afară de o specie, aparțin formelor monocelulare din ecobiomorfele „Ch” și „X”.

Toate genurile de alge verzi și xantofite sunt reprezentate printr-o singură specie.

Referințe:

1. Перминова Г.Н., Третьякова А.Н. Взаимодействие некоторых почвенных водорослей с высшими растениями. – В кн.: Наука – сельскому хозяйству. - Киров, 1964, с.113-114.
2. Зенова Г.М., Штина Э.А. Почвенные водоросли. - Москва: Изд-во МГУ, 1990.
3. Кузьяметов Г.Г. Методические указания по изучению почвенных водорослей. - Уфа: Перм. с.-х. ин-т, 1986.
4. Шалару В.В. Особенности формирования группировок почвенных водорослей на охраняемых лесных территориях МССР // Ботанические исследования (Кишинёв), 1992, Выпуск 12, с.103-114.
5. Шалару В.В. К методике анализа систематической структуры альгофлоры почв // Альгология (Киев), 1994, №4, с.62-73.
6. Штина Э.А. Методы изучения почвенных водорослей. - Киров, 1981.
7. Șalaru V.V. Componenta comunităților algelor de sol din pădurile Moldovei // Sesiunea științifică a Secției de biologie. - Cluj-Napoca, 1993, p.103.

Prezentat la 06.03.2012

CAPACITATEA ANTIOXIDANTĂ A PREPARATELOR DE FICOCIANINĂ OBȚINUTE ÎN BAZA BIOMASEI DE SPIRULINĂ ÎMBOGĂȚITE CU GERMANIU

Valentina BULIMAGA, Svetlana DJUR, Maria PISOV, Liudmila RUDI*, Valeriu RUDIC*

LCȘ „Ficobiotehnologie”

*Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM

The optimal time to harvest spirulina biomass for phycocyanin extraction was established. The phycocyanin yield and purity depend on used extracting solution, recording the maximum values for 1% CaCl₂ solution in 10% alcohol. The testing for antioxidant activity of phycocyanin preparations by ABTS⁺ was carried out for both: preparations obtained from spirulina biomass grown on Zarrouk medium, as well as those obtained from biomass cultivated on medium enriched with germanium. The antioxidant activity of containing germanium phycocyanin preparations was the highest.

Introducere

Studiile privind nutriția umană au scos în evidență că un conținut redus de antioxidanți în alimente duce la stresul oxidativ, în cazul căruia are loc producerea necontrolată de radicali liberi, care cauzează denaturarea proteinelor, lipidelor și acizilor nucleici. Stresul oxidativ este semnificativ în geneza multor patologii [1-2] – de la cancer și până la maladii cardiovasculare și degenerative. În ultimii ani, pentru contracararea efectului nefast al radicalilor liberi asupra organismului este propusă utilizarea bioidivelor alimentare cu efect anti-oxidant. Antioxidanții au capacitatea de a neutraliza radicalii liberi. Activitatea antioxidantă a început să fie subiectul unor cercetări intensive datorită necesităților mereu crescânde ale industriei alimentare și farmaceutice în utilizarea unor compuși bioactivi naturali anticancerigeni și anti-aging, ceea ce demonstrează beneficiile apreciabile ale antioxidanților pentru sănătate [3]. Substanțele antioxidative obținute din astfel de surse naturale, ca semințele oleaginoase, grâne, boboase, legume, fructe și al., au fost studiate mai profund.

În ultimii ani atenția cercetătorilor este orientată tot mai frecvent spre explorarea antioxidanților din cianobacterii și microalge. Unele studii au demonstrat că atât spirulina, cât și extractele obținute din spirulină pot inhiba unele maladii de cancer la oameni și animale și contribuie la fortificarea sistemului imun. Un component valoros al extractelor apoase obținute din spirulină sunt ficobiliproteinele.

Ficobiliproteinele sunt proteine-pigmenți bine solubile în apă, intens colorate în albastru, care au în componența lor catene pirolice deschise, legate covalent cu resturile de cisteină ale catenelor polipeptidice și care sunt pigmenți fotosintetici suplimentari la cianobacterii. Conform datelor din literatură, ficocianina obținută din cianobacterii, inclusiv din *Spirulina spp.*, posedă proprietăți antioxidante datorită prezenței în componența sa a grupărilor tetrapirolice, similare cu bilirubina, bine cunoscută ca un anihilator eficient de diverse specii reactive [4-7]. Potențialul antioxidant al ficocianinei a fost evaluat și de alți cercetători, utilizând ca surse de ficocianină unele specii de cianobacterii marine, astfel ca *Lyngbya* și *Phormidium spp.*, precum și *Spirulina sp.* Autorii propun și mecanismul posibil al acțiunii antioxidante a ficocianinei asupra radicalilor de hidroxil și peroxil, care se datorează prezenței în cromoforul numit ficocianobilină a legăturilor conjugate [5].

În scopul de a proteja organismul de consecințele stresului oxidativ, o cale eficientă poate fi îmbunătățirea nutriției antioxidante. Cercetările științifice efectuate în această direcție au demonstrat că acțiunea sinergică a unui spectru larg de antioxidanți este mai semnificativă, comparativ cu acțiunea unui singur antioxidant. Antioxidanții din sursele naturale au o bioaccesibilitate mai înaltă și au o eficiență protectivă mai majorată comparativ cu antioxidanții sintetici, inclusiv un efect anticancer pronunțat [8].

Conform datelor obținute la studiul *in vitro*, efectuat de cercetătorii chinezi, Se-ficocianina obținută din biomasa de spirulină îmbogățită cu seleniu manifestă o acțiune antioxidantă înaltă și ea s-a dovedit a fi un agent puternic antiproliferativ asupra celulelor de melanomă umană A375 și adenocarcinomă MCF-7 la ficat uman [9].

S-a stabilit, de asemenea, că și compușii organici ai germaniului au manifestat o capacitate anticancerigenă înaltă la tratarea unor tumori, însă acești compuși în unele cazuri pot avea și efecte adverse asupra organismului. Substituirea compușilor organici ai germaniului sintetizați pe cale chimică cu preparate naturale, obținute în baza biomasei de spirulină, ce conține germaniu organic legat cu componenții bioactivi, inclusiv cu ficocianina, prezintă interes atât din punct de vedere teoretic, cât și aplicativ.

Reieșind din cele expuse, prezintă interes lărgirea spectrului de preparate antioxidante cu acțiune anticancerigenă și antibacteriană, ce au în componența lor ficocianină cu conținut de alte elemente, cum ar fi germaniu. Scopul lucrării a constituit în obținerea preparatelor de ficocianină din biomasa îmbogățită cu germaniu și în determinarea activității lor antioxidante.

Material și metode

Obținerea biomasei de spirulină. Pentru a obține biomasa de spirulină utilizată ca sursă de ficocianină a fost efectuată cultivarea cianobacteriei CNMN-CB-11 pe mediul modificat Zarrouk [10] în decurs de 10 zile, la iluminarea de 2500-3500 lx, la temperatura de 30°C. Biomasa de spirulină îmbogățită cu germaniu și, respectiv, cu germaniu și seleniu a fost obținută la cultivarea spirulinei în aceleași condiții, dar cu suplimentarea la mediul de nutriție în a 3-a zi de cultivare a GeS_2 în concentrație de 10-15 mg/l. La a 10-a zi de cultivare biomasa a fost filtrată și spălată cu 2-3 volume de sol., 1,5% acetat de amoniu, suspendată în apă (20 mg/ml) și supusă congelării-decongelării repetate pentru distrugerea pereților celulari.

Determinarea germaniului a fost efectuată prin reacția spectrofotometrică cu fenilfluoron [11] în proba de biomasă supusă mineralizării prealabile.

Determinarea cantității de ficocianină a fost efectuată după A.Bennett și L.Bogorad [12], utilizând formula de calcul: $\text{Phyc (mg/ml)} = (E_{620} - 0,434E_{650}) / 5,34$

Metoda de determinare a activității antioxidante cu radicalul cationic ABTS⁺ Activitatea antioxidantă a extractelor a fost determinată prin metoda de decolorare a radicalului cationic ABTS⁺ (2,2 azinobis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) elaborată de Re și al. [13]. ABTS⁺ a fost generat prin oxidarea ABTS cu persulfat de potasiu. ABTS în concentrație de 7 mM și persulfatul de potasiu (2,45 mM) au fost dizolvați în apă deionizată. Amestecul reactant se lasă la temperatura camerei pentru 12-16 ore la întuneric până la utilizare. Din soluția de ABTS⁺ stoc se diluează cu etanol până la absorbanta $0,700 \pm 0,020$ la 734 nm. Apoi 1ml soluție diluată de ABTS⁺ se amestecă cu 10 mcl de probă testată (1,0 mg/ml) și după 6 min. se măsoară absorbanta la 734 nm. Procentul de inhibiție a absorbantei se calculează conform ecuației:

$$\% \text{ Inhibiție} = (\text{Abs}_{t=0} - \text{Abs}_{t=60 \text{ min}}) / \text{Abs}_{t=0} \cdot 100,$$

unde: $\text{Abs}_{t=0 \text{ min}}$ este valoarea extincției soluției de ABTS⁺ și $\text{Abs}_{t=6 \text{ min}}$ este valoarea extincției soluției ABTS⁺ după 6 min. incubare cu probele.

Toate determinările au fost efectuate în 3 repetiții.

Rezultate și discuții

Cercetarea acțiunii antioxidante a ficocianinei din biomasa de spirulină este precedată de extragerea și fracționarea ei de alți componenți. Conform unor date din literatură, s-a stabilit că randamentul ficocianinei extrase după dezintegrarea biomasei suspendate în lichid cultural este mai diminuat în comparație cu extragerea din biomasa suspendată în H_2O [14]. Aceste rezultate indică la faptul că prezența sărurilor ar putea influența asupra randamentului și purității ficocianinei extrase din biomasă. În această ordine de idei, a prezentat interes studiul influenței demineralizării biomasei obținute asupra cantității și calității ficocianinei. Demineralizarea a fost efectuată prin spălarea biomasei cu soluție de 1,5% acetat de amoniu și H_2O în raport de 1:2.

Conform rezultatelor cercetărilor efectuate anterior, s-a stabilit că puritatea și randamentul ficocianinei depinde de solventul utilizat pentru extragerea ei [15-16]. Pentru a stabili influența sărurilor restante în biomasa de spirulină asupra purității și randamentului ficocianinei, au fost determinați acești parametri pentru ficocianina obținută din biomasa nedemineralizată și cea demineralizată la extragere cu apă, soluție alcoolică de 10%, soluție apoasă de 1% CaCl_2 și soluție 1% CaCl_2 în alcool de 10%. Rezultatele obținute (Tab.1) demonstrează că atât randamentul ficocianinei, cât și puritatea ei sunt mai majorate la extragerea din biomasa supusă în prealabil demineralizării. Un randament înalt (23,9-24,8%) se observă pentru toate extracțiile, indiferent de extragentul utilizat, însă cu înregistrarea unei valori maxime a purității ($A_{620}/A_{280} = 2,70$) la extragerea ficocianinei cu soluție de 1% CaCl_2 în alcool de 10%.

Tabelul 1

Influența demineralizării biomasei spirulinei asupra purității și randamentului ficocianinei la extragerea ei din biomasa cultivată în condiții industriale

Proba de extract examinată	Cantitatea de ficocianină, mg/probă	Randamentul ficocianinei, %	Puritatea ficocianinei (A ₆₂₀ /A ₂₈₀)
Din biomasa nedemineralizată:			
a) apos	2,68±0,10	13,4±0,5	1,07±0,04
b) alcoolic (10%)	2,92±0,10	14,6±0,5	1,24±0,05
c) apos (1% CaCl ₂)	3,48±0,12	17,4±0,7	1,70±0,05
d) alcoolic (10%) cu 1% CaCl ₂	3,46±0,12	17,3±0,7	2,25±0,07
Din biomasa demineralizată:			
a) apos	4,94±0,19	24,7±1,0	1,75±0,05
b) alcoolic (10%)	4,96±0,20	24,8±0,9	1,80±0,05
c) apos (1% CaCl ₂)	4,78±0,18	23,9±0,9	2,08±0,06
d) alcoolic (10%) cu 1% CaCl ₂	4,92±0,18	24,6±1,1	2,70±0,08

În scopul stabilirii termenului optim de colectare a biomasei, care asigură valori maxime ale randamentului și purității ficocianinei extrase din biomasa, spirulina a fost supusă cultivării în decurs de 7, 10 și 15 zile. Conform rezultatelor obținute (Tab.2), termenul optim de recoltare a spirulinei ca sursă de ficocianină este la a 10-a zi de cultivare. Totuși, comparând extractul de ficocianină apos și cel alcoolic cu 1% CaCl₂, s-a stabilit că randamentul și puritatea ficocianinei sunt mai majorate, respectiv, de cca 1,1 și 1,3 ori la extragerea cu soluție de 1% CaCl₂ în alcool de 10%, indiferent de termenul de recoltare a spirulinei.

Tabelul 2

Influența termenului de cultivare a spirulinei asupra purității și randamentului ficocianinei la extragerea ei din biomasa cu H₂O și soluție de 1% CaCl₂ în alcool de 10%

Termenul de cultivare a spirulinei	Biomasa de spirulină, mg/ml	Caracteristica extractului de ficocianină					
		Cantitatea, mg/probă		Randamentul, %		Puritatea (A ₆₂₀ /A ₂₈₀)	
		apos	alcoolic cu CaCl ₂	apos	alcoolic cu CaCl ₂	apos	alcoolic cu CaCl ₂
7 zile	18,5±0,7	3,40±0,1	3,83±0,1	18,32±0,7	20,72±1,1	1,70±0,05	2,20±0,1
10 zile	20,0±0,8	3,91±0,1	4,33±0,1	19,5±0,8	21,60±1,2	1,96±0,06	2,46±0,1
15 zile	20,9±0,8	4,10±0,1	4,24±0,1	19,6±0,7	21,20±1,1	1,80±0,06	2,32±0,1

Preparatele de ficocianină obținute cu diverși solvenți din biomasa cultivată în decurs de 10 zile în condiții standard și cele obținute din biomasa îmbogățită cu germaniu au fost supuse testării pentru a stabili capacitatea lor antioxidantă prin metoda ABTS⁺. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 3.

Tabelul 3

Capacitatea antioxidantă a preparatelor parțial purificate de ficocianină, obținute din biomasa de spirulină, determinată prin metoda ABTS⁺ (Abs 734 nm)

Proba analizată	Conținutul Ge în preparat, mg/g	A734(0) - A734(exp)	% inhibiție
Preparate de ficocianină obținute din biomasa de spirulină cultivată pe mediul Zarrowk			
1. Extract apos	0	0,122±0,005	17,43±0,67
2. Extract cu sol. apoasă 1% CaCl ₂	0	0,095±0,005	13,57±0,38
3. Extract cu sol. 1% CaCl ₂ în 10% alcool	0	0,101±0,005	14,43±0,52
Preparate de ficocianină obținute din biomasa de spirulină îmbogățită cu germaniu			
1. Extract apos	0,80±0,02	0,143±0,007	20,43±0,78
2. Extract cu sol. apoasă 1% CaCl ₂	1,14±0,04	0,145±0,007	20,71±0,81
3. Extract cu sol. 1% CaCl ₂ în 10% alcool	1,14±0,04	0,146±0,007	20,86±0,67

Datele obținute demonstrează că toate preparatele testate posedă capacitate antioxidantă față de ABTS⁺. Studiul comparativ al capacității antioxidante a extractelor de ficocianină a scos în evidență valori mai înalte ale gradului de inhibiție în cazul extractelor obținute din biomasa îmbogățită cu germaniu (20,43-20,86%), comparativ cu valorile evaluate pentru ficocianina extrasă din biomasa cultivată în condiții standard (13,57-17,43%). Conținutul de germaniu în preparatele de ficocianină este cuprins în limitele 0,8-1,11 mg/g de ficocianină.

Conform unor autori, acțiunea antioxidantă a ficocianinei asupra radicalilor de hidroxil și peroxil se datorează prezenței în ficocianobilină (catena tetrapirolică) a legăturilor conjugate [5]. Nu poate fi exclus și aportul la acest proces a unor resturi aminoacide din catena polipeptidică [17]. A fost demonstrat că extractul apos, bogat în ficocianină, obținut din alga albastră-verzuie *Aphanizomenon flos-aquae*, are abilitatea de a proteja eritrocitele normale umane de deteriorarea oxidativă *in vitro*. Au loc schimbări spectrale ale ficocianinei induse cu AAPH - (2,2'-azobis(2-amidino-propan) dihidroclorid) sau cu CaCl₂. Incubarea extractului cu agenți oxidanți duce la o diminuare semnificativă a absorbanței la 620 nm și la dispariția rapidă a colorației albastre.

Valori mai înalte ale % de inhibiție, atestate în extractele de ficocianină obținute din biomasa îmbogățită cu germaniu, se pot datora prezenței în componența lor a germaniului organic, care poate fi un antioxidant potențial [18]. Efecte similare au fost observate și în studiul efectuat de cercetătorii chinezi privind activitatea antioxidantă și antiproliferativă a ficocianinei purificate ce conținea seleniu (Se-PC), obținute din *Spirulina platensis* îmbogățită cu seleniu [9]. Activitatea antioxidantă a Se-PC a fost evaluată prin 4 metode: ABTS, DPPH, de anihilare a anionului superoxid și de himoliză a eritrocitelor. Rezultatele au scos în evidență că Se-PC manifestă o activitate antioxidantă mai puternică, comparativ cu ficocianina, în anihilarea radicalilor liberi.

Putem concluziona că toate preparatele de ficocianină testate posedă activitate antioxidantă la determinare prin metoda ABTS⁺, însă cu o prevalare a activității antioxidante a preparatelor de ficocianină îmbogățite cu germaniu (% de inhibiție – 20,43-20,86). Biomasa de spirulină îmbogățită cu germaniu poate fi utilizată în calitate de sursă de Ge-ficocianină cu proprietăți antioxidante și alte efecte curative. Termenul optim de recoltare a spirulinei pentru extragerea ficocianinei este de 10 zile. Extragentul care asigură un randament și o puritate înaltă este soluția de 1% CaCl₂ în alcool de 10%.

Concluzii

1. A fost stabilit că etapa de demineralizare a biomasei de spirulină contribuie la majorarea purității și a randamentului ficocianinei extrase cu diverși solvenți. Termenul optim de cultivare a spirulinei pentru extragerea ficocianinei este de 10 zile. Extracția ficocianinei cu soluție de 1% CaCl₂ în 10% alcool asigură un randament (24,6%) și o puritate maximă a ficocianinei ($A_{620}/A_{280}=2,6$).

2. Preparatele de ficocianină manifestă capacitate antioxidantă semnificativă la determinare prin reacția cu ABTS⁺, % de inhibiție prevalând în probele de ficocianină obținută din biomasa îmbogățită cu germaniu față de ficocianina obținută din biomasa standard.

Referințe:

1. Lawler J.M. Exacerbation of pathology by oxidative stress in respiratory and locomotor muscles with Duchenne muscular dystrophy // J.Physiol, 2011, vol.25(3), p.2161-70.
2. Bennett S., Grant M.M, Aldred S. Oxidative stress in vascular dementia and Alzheimer's disease: a common pathology // J.Alzheimers Dis., 2009, vol.17(2), p.245-57.
3. Balsano C., Alisi A. Antioxidant effects of natural bioactive compounds // Curr. Pharm. Des., 2009, vol.15(26), p.3063-73.
4. Bhat V.B., Madyastha K.M. C-phycoyanin: a potent peroxy radical scavenger *in vivo* and *in vitro* // Biochem. Biophys. Res. Commun., 2000, vol.275(1), p.20-25.
5. Patel A., Mishra S., Ghosh P. Antioxidant potential of C-phycoyanin isolated from cyanobacterial species. *Lyngbya, Phormidium and Spirulina spp.* // Indian J. of Biochem. and Biophysics., 2006, vol.43, no.2, p.25-31.
6. Bertolin T.E., Farias D., Guarienti C.F. et al. Antioxidant effect of phycoyanin on oxidative stress induced with monosodium glutamate in rats // Braz. arch. biol. technol., 2011, vol.54, no.4, p.733-738.
7. Bermejo P., Piñero E., Villar Á.M. Iron-chelating ability and antioxidant properties of phycoyanin isolated from a protean extract of *Spirulina platensis* // Food Chemistry, 2008, vol.110, no.2, p.436-445.

8. Saxena A., Saxena A.K., Singh J., Bhushan S. Natural antioxidants synergistically enhance the anticancer potential of AP9-cd, a novel lignan composition from *Cedrus deodara* in human leukemia HL-60 cells // *Chem. Biol. Interact.*, 2010, vol.188(3), p.580-90.
9. Tian Feng Chen, Yum-Shing Wong. In vitro antioxidant and antiproliferative activities of selenium-containing phycocyanin from selenium-enriched *Spirulina platensis* // *J. Agric. Food Romey*, 2008, vol.2008, no.12, p.4352-4358.
10. Rudic V. Aspecte noi ale biotehnologiei moderne. - Chișinău: Știința, 1993.
11. Marczenko Z.; Balcerzak, M. Separation, preconcentration and spectrophotometry in inorganic analysis. - E-book type: Imprint: Elsevier, 2000.
12. Bennett A., Bogorad L. Complementary chromatic adaption in a filamentous blue-green alga // *Journal of cell biology*, 1973, vol.58, p.419-435.
13. Re R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay // *Free Radical Biology & Medicine*, 1999, vol.10, p.1231-1237.
14. Cisneros M., Rito-Palomares M. A simplified strategy for the release and primary recovery of C-phycocyanin produced by *Spirulina maxima*. // *Chemical and Biochemical Engineering Quaterly*, 2004, vol.18, no.4, p.385-390.
15. Bulimaga V., Djur S., Pisov M. et al. Elaborarea tehnologiilor noi de obținere în baza biomasei de spirulină a preparatelor de ficocianină // Conferința științifică internațională „Biotehnologia microbiologică – domeniu științific contemporan”, Chișinău 6-8 iulie 2011, p.9-10.
16. Bulimaga V., Pisov M. Exploararea biotehnologică a biomasei de spirulină în calitate de sursă de ficocianină – aditiv alimentar și cosmetic // Conferința științifică internațională „Creșterea impactului cercetării și dezvoltarea capacității de inovare”, USM, Chișinău, 21-22 septembrie 2011, p.38-41.
17. Romay Ch. et al. C-phycocyanin: A biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects // *Current protein and peptide science*, 2003, vol.4, no.3, p.207-216.
18. Wakabayashi Y. Effect of germanium-132 on low-density lipoprotein oxidation and atherosclerosis in Kurosawa and Kusanagi hypercholesterolemic rabbits. // *Bioscience biotechnology and biochemistry*, 2001, vol.65, no.8, p.1893-1896.

Prezentat la 03.04.2012

УРОЖАЙ И УРОЖАЙНЫЕ КАЧЕСТВА СЕМЯН ПШЕНИЦЫ**Андрей БАБИЦКИЙ***Ботанический сад, г. Тирасполь*

A fost studiată acțiunea umidității și a nutriției minerale asupra productivității plantelor și calității rodniciei semințelor la grâul dur Harkovskaia 46. Rezultatele experimentelor au demonstrat că dozele majorate de îngrășăminte minerale influențează productivitatea, în timp ce calitatea rodniciei semințelor nu depinde de dozele îngrășămintelor. Spre deosebire de factorul sus-numit, umiditatea solului modifică evident calitatea rodniciei semințelor. În condițiile deficitului de apă din sol semințele reproduse posedă o calitate joasă a rodniciei. Astfel, productivitatea și calitatea rodniciei semințelor sunt indici independenți și au o natură diferită.

In a field experiment with durum wheat the effect soil humidity and mineral nutrition on yield and yielding capacity of seeds was studied. The results of investigation showed that high doses of fertilizers is mainly to have a impact on yield, while the yielding capacity thus obtained seeds does not depend on them. In contrast to former the main factor modifying the quality of seeds is the level of soil moisture. Under the conditions of the water deficit of soil the seeds were reproduced with low yielding quality. Thus, yield and yielding capacity of seeds obtained by such way are independent parameters and have a different nature.

Введение

Потенциальная урожайность пшеницы определяется ее генетической основой и реализуется в различной степени в зависимости от агроэкологических условий ее выращивания, среди которых решающее значение имеют условия минерального питания, сева и уборки. В результате в агрономии накопилось громадное число публикаций по этой тематике. При этом излагаются частные сведения, касающиеся конкретно взятого сорта. Что касается общих закономерностей получения высокого урожая зерна, то до сих пор этот вопрос не выяснен.

Кроме генетической основы сорта, в практической земледелии более 100 лет известно и то, что урожай также в значительной степени зависит от агроэкологических условий репродукции семенного материала, под влиянием которых меняются **урожайные качества семян** (УКС). Этот вопрос еще более запутан и до сих пор находится в тупике, и в настоящее время даже не найдены оптимальные условия репродукции семенного материала с высокими урожайными качествами семян. Весь громадный объем данных, полученных до сих пор за весь период существования этой проблемы, является собранием беспорядочных и малоубедительных экспериментов и, в основном, состоит из мнений, предположений [1]. Имеются также и псевдонаучные фантазии о форме складок кожицы перикарпа, покрывающей воздушную камеру над зародышем, как определителя УКС [2], при этом игнорируется тот факт, что основной фактор изменения УКС происходит под влиянием агроклиматических факторов репродукции семян.

Что касается исследований зарубежных авторов, то необходимо принять во внимание то, что в Центральной Европе и на североамериканском континенте не наблюдается дефицита почвенной влаги и, в целом, процесс земледелия проходит в благоприятных агроэкологических условиях. Современная агротехника, обилие атмосферных осадков и вносимых минеральных удобрений создают как семена с высокими УК, так и высокий выход валового урожая зерна. Из европейских стран, в некоторой степени подобных Молдове и степной зоне Украины, Италия находится в агроэкологической зоне дефицита почвенной влаги, и там известно изменение УК семян, но природа и причина этого явления остается невыясненной [3].

Проведение таких исследований требует громадных финансовых затрат, возможных только при государственном финансировании на приобретение и использование сложной сельскохозяйственной техники в обширных полевых опытах, а также современного лабораторного научного оборудования для проведения физиолого-биохимических исследований, что было возможным в бывшем СССР. Результаты наших исследований освещены в серии ранее опубликованных работ [4-10].

В данной работе подводятся основные итоги более 30-летних исследований и их последующей компьютерной обработки и делается вывод о главном факторе в агроэкологических условиях возделывания пшеницы, меняющем ее УК.

Материал и методы исследования

Полевые опыты по изучению урожая зерна пшеницы проводились в экологических условиях дефицита почвенной влаги степной зоны Одесской области на твердой яровой пшенице Харьковская 46 при 13 вариантах уровней и сочетаний минерального питания и трех режимах влажности почвы, создаваемых передвижной дождевальной установкой. Полученные семена испытывались на их урожайные качества выращиванием пшеницы без удобрения, после парового предшественника, при естественном уровне увлажнения почвы за счет атмосферных осадков. Полученные результаты обрабатывались статистически и затем по пакету **Нормрасп** в программе Эксел реконструировались обобщенные кривые нормального распределения. Более подробно условия эксперимента даны в более ранних публикациях [4-10], в которых показано, что урожай и УК семян пшеницы имеют разную природу.

Результаты и их обсуждение

Для понимания, с первого взгляда, различий в главных условиях получения высокого урожая зерна, по сравнению с высокими урожайными качествами семян, вначале рассмотрим рисунки 1 и 2.

Частотное распределение урожая пшеницы под влиянием минеральных удобрений и влажностей почвы

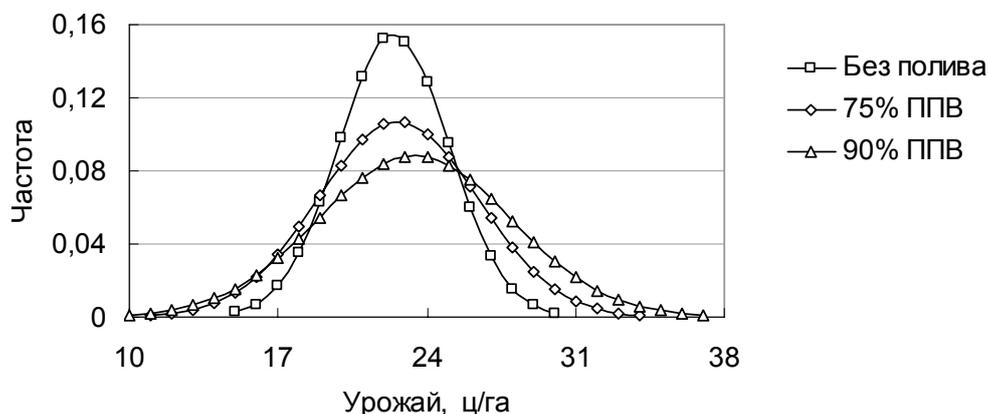


Рис.1. Влияние минерального питания и влажности почвы на распределение величины урожайности пшеницы.

Частотное распределение урожайных качеств семян пшеницы под влиянием минеральных удобрений и влажностей почвы



Рис.2. Влияние влажностей почвы и минерального питания на урожайные качества семян пшеницы.

Из них видно, что главный фактор вариации данных урожая зерна – это уровни и сочетания минеральных удобрений, в то время как влажность почвы почти не влияет на среднюю урожайность по всему ансамблю условий опыта.

Из рис. 1 видно, что влажность почвы не влияет на средний урожай зерна, а лишь только расширяет размах изменчивости величины урожая как в сторону меньшего, так и большего урожая. При выращивании пшеницы на высокий уровень урожая зерна необходимо использовать те уровни минеральных удобрений, которые при высокой влажности почвы сдвигают урожайность в правую сторону кривой частоты распределения урожая. Однако при этом очевиден тот факт, что высокая влажность почвы при несбалансированном удобрении или без него так же закономерно приводит к сдвигу кривой распределения влево или к падению уровня урожая.

Главные условия репродукции семян с высокими УК и валового сбора урожая зерна совершенно, однако, противоположны. Главное в первом случае – это уровень влажности почвы (рис. 2), а режимы минерального питания, как второстепенные факторы, находятся внутри диапазона изменчивости урожайных качеств. После изложения главных итогов многолетней работы по изучению урожая и урожайных качеств семян пшеницы, теперь уже можно более детально подробно рассмотреть особенности влияния главных факторов на урожай, представленных на рис. 3, из которого видны три характерные ответные реакции растений пшеницы на возрастание уровня влажности почвы. Первый тип – это снижение урожая при повышении влажности, что характерно при выращивании пшеницы в отсутствие удобрений – N0P0K0, и вариант при стандартном удобрении с отсутствием азота – N0P60K60. Эти сочетания минерального питания нежелательны, ибо, контролируя уровень внесенных удобрений, мы не можем контролировать уровень влажности почвы от атмосферных осадков и при дождливом лете получим снижение урожая. Второй тип реакции – это некоторая стабильность урожая при вариации уровня влажности почвы: N30P30K30, N30P60K60, N60P60K60, N60P60K90, N60P0K60, N60P60K90.

При этих вариантах удобрений можно получить предсказуемый урожай, который необходимо сдать заказчику, когда лишнее зерно не имеет потребителя и его хранить негде. Наконец, третий тип ответной реакции – это ответ на высокий уровень азотного удобрения, создаваемый вариантами N90P90K90, N90P60K60, N60P90K60. И в некоторой степени N60P60K0 за счет антагонизма между калиевым и азотным питанием пшеницы.

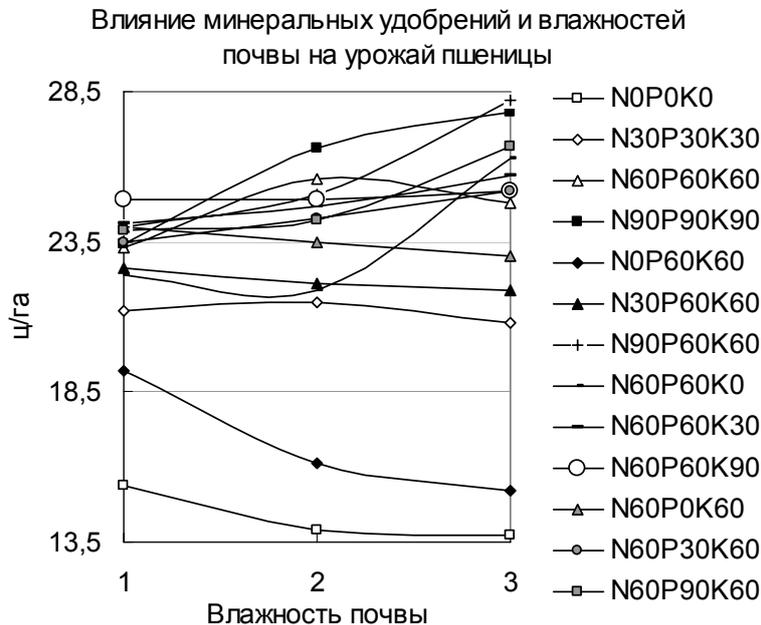


Рис.3. Влияние уровней и сочетаний минеральных удобрений при трех режимах влажности почвы на урожай зерна пшеницы. Варианты влажности почвы: 1 – дефицит почвенной влаги при естественном увлажнении от дождевых осадков (без полива); 2 – оптимальная влажность почвы 75% ППВ; 3 – избыточная влажность почвы 90% ППВ.

Наконец, необходимо детально рассмотреть и оставшиеся менее существенные по своей значимости факторы некоторого влияния минерального питания на урожайные качества семян. Главный, определяющий фактор влияния на урожайные качества семян был рассмотрен выше – это оптимальный

уровень влажности почвы, что неоднократно подчеркивалось, которым является 75% ППВ. При значительном разрастании корневой системы в почве возникает дефицит кислорода, что в некоторой степени лимитирует уровень УК семян.

Этот дефицит кислорода частично компенсируется избытком фосфора в дозе 90 кг/га тем, что в сочетании N60P90K60 он усиливает энергетический обмен в клетках, синтез макроэргических фосфорных соединений и генерацию АТФ в тканях корней в частично анаэробных условиях, чем усиливает уровень обменных процессов и, в конечном итоге, уровень УК семян, формируемых на материнских растениях пшеницы. Этот эффект фосфорных соединений проявляется при оптимальном и максимальном увлажнении почвы.

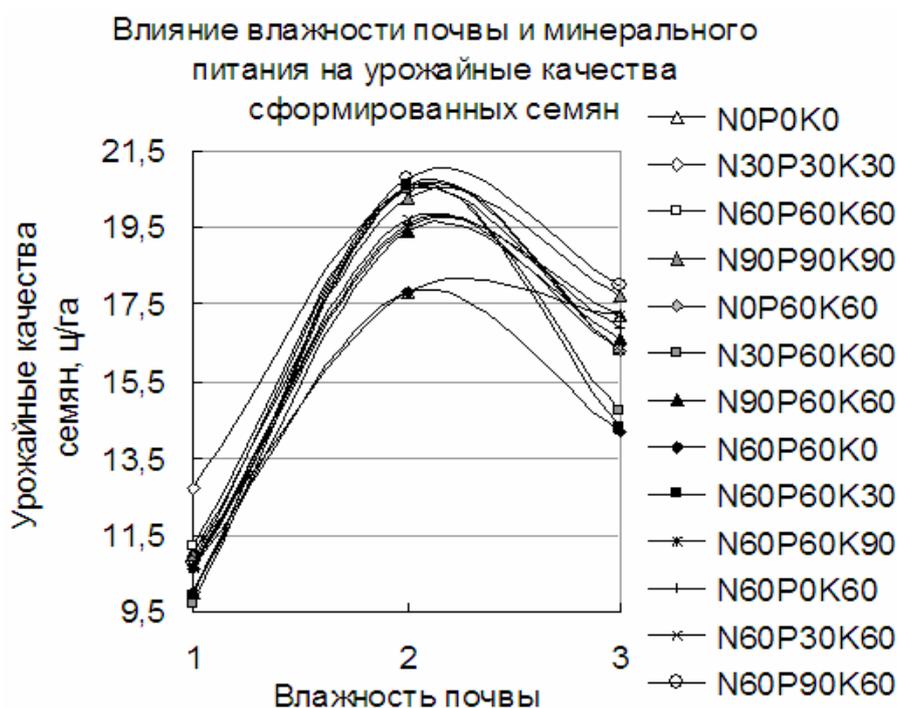


Рис.4. Влияние режима влажности почвы и сочетаний минеральных удобрений на формирование семян с высокими урожайными качествами. Обозначения влажностей почвы, как на рис. 3.

В условиях дефицита почвенной влаги наиболее высокие урожайные качества семян формируются на N30P30K30 уровне минеральных удобрений и синергический эффект фосфора не проявляется. Остальные уровни удобрений неэффективны. Их действие в основном направлено на усиление накопления белка в зерне пшеницы, которое осуществляется за счет усиления синтеза низкопитательного и, в некоторой степени, токсичного для желудочно-кишечного тракта человека спирторастворимого белка глиадин. Усиление синтеза этого белка является показателем водного стресса и поэтому глиадин можно отнести к вододефицитным стрессовым белкам (water deficit stress protein - WDSP). Отсюда избыточное минеральное питание при засухе вызывает стресс по водному обмену, что способствует формированию высокобелковых семян с низкими УК [11-13].

Итак, в результате проведенной работы можно сделать выводы о различной природе урожая и УКС пшеницы. Высокий урожай зерна пшеницы создается высоким и сбалансированным уровнем минерального питания при среднем уровне влажности почвы. Высокие УКС формируются путем их репродукции при оптимальной влажности почвы <http://apropomagazin.md/> и почти не зависят от уровня минерального питания семенного посева, за исключением небольшого еще добавочного повышения УКС за счет внесения повышенных доз фосфора в условиях оптимального и максимального увлажнения почвы.

Литература:

1. Экология семян пшеницы / Ред. Л. К. Сечняк. - Москва: Колос, 1983. - 340 с.
2. Шевченко В.Т. Методика определения урожайных свойств семян мягкой пшеницы по признакам развития зародышей. - Ворошиловград, 1978. - 20 с.
3. Ацци Дж. Сельскохозяйственная экология. - Москва: ИЛ, 1958. - 320 с.
4. Бабицкий А.Ф. Экологически индуцируемая групповая память у семян возделываемых растений // Conferința științifică: "Genetica și fiziologia rezistenței plantelor", in memoriam academicianului A Jacota, 21 iulie 2011. - Chișinău, 2011, p.15.
5. Бабицкий А.Ф. Режим влажности почвы при выращивании пшеницы модифицирует продуктивные качества ее семян // Культурные растения для устойчивого сельского хозяйства в 21 веке (Иммунитет, селекция, интродукция). Том 4. Часть 1. - Москва, 2011, с.373-380.
6. Бабицкий А.Ф. Онтогенетическая наследственность возделываемых растений // Современные проблемы эволюционной биологии. Международная Научно - методическая конференция, посвященная 200-летию со дня рождения Ч.Дарвина и 150-летию выхода в свет «Происхождения видов», 12-14 февраля 2009 г.: Сборник статей. Том 1. - Брянск, 2009, с.301-307.
7. Бабицкий А.Ф. Влияние условий репродукции семян пшеницы и времени их хранения на кинетику активности кислой фосфатазы в зародышах в процессе их прорастания // Физиолого-биохимические основы продукционного процесса у культивируемых растений. Материалы Всероссийского симпозиума с международным участием, посвященного 65-летию со дня рождения В.А. Кумакова, г. Саратов, 13-15 октября 2010 г. - Саратов, 2010, с.6 -8.
8. Бабицкий А.Ф. Экологически индуцируемая вариация урожайных качеств семян возделываемых растений // Регуляция роста, развития и продуктивности растений. Материалы 7-ой Международной научной конференции, г. Минск, 26-28 ноября 2011 г. - Минск: Право и экономика, 2011, с.20.
9. Бабицкий А.Ф. Сохранение высоких урожайных качеств семян возделываемых растений в экологических условиях дефицита почвенной влаги // Conferința Națională „Cercetarea și inovarea în parteneriat cu mediul de afaceri”. - Chișinău, 2011, p.49-53.
10. Бабицкий А.Ф. Условия выращивания пшеницы для получения высокого урожая зерна и формирования высоких урожайных качеств семян // Академику И.А. Крупеникову – 100 лет: Сборник научных статей Есо-ТИРАС. - Chișinău, 2012, p.117-121.
11. Бабицкий А.Ф. Определяющие факторы содержания и качества белка в зерне твердой пшеницы // Агроном, 2011, №2 (32), с.70-72.
12. Бабицкий А.Ф. Белок зерна пшеницы – от чего зависит и чем является глиадин // Рациональное использование ресурсного потенциала регионов России и сопредельных государств: Сборник научных статей / Под общ. ред. доктора с.-х. наук А.А. Афонина. - Брянск: Издательство «Курсив», 2011, с.23-30.
13. Тома З.Г., Бабицкий А.Ф. От чего зависит и чем является белок пшеницы // Conferința Națională „Cercetarea și inovarea în parteneriat cu mediul de afaceri”. - Chișinău, 2011, p.80-84.

Prezentat la 24.05.2012

CULTIVAREA ALGEI *NOSTOC FLAGELLIFORME* PE MEDII OBTINUTE PE BAZA DEȘEURILOR DE LA COMPLEXELE ZOOTEHNICE

Sergiu DOBROJAN, Cristina GORBATENCO, Galina DOBROJAN, Irina STRATULAT

Catedra Ecologie, Botanică și Silvicultură

Les déchets des oiseaux, des porcs et du bétail peuvent être utilisés pour cultiver l'algue *Nostoc flagelliforme* et obtenir une biomasse algale moins chère. Comme résultat, on peut obtenir l'algue *Nostoc flagelliforme* dans un milieu de 5% (11.285 g/l), et la plus faible dans un milieu d'un pourcent (5.714 g/l). Les meilleures valeurs de la vitesse de reproduction se voient dans un milieu de 5% le 10-ième jour (0.203 jours⁻¹), tandis que la plus faible, dans un milieu d'un pourcent le 15-ième jour (0.10 jours⁻¹).

Introducere

Este bine cunoscut faptul că toate complexele zootehnice din Republica Moldova posedă în proprietate suprafețe de terenuri destul de mici, ceea ce nu permite o gestionare rațională a deșeurilor, solide și lichide, parvenite în rezultatul funcționării. Aceste deșuri pot avea un impact negativ asupra resurselor acvatice locale, deoarece conțin poluanți în cantități destul de înalte; deci, ele trebuie gestionate corect și rațional. Astfel, aceste cantități majore de deșuri animale pot fi reciclate, prin utilizarea lor ca sursă nutritivă la creșterea algelor, obținând profit mult mai înalt ca, de exemplu, în cazul folosirii lor pe terenurile agricole ca îngrășământ organic. În afară de aceasta, algele au capacitatea de epurare a acestor ape reziduale, caracterizată prin asimilarea unor indici chimici și prin producerea, pe contul acestora, a unei mari cantități de biomasă algală, cu un conținut biochimic valoros, care ulterior poate fi utilizat în agricultură, farmaceutică etc. [1]. Printre speciile de alge care pot fi cultivate pe medii alcătuite din deșeurile lichide sau solide de la complexele zootehnice se numără și *Nostoc flagelliforme*. Unele cercetări [2] atestă că biomasa algei *Nostoc flagelliforme* cultivate pe ape reziduale prezintă o sursă bogată de substanțe biologice active, printre care: proteine – 20,80%, lipide – 5,57% și glucide – 11,24%. De aceea, cultivarea algei *Nostoc flagelliforme* pe medii nutritive compuse din ape reziduale de la complexele zootehnice, în scopul obținerii biomasei algale și epurării acestora, prezintă un interes deosebit pentru cercetare și implementare în practică.

Astfel, ne-am propus drept scop utilizarea deșeurilor solide de la unele complexe zootehnice, ca mediu nutritiv, pentru cultivarea algei *Nostoc flagelliforme*, în vederea obținerii biomasei algale, și cercetarea particularităților ei fiziologice.

Material și metode

Cercetările au fost efectuate în cadrul LCS „Algologie” utilizând tulpina algei *Nostoc flagelliforme* (*Berk. et Curt. Elenk.*), care a fost selectată în cultură algologic pură de către colaboratorii laboratorului. Alga a fost cultivată pe mediu de cultură compus din deșuri solide de la complexele zootehnice. Volumul inițial al mediilor de cultivare constituia 200 ml, la care s-a inoculat alga cu doza de 0,5 g/l. Mediul de cultivare s-a obținut astfel: fecalele de la porcine, bovine și păsări, păstrate în frigider timp de jumătate de an (câte 130 g/l de fiecare tip) au fost dizolvate cu apa distilată în raport de 1:5, prin agitare permanentă. Frația lichidă a fost separată de cea solidă prin filtrare, efectuată în mai multe etape (utilizând tifonul, hârtia de filtru, hârtia cu lentă albastră) și diluată cu apa distilată până la concentrațiile de 1%, 5% și 10%. Experiențele au fost efectuate în condiții de laborator la temperatura de 28,5±1,02°C și iluminarea continuă de 1800-2400 lucși, în trei repetări. Determinarea productivității algale s-a efectuat conform metodei filtrelor uscate, utilizând următoarea formulă de calcul: $(B-A) \times 5$ (g/l), unde A – greutatea filtrului spălat și uscat; B – greutatea filtrului cu biomasă uscat și răcit până la temperatura camerei; 5 – coeficientul de recalculare pentru 1 litru de suspensie algală [3]. Viteza de creștere a populației algei *Nostoc flagelliforme* (*Berk. et Curt. Elenk.*) a fost determinată conform procedurii propus de С.Дж. Перт [4], iar viteza de reproducere a algei a fost determinată după criteriul stabilit de К.М. Хайлова [5]. Analiza conținutului chimic al mediului de cultură a fost efectuată conform metodologiei de specialitate [6]. Calculul statistic al rezultatelor a fost stabilit utilizând programa STATISTICA – 6, cu determinarea mediei aritmetice (M) și a erorii standard (m).

Rezultate și discuții

Apele reziduale conțin cantități semnificative de N, P, K, Na, Ca etc., care constituie o sursă incontestabilă pentru creșterea algelor. Pe lângă aceasta, ele prezintă o problemă majoră de mediu, contribuind la poluarea solului și apelor, de aceea trebuie gestionate prin valorificare.

Analiza chimică a mediului de cultivare denotă că pH-ul mediilor este situat între valorile 7,15-7,66. Azotul amoniacal diferă în funcție de concentrație: la 1% – 16,99±1,09 mg/l, la 5% – 84,95±5,45 mg/l și la 10% – 169,9±10,9 mg/l. Nitrații la fel se găsesc în cantități mai mari în mediile cu concentrație mai înaltă: la concentrația de 10% – 1,25±0,11 mg/l, la cea de 5% – 0,62±0,0 mg/l, iar la cea de 1% doar 0,12±0,01 mg/l. Ortofosfații se situează în limitele de 15,47-1,54 mg/l, în mediile de 1-10%. Hidrogenocarbonații, duritatea și reziduul fix descresc odată cu reducerea concentrației mediului (Tab.1).

Tabelul 1

Conținutul chimic al mediului utilizat la cultivarea algei *Nostoc flagelliforme*

Concentrația	Indicii analizați					
	pH M±m	NH ₄ ⁺ , mg/l M±m	NO ₃ ⁻ , mg/l M±m	PO ₄ ³⁻ , mg/l M±m	HCO ₃ ⁻ , mg/l M±m	Reziduu fix, mg/l M±m
1%	7,15±0,25	16,99±1,03	0,12±0,01	1,54±0,16	32,025±1,52	43,666±1,852
5%	7,32±0,27	84,95±5,25	0,62±0,06	7,73±0,80	160,125±7,62	218,3±9,26
10%	7,66±0,31	169,9±10,9	1,25±0,11	15,47±1,70	320,25±15,25	436,66±18,52

Astfel, conform rezultatelor analizelor chimice ale apelor reziduale, putem constata că atât concentrația de 1%, cât și cea de 10% sunt benefice pentru cultivarea algei *Nostoc flagelliforme*. Concentrațiile mai mari de 10% nu au fost utilizate ca mediu de cultură, deoarece contribuie la obținerea unei cantități reduse de biomasă.

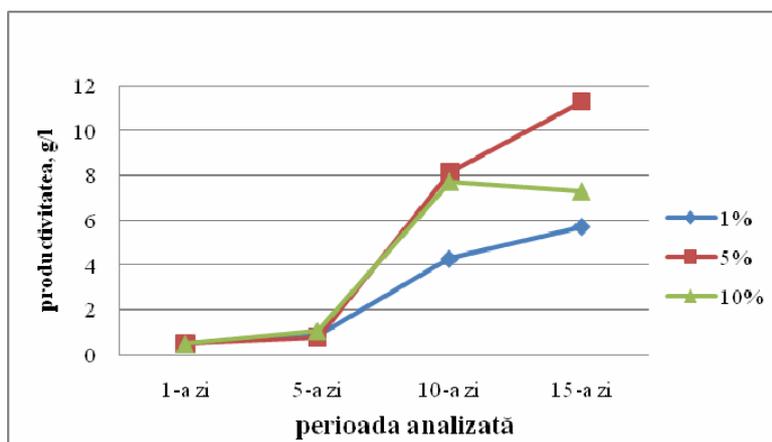


Fig.1. Productivitatea algei *Nostoc flagelliforme* cultivate pe ape reziduale.

Rezultatele investigațiilor efectuate atestă că pe parcursul desfășurării experienței până la a 10-a zi s-a observat o creștere considerabilă a biomasei în toate probele, în special în cazul probei cu concentrația de 10% – 8,14±0,4 g/l, pentru concentrația de 5% s-a obținut o productivitate de 7,71±0,32 g/l, pe când pentru 1% – de doar 4,28±0,20 g/l. Începând cu a 10-a zi și până la finele experienței (15 zile) s-a înregistrat o creștere mai lentă a biomasei algale: în cazul mediului de 1% se observă o creștere cu 1,42 g/l, pentru mediul de 5% – cu 3,143 g/l, iar în cazul mediului de 10% biomasa a diminuat cu 0,428 g/l. Aceasta se explică prin faptul că în mediile de cultivare cu adaos de ape reziduale la finele experienței a început procesul de epuizare a substanțelor nutritive, necesare creșterii și dezvoltării algei *Nostoc flagelliforme*.

Rezultatele obținute denotă că viteza de creștere se mărește până la a 10-a zi, în toate probele: în varianta de 1% atinge valoarea de 0,378 zile⁻¹, în cea de 5% – 0,764 zile⁻¹, iar în proba de 10% – 0,721 zile⁻¹ (Tab.2). La a 15-a zi valorile vitezei de creștere diminuează în cazul tuturor mediilor, ceea ce indică că are loc inițierea fazei staționare de creștere.

Tabelul 2

Viteza de creștere a populației algei *Nostoc flagelliforme* cultivate pe ape reziduale (zile⁻¹)

Zilele de analiză	Concentrația mediului		
	1%	5%	10%
a 5-a	0,032	0,048	0,111
a 10-a	0,378	0,764	0,721
a 15-a	0,342	0,710	0,452

Un alt indice fiziologic, ce permite stabilirea dinamicii dezvoltării algei *Nostoc flagelliforme* cultivate pe ape reziduale, este viteza de reproducere care indică intensitatea reproducerii realizată prin creșterea biomasei (Tab.3).

Tabelul 3

Viteza de reproducere a algei *Nostoc flagelliforme* cultivate pe medii cu adaos de ape reziduale (zile⁻¹)

Zilele de analiză	Concentrația mediului		
	1%	5%	10%
a 5-a	0,08	0,114	0,184
a 10-a	0,11	0,203	0,193
a 15-a	0,10	0,166	0,124

Viteza de reproducere a algei *Nostoc flagelliforme* diferă în funcție de perioada analizată și de concentrația mediului de cultură utilizat. În cazul probei de 1% observăm că de la a 5-a la a 10-a zi are loc o creștere cu 0,03, iar de la a 10-a la a 15-a zi se reduce cu 0,01. Pentru proba de 5% la fel este caracteristică mărirea valorilor vitezei de reproducere de la a 5-a la a 10-a zi cu 0,089, pe când de la a 10-a la a 15-a zi are loc o diminuare cu 0,037; în cazul probei de 10%, de la a 5-a la a 10-a zi are loc o majorare cu 0,009, iar de la a 10-a până la a 15-a zi a experienței viteza de reproducere a scăzut cu 0,069.

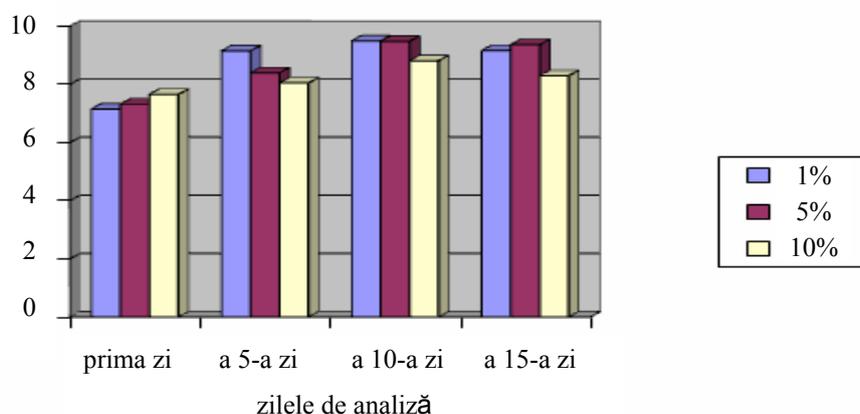


Fig.2. Modificările pH-ului mediilor de cultură la cultivarea algei *Nostoc flagelliforme*.

Analizând modificările pH-ului, observăm că valorile acestuia variază în dependență de ziua experienței și de la o concentrație la alta. În prima zi media pH-ului este de 7,37. Începând cu ziua a 5-a, pH-ul crește considerabil, în special în proba cu concentrația de 1% (9,15), pentru 5% – 8,40, iar în mediul de 10% – 8,05 (ceea ce denotă că alga s-a acomodat la aceste medii și are loc dividerea celulelor). Însă, până la finele experienței (la a 15-a zi), pH-ul se micșorează. De exemplu, în proba de 10% pH-ul era 8,30, în proba de 5% – 9,37, iar în proba de 1% – 9,16, ceea ce se asociază cu viteza de reproducere (unde practic se respectă aceeași legitate).

Concluzii

Apa reziduală copmusă din combinația a trei tipuri de deșeuri (cu concentrația de până la 10%) poate fi utilizată la cultivarea algei *Nostoc flagelliforme*. Cea mai înaltă cantitate de biomasă obținem în cazul cultivării algei *Nostoc flagelliforme* pe mediul de 5% (11,28 g/l), iar cea mai mică pe mediul de 1% (5,71 g/l). Viteza de creștere a populației și de reproducere a algei crește până la a 10-a zi, după care are loc o descreștere, ceea ce era caracteristic și pentru pH-ul mediului de cultivare.

Referințe:

1. Dobrojan S. Modificările morfofiziologice și biochimice ale algei *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl. cultivate pe ape reziduale și utilizarea ei: Teză de doctor în științe biologice. - Chișinău, 2011.
2. Usturoi R., Șalaru V. *Nostoc flagelliforme* – sursă de substanțe biologice active. – În: Conferința științifică națională cu participare internațională „Probleme actuale ale microbiologiei și biotehnologiei”, consacrată celei de-a 50-a aniversări de la fondarea Secției de Microbiologie. - Chișinău, 2009, p.158-160.
3. Рычков Р.С. Микробиологическая промышленность – продовольственной программе СССР // Достижения биологии. - Москва: Знание, 1984.
4. Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. - Москва: Мир, 1978.
5. Хайлов К.М. Экологическая физиология морских планктонных водорослей (в условиях культур). - Киев: Наукова думка, 1971.
6. Grigheli Gh., Șalaru V., Jigău Gh., Stasiev Gh., Galbură O. Analiza chimică a calității apei. - Chișinău: CEP USM, 2006.

Prezentat la 21.05.2012

UTILIZAREA MEDIULUI DE CULTURĂ DREW LA CULTIVAREA ALGEI AZOTFIXATOARE *ANABAENOPSIS* SP.

Sergiu DOBROJAN, Irina STRATULAT, Galina DOBROJAN, Tudor POPESCU, Corina NEGARA

Catedra Ecologie, Botanică și Silvicultură

The cultivation of algae *Anabaenopsis* sp. on Drew medium is efficient for maintaining in laboratory condition, can obtain a maximal biomass of $1,04 \pm 0,05$ g/l in 11-12 days. Growth phases for algae *Anabaenopsis* sp cultured on Drew medium is: one day for lag phase, one day – log phase, 7 days – exponential phase and one day stationary. The higher specific growth speed is in log phase, and for exponential is $0.010 \pm 0,004$ days⁻¹.

Introducere

La moment, se cunosc mai multe medii de cultură utilizate la cultivarea algelor. Mediile de cultivare se selectează în funcție de specificul cultivării și scopul experimentului. Pentru cultivarea algelor în scopul obținerii biomasei se utilizează mediile lichide, care permit studierea caracteristicilor fiziologice, morfologice, citologice, biochimice etc. [1]. Un rol deosebit atât în natură, cât și în viața omului au algele cianofite, care, de fapt, sunt cultivate mai frecvent în scopuri industriale și științifice. Unii reprezentanți ai încrengăturii Cyanophyta au capacitatea de a fixa azotul în sol, fapt care sporește mult interesul pentru cultivarea lor. Pentru obținerea biomasei de alge cianofite azotfixatoare se utilizează mai multe medii de cultură, cum ar fi de exemplu: Bristol; Gusev, Telitenco, Fedorov nr.1-2; Fogga; Beneche; Drew etc., care însă diferă în funcție de specia algală [2]. Din mediile sus-menționate, cel mai ieftin și ușor de preparat este mediul Drew, deoarece este compus din patru săruri care nu depășesc cantitatea de 0,2 g/l, dar care nu asigură însă obținerea biomasei algale în cantități mari. Mediul Drew este utilizat atât pentru cultivarea algelor în scopul obținerii biomasei, cât și la studierea calitativă și cantitativă a algoflorei unor soluri [3,4]. Rezultatele unor cercetări atestă că mediul de cultură Drew poate fi utilizat la cultivarea algei *Anabaenopsis* sp., însă caracteristicile fiziologice care indică creșterea biomasei lipsesc [5]. Un interes major față de cultivarea algei *Anabaenopsis* sp. se exprimă prin conținutul chimic valoros. Unele cercetări arată că tulpina algei *Anabaenopsis* sp. (Albufera), cultivate pe mediul de cultură Arnon cu adaos de 30 mM NaCl, prezintă o sursă importantă de ficobiliproteine: proteine – $52,2 \pm 2,5\%$; c-ficoeritrină – $0,8 \pm 0,1\%$; c-ficocianină – $13,0 \pm 0,9\%$; aloficocianină – $6,3 \pm 0,2\%$ [6], ceea ce sporește interesul cultivării, îndeosebi în scop farmaceutic. Alte investigații accentuează că alga *Anabaenopsis* sp. (Albufera), cultivată pe mediul de cultură Arnon cu adaos de 30 mM NaCl și de 10 mM NaHCO₃, conține cantități semnificative de pigmenți (clorofila a – 1,4%; caroten – 0,4%, c-ficoeritrină – 1,6%, c-ficocianină – 12,2% și aloficocianină – 5,4%) care reprezintă sursă de coloranți naturali, antioxidanți, vitamine etc. [7]. Cercetările menționate scot în evidență rezultatele obținute la cultivarea unei tulpini a algei *Anabaenopsis* sp. pe mediul de cultură Arnon, care însă este cu mult mai costisitor decât mediul Drew. De aceea, în prezenta lucrare ne-am propus drept scop să studiem procesul de creștere a algei *Anabaenopsis* sp. cultivate pe mediul de cultură Drew.

Material și metode

În experimente a fost antrenată tulpina algei *Anabaenopsis* sp. care se depozitează, în cultură pură, în colecția LCS „Algologie”. Alga *Anabaenopsis* sp. a fost cultivată, după metoda de cultivare periodică [8], pe mediul de cultură Drew, preparat pe baza apei distilate, cu următoarea componență (g/l): K₂HPO₄ – 0,2; MgSO₄×7H₂O – 0,2; CaCl₂ – urme; FeCl₃ – urme [9]. Mediul de cultură obținut a fost sterilizat prin metoda fizică. Cultivarea s-a efectuat în baloane Erlenmeyer cu volum de 250 ml. În calitate de inocul s-a utilizat alga *Anabaenopsis* sp. cultivată pe mediul lichid care se afla în faza exponențială de creștere, obținut conform metodologiei prezentate în [10]; densitatea culturii inoculate era de 0,4 g/l. Experiențele au demarat în condiții de laborator la temperatura de 28-30°C și la intensitatea luminii de 4000 lucși. Creșterea biomasei a fost determinată după formula: $(A_n - A_0)/n$, unde A_n – cantitatea de biomasă obținută peste n zile, A_0 – cantitatea inițială de biomasă, n – perioada analizată (zile). Productivitatea algală a fost stabilită conform procedeelelor propuse în [11]. Indicele pH-ului a fost stabilit cu ajutorul aparatului multifuncțional „Consort C944”. Calculul statistic al rezultatelor a fost efectuat utilizând programa STATISTICA-6, cu determinarea mediei aritmetice (M) și a erorii standarde (m). Experimentele au fost efectuate în 6 repetări.

Rezultate și discuții

După cum am menționat, mediul de cultură Drew are un avantaj economic în aplicare. Însă, pe lângă aceasta, considerăm că este incomplet, deoarece lipsesc multe microelemente, sursa de CO₂, Na etc., care contribuie la creșterea biomasei algale și la acumularea substanțelor biologic active în celule. Cantitatea biomasei algei *Anabaenopsis* sp. obținute la cultivarea pe mediul de cultură Drew este prezentată în Figura 1.

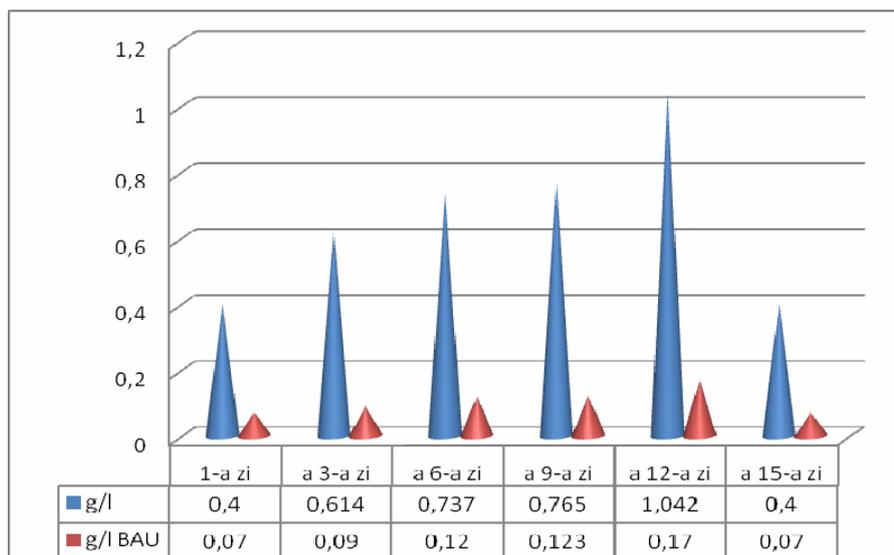


Fig.1. Productivitatea algei *Anabaenopsis* sp. cultivate pe mediul de cultură Drew.

Datele prezentate în Figura 1 atestă că biomasa algei crește până la a 12-a zi, atingând $1,042 \pm 0,05$ g/l, după care descrește până la valoarea inițială ($0,4 \pm 0,02$ g/l). Însă, această cantitate de biomasă obținută nu este suficientă și nu permite a utiliza acest mediu la cultivarea industrială a algei, dar el poate fi utilizat în formă solidă pentru menținerea algei *Anabaenopsis* sp. în colecția laboratorului.

Tabelul 1

Creșterea biomasei algei *Anabaenopsis* sp. în funcție de pH-ul și temperatura mediului de cultură

Perioada analizată, zile	Indicii examinați		
	temperatura mediului de cultură, °C M±m	pH-ul mediului de cultură M±m	creșterea biomasei, g/l/zi M±m
1	18,00±0,11	7,167±0,018	0
3	31,30±0,32	7,39±0,052	0,071±0,003
6	32,75±0,47	7,44±0,027	0,056±0,002
9	30,70±0,30	8,04±0,01	0,040±0,002
12	29,36±0,48	7,74±0,062	0,053±0,002
15	26,67±0,23	7,76±0,089	0

Datele prezentate în Tabelul 1 denotă că temperatura mediului de cultură este în creștere: inițial, temperatura era de $18,00 \pm 0,11$ °C, la a 6-a zi, de exemplu, atingea $32,75 \pm 0,47$ °C, iar la finele experimentelor se situa între $26,67 \pm 0,23$ °C, temperatură favorabilă pentru creșterea algei *Anabaenopsis* sp. pH-ul mediului de cultură crește până la a 9-a zi ($8,04 \pm 0,01$), după care se observă o descreștere lentă. Biomasa a crescut cel mai mult de la prima la a 3-a zi, fiind egală cu $0,071 \pm 0,003$, urmată de o creștere puțin mai redusă în intervalul 3-6 zile ($0,056 \pm 0,002$), iar după a 6-a zi se observă o descreștere, astfel că la a 15-a zi se reduce până la 0 (Tab.1). Analiza raportului pH:biomasă denotă că până la a 6-a zi odată cu creșterea biomasei se mărește și pH-ul. La a 9-a zi pH-ul crește, însă valorile creșterii biomasei se reduc, după care se observă oscilări ale pH-ului, iar indicele de creștere se reduce.

Importantă în demararea cultivării periodice este și determinarea fazelor de creștere, care ar indica, conform uneia dintre metodologii, timpul și cantitatea de biomasă obținută la cultivarea continuă a algei (unde se va realiza în flux continuu al fazelor liniare și de încetinire) (Fig.2).

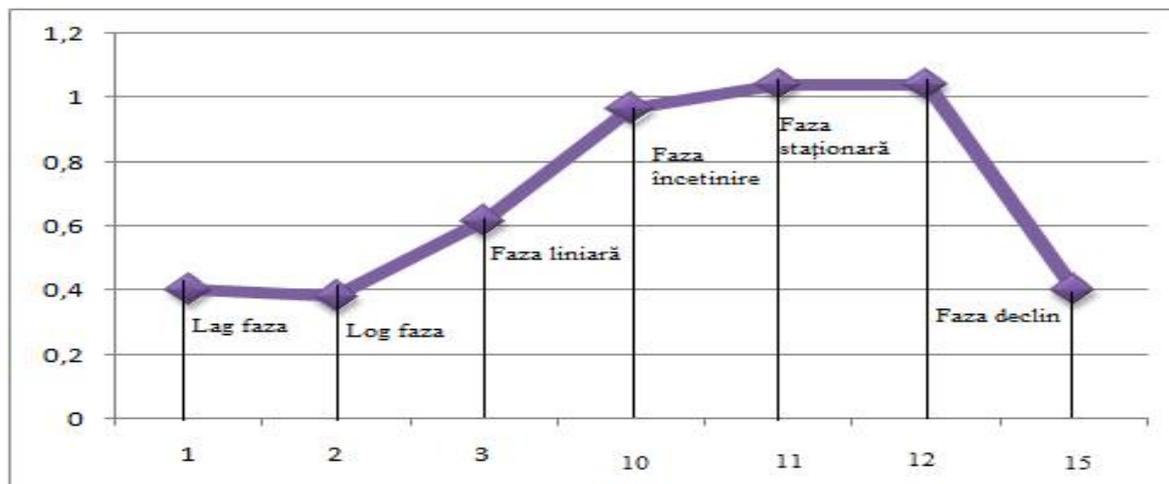


Fig.2. Fazele de creștere a algei *Anabaenopsis* sp. la cultivarea periodică pe mediul de cultură Drew.

Determinarea fazelor de creștere este destul de complicată, uneori este necesară stabilirea cantității de biomasă într-un interval de 2-24 ore sau de 24-168 ore, în funcție de faza de creștere, condițiile de temperatură, iluminare, agitare, conținutul mediului de cultură etc. La cultivarea algei *Anabaenopsis* sp. pe acest mediu durata fazelor a fost: lag – 1 zi, log – 1 zi, liniară – 7 zile, staționară – 1 zi, declin – 3 zile, datele fiind incluse în Figura 2.

Cea mai esențială caracteristică a creșterii microalgelor este viteza de creștere, care determină procesele de fotobiosinteză și depinde de viteza de sinteză a biomasei [10]. Viteza specifică de creștere diferă însă de la o fază la alta, fapt remarcat și de alți cercetători.

Tabelul 2

Caracteristica cinetică a creșterii algei *Anabaenopsis* sp. cultivate pe mediul de cultură Drew

Fazele de creștere	Cantitatea de biomasă, g/l	Productivitatea maximă, g/l ⁻¹	Viteza specifică de creștere, zile ⁻¹
Lag	0,38±0,01	-	-
Log	0,614±0,02	-	0,479±0,015
Liniară	0,965±0,03	0,050±0,002	0,010±0,004
Încetinire	1,04±0,05	0,038±0,0016	0,018±0,00085
Staționară	1,04±0,051	0	0
Declin	0,40±0,015	-0,213±0,012	-0,318±0,001

Conform metodologiei utilizate, pentru faza lag nu se indică modalitatea de determinare a vitezei specifice și a productivității maxime; aceasta se stabilește începând cu faza log. Valorile vitezei de creștere sunt cele mai înalte în cazul log fazei (0,479±0,015 zile⁻¹), deoarece se determină după un alt mod; pentru faza liniară are valori de 0,010±0,004 zile⁻¹, care sunt relativ mici, iar pentru cea de încetinire se atestă 0,018±0,00085 zile⁻¹. Același lucru este specific și pentru productivitatea maximă. În cazul fazei staționare viteza de creștere și productivitatea maximă este 0, iar în cazul fazei de declin cantitatea de biomasă se reduce substanțial, productivitatea maximă și viteza descresc (Tab.2). În urma rezultatelor obținute putem constata că există un raport direct dependent între viteza specifică de creștere și pH.

Concluzii

Alga *Anabaenopsis* sp. poate fi cultivată pe mediul Drew, însă aceasta permite obținerea a maximum 1,04±0,05 g/l în decursul a 11-12 zile, ceea ce este puțin pentru inițierea cultivării industriale, iar pentru

menținerea culturii în stare pură (pe mediul solid) este suficient. Timp de 15 zile alga cultivată pe mediul Drew parcurge toate fazele de creștere (începând de la log și terminând cu declin). pH-ul mediului este în raport direct proporțional cu viteza specifică de creștere și invers proporțional cu creșterea biomasei. Cele mai mari valori ale vitezei specifice a fazei liniare atingeau $0,010 \pm 0,004 \text{ zile}^{-1}$, ceea ce indică la faptul că creșterea algei este redusă și, respectiv, cantitatea de biomasă este mică.

Referințe:

1. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов. - Москва: Мир, 1978.
2. Гайсина Л.А., Фазлутдинова А.И., Кабиров Р.Р. Современные методы выделения и культивирования водорослей: Учебное пособие. - Уфа: Изд-во БГПУ, 2008.
3. Виноградова О.Н., Михайлюк Т.И. Альгофлора пещер и гротов национального природного парка «Подольские товтры» (Украина). – În: Материалы Второй Всероссийской научно-практической конференции «Водоросли: проблемы таксономии, экологии и использование в мониторинге», 2009, с.170-173.
4. Горчакова А.Ю. Водоросли почв остепненного склона «Николаевский», г. Саранск, Республика Мордовия. - În: Биология будущего: традиции и инновации, 2010, с.46-48.
5. Trofim A., Șalaru V., Dobrojan S. Rolul algelor *Cylindrospermum licheniforme f. alatosporum* (KONDRAT) și *Anabaenopsis sp.* în procesul de epurare a apelor reziduale de la complexele zootehnice. – În: Materialele Conferinței științifice naționale cu participare internațională „Probleme actuale ale microbiologiei și biotehnologiei”, 2009, p.178-179.
6. Moreno J., Rodriguez H., Vargas M., Rivas J., Guerrero M. Nitrogen-fixing cyanobacteria as source of phycobiliprotein pigments. Composition and growth performance of ten filamentous heterocystous strains // Journal of Applied Phycology, 1995, no.7, p.17 -23.
7. Rodriguez H., Rivas J., Guerrero M., Losada M. Nitrogen-fixing Cyanobacterium with a high phycoerythrin content. - In: Applied and Environmental Microbiology, 1989, p.758-760.
8. Тренкеншу Р.П. Простейшие модели роста микроводорослей. 1. Периодическая культура // Экология моря, 2005, вып.67, с.89-97.
9. Гайсина Л.А., Фазлутдинова А.И., Кабиров Р.Р. Современные методы выделения и культивирования водорослей: Учебное пособие. - Уфа: Изд-во БГПУ, 2008.
10. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов. - Москва: Мир, 1978.
11. Сиренко А., Сакевич А.И., Осипов Л.Ф., Лукина Л.Ф., Кузменко М.И., Козицкая В.Н., Величко И.М., Мыслович В.О., Гавриленко М.Я., Арендарчук В.В., Кирпенко Ю.А. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. - Киев: Наукова думка, 1975.

Notă: Lucrarea a fost elaborată în cadrul Proiectului 12.819.18.11A finanțat de către CSSDT al AȘM.

Prezentat la 24.06.2012

PARTICULARITĂȚILE DEZVOLTĂRII ALGOFLOREI BAZINELOR STAȚIEI DE EPURARE BIOLOGICĂ A APELOR MENAGERE DIN mun. CHIȘINĂU

Natalia DONȚU, Victor ȘALARU

Catedra Ecologie, Botanică și Silvicultură

During the 2009–2010 years in the ponds of the biological treatment station and in the Bâc river within the segment of the station, were detected 227 species. In the first year were identified 137 species and algal variations and in the next year – 220 species. In winter intensely were developed diatom algae, spring – species from *Euglenophyta* phylum, in the summer season – the green algae and the represents of *Xanthophyta* phylum, but in autumn – species from *Cyanophyta* and *Euglenophyta* phyla.

Introducere

Una dintre problemele protecției resurselor naturale este evitarea poluării bazinelor acvatice cu ape reziduale de cea mai diversă origine. Algele contribuie la utilizarea substanțelor poluante din apă. Epurarea biologică a apelor uzate cu ajutorul algelor este o metodă eficientă, folosită pe larg în ultimul timp [1-3]. De aceea, algoflora apelor reziduale a devenit un obiect de studiu de o importanță deosebită. Este cunoscut faptul că dezvoltarea algoflorei spontane în bazinele de epurare poate contribui la eliminarea elementelor poluante din apa reziduală [4,5] și, în final, poate modifica compoziția chimică a acestei ape [6,7]. Scopul lucrării noastre este de a evidenția speciile ce vegetează în bazinele Stației de epurare biologică din mun. Chișinău și de a stabili unele particularități ecologice ale speciilor dominante în scopul utilizării lor în procesul de epurare biologică a apelor poluate.

Material și metode

A fost studiată algoflora bazinelor Stației de epurare a apelor reziduale din mun. Chișinău. Probele au fost prelevate lunar în perioada anilor 2009–2010 din 7 puncte (deznisipatorul, decantorul primar, bazinul de aerare, nămolul activ utilizat în procesul de epurare, decantorul secundar și bioderma sa), precum și din sectorul râului Bâc în punctul de deversare a apelor reziduale deja epurate. Probele au fost prelucrate după metodele utilizate în algologia modernă. Analiza probelor sub formă fixată și vie s-a efectuat în Laboratorul de Cercetări Științifice „Algologia” din cadrul USM. Pentru fiecare specie în parte a fost calculat coeficientul de răspândire (în %) care ne arată în câte probe din numărul total de colectate ea a fost întâlnită.

Rezultate și discuții

În perioada investigațiilor în bazinele Stației de epurare și în râul Bâc au fost identificate 227 specii și variații de alge, dintre care: *Chlorophyta* – 84, *Cyanophyta* – 57, *Bacillariophyta* – 53, *Euglenophyta* – 28 și *Xanthophyta* – 5. În anul 2009 au fost depistate 137 specii și variații de alge (*Chlorophyta* – 31%, *Cyanophyta* – 27%, *Bacillariophyta* – 25%, *Euglenophyta* – 16%, *Xanthophyta* – 0,8%). În anul 2010 au fost depistate 220 specii, ceea ce se datorează în mare parte studierii algoflorei biodermei decantorului secundar, care în anul precedent nu a fost cercetat. Din cele 7 puncte de prelevare cea mai bogată din punct de vedere taxonomic a fost algoflora din apele sectorului râului Bâc – 156 specii, iar cel mai mic număr de specii (65 specii) a fost determinat în probele de nămol activ utilizat în procesul de epurare biologică din bazinele de aerare ale Stației. După efectivul numeric, cea mai bogată a fost algofloră în bioderma decantorului secundar, și anume: în luna septembrie 2010 – 45 specii și varietăți de alge, iar cel mai mic număr – în probele de nămol activ din lunile februarie și decembrie 2009 – câte 3 specii corespunzător.

Pe parcursul perioadei de cercetare au avut loc schimbări esențiale în componența algoflorei. Cea mai înaltă varietate de specii a fost în anul 2010 datorită dezvoltării intense a clorofitelor și cianofitelor (Fig.1).

Algele cianofite s-au dovedit a fi mai variate în anul 2010, numărul speciilor ajungând la 57, deci cu 20 taxoni mai mulți ca în anul 2009. Pe tot parcursul perioadei de cercetare au dominat speciile *Phormidium tenue*, *Synechocystis salina*, *Oscillatoria amphibia*, *Phormidium foveolarum*, *Mycrocystis aeruginosa*, *Dactylococcopsis elenkinii* al căror coeficient de răspândire a variat între 20 și 82%. Printr-un coeficient relativ înalt de răspândire (11-27%) s-au evidențiat și speciile *Dactylococcopsis elenkinii*, *D. planctonica*, *Oscillatoria brevis*.

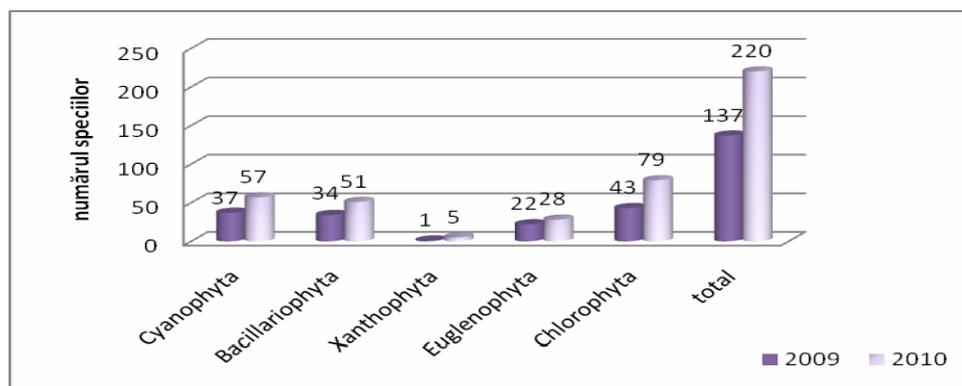


Fig.1. Numărul speciilor de alge din bazinele Stației de epurare din mun. Chișinău în decursul anilor 2009-2010.

În acești doi ani de cercetare filumul *Bacillariophyta* a fost prezentat de 53 specii. Cele mai des întâlnite au fost speciile *Navicula cryptocephala*, *Gomphonema parvulum*, *Hantzschia amphioxys*, *N. tryblionella*, *N. sigmoidea*, *N. hungarica* cu coeficientul de răspândire cuprins între 21 și 54%. Mai puțin intens s-au dezvoltat *Navicula vulpina*, *Melosira varians*, *Cyclotella Kuetzingiana* cu coeficientul de răspândire 7-0%.

În anul 2009 în apele decantorului secundar a fost identificată o specie de xantofite – *Chloridella neglecta*, iar în următorul an s-a constatat prezența deja a 5 specii (*Chloridella neglecta*, *Heterothrix debilis*, *Tribonema minus*, *T. viride*, *Tribonema* sp.); cel mai înalt coeficient de răspândire au avut speciile *T. viride* (4,5%) și *Chloridella neglecta* (3,2%).

Varietatea filumului *Euglenophyta* a constituit 28 specii, dintre care cele mai frecvent întâlnite au fost *Phacus curvicauda*, *Trachelomonas volvocina*, *T. oblonga*, *T. rotunda*, *Euglena polymorpha*, *E. viridis* ș.a., iar printre eugleninele cu răspândire mai redusă menționăm: *T. volvocina* var. *subglobosa*, *Euglena texta*, *E. acus*, *E. oxyuris*, *Lepocinclis acicularis* și *Phacus caudatus*. Cea mai înaltă varietate de euglenine (27 specii) au fost observate în bioderma decantorului secundar.

Diversitatea speciilor de alge din filumul *Chlorophyta* a constituit 43 specii în anul 2009 și 73 specii în anul 2010 cu predominarea în ambele cazuri a speciilor *Chlamydomonas Reinhardii*, *Chlorella vulgaris*, *Dyctiosphaerium pulchelum*, *Scenedesmus obliquus*, *S. ellipticus*, *S. obtusus*. cu coeficientul de răspândire între 35 și 77%. În anul 2010 intens s-au dezvoltat: *Dictyococcus mucosus*, *Monoraphidium contortum*, *Scenedesmus arcuatus*, *Ulothrix subtilissima*. Dintre acestea, cel mai înalt coeficient de răspândire au avut *Dictyococcus mucosus* (21,4%) și *Monoraphidium contortum* (12%). Unele specii de alge verzi au fost depistate numai în anul 2009 (*Pediastrum boryanum* var. *boryanum*, *Tetraedron caudatum*, *Monoraphidium irregulare*, *Ankistrodesmus falcatus*, *Scenedesmus parvus* și *S. Wisconsinensis*) cu coeficientul de răspândire cuprins între 1- 3%.

Structura taxonomică a algoflorei din bazinele cercetate se schimbă în dependență de perioada anului. Pe timp de iarnă în toate bazinele predominau algele bacilariofite, primăvara – eugleninele. Vara pe parcursul anilor de cercetare au dominat clorofitele, în temei cele din clasa clorococoficeelor (*Chlorococophyceae*), și xantofitele, iar toamna – cianofitele și unele euglenine.

În iarna anilor 2009 și 2010 au fost depistate 79 și, respectiv, 110 specii (Fig.2), dintre care algele verzi predomină în primul an, cianofitele și bacilariofite – în al doilea.

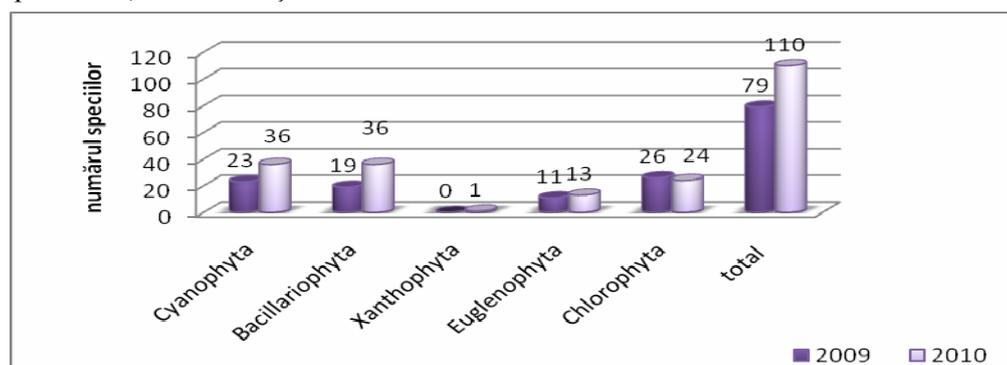


Fig.2. Numărul speciilor de alge din bazinele Stației de epurare din mun. Chișinău în anotimpul de iarnă.

În iarna anului 2009 filumul *Cyanophyta* a fost reprezentat de 23 specii, iar în următorul an numărul lor a crescut până la 36. Cu excepția algoflorei biodermei decantorului secundar, unde în acest anotimp s-au dezvoltat 29 specii și varietăți de alge cianofite, în celelalte bazine de epurare au fost detectate în medie 10-12 specii cu predominarea *Phormidium tenue*, *Ph. fragile*, *Ph. frigidum*, *Synechococcus elongatus*, *Oscillatoria bornetti* var. *tenuis*, *O. amphibia*, *O. rupicola*, *Synechocystis salina*, *Gloeocapsa magma*, cu un coeficient de răspândire destul de înalt (65–80%). Algele bacilariofite au fost detectate în număr de 36 specii și unități taxonomice intraspecifice. În sezonul de iarnă au dominat speciile *Navicula cryptocephala*, *N. pupula*, *N. vulpina*, *Gomphonema parvulum*, *Nitzschia hungarica*, *N. tryblionella*, *Melosira varians*, *Cyclotella menegheniana*. În bazinele trepte mecanice și biologice a Stației de epurare în această perioadă a anului diatomeele au fost prezentate în medie de 1-3 specii. În ultima treaptă de epurare numărul lor crește de 5-8 ori, valoarea maximală fiind stabilită în algoflora biodermei decantorului secundar (23 specii). Totodată, în proba de nămol nu au fost identificate specii de diatomee. Din xantofite au fost depistate filamente solitare doar ale unei singure specii – *Tribonema viride*, întâlnită în iarna anului 2010 în decantorul secundar. Numărul eugleninelor în această perioadă a anului variază de la 11 specii în anul 2009 până la 13 în anul 2010 cu predominarea speciilor *Euglena acus*, *Phacus curvicauda*, *P. caudatus* var. *tenuis*, *Trachelomonas hispida*, *T. planctonica* var. *longicollis*. Cea mai mare diversitate a lor a fost observată în bazinul de aerare – 7 specii (an. 2009) și în bioderma decantorului secundar – respectiv 8 specii (an. 2010). În celelalte bazine diversitatea lor nu a depășit 1-4 specii. În perioada de iarnă diversitatea clorofitelor se micșorează neînsemnat, de la 26 specii depistate în anul 2009 până la 24 evidențiate în anul 2010. Din rândul algelor verzi mai intensiv se dezvoltă așa specii ca *Chlamydomonas Reinhardii*, *Chlorella vulgaris*, *Oocystis solitaria*, *Dictyosphaerium pulchelum*, al căror coeficient de răspândire este destul de mic. Bazinele de cercetare din ultima treaptă de epurare se caracterizează printr-o diversitate de specii de 2–4 ori mai mare în comparație cu cele anterioare.

În rezultatul investigațiilor efectuate în perioada vernală au fost identificate, în total, 73 specii în anul 2009 și, respectiv, 120 specii în anul 2010. Majoritatea lor revine algelor verzi și celor albastre-verzi (Fig.3).

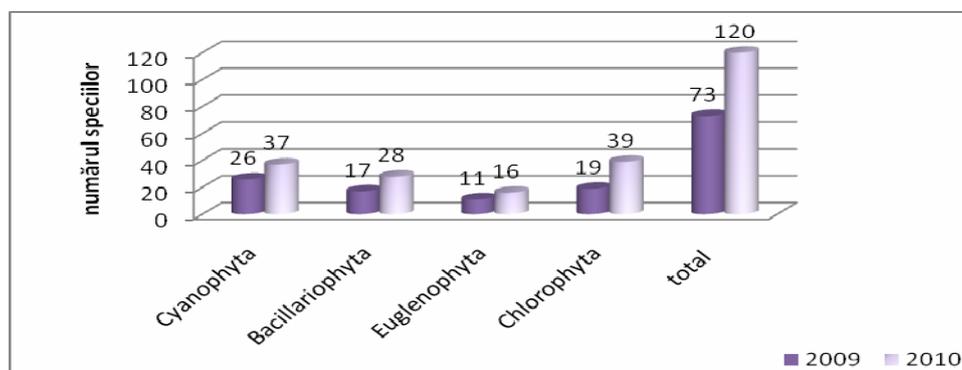


Fig.3. Numărul speciilor de alge din bazinele Stației de epurare din mun. Chișinău în sezonul de primăvară.

Perioada de primăvară se caracterizează prin prezența a 26 specii de cianofite în primul an de investigații și a 37 specii în anul 2010. Numărul lor crește practic de 1,4 ori. Și de această dată cel mai mare număr de cianofite au fost depistate în bioderma decantorului secundar (27), iar în celelalte bazine se dezvoltau doar câte 9–15 specii. Ca și în sezonul de iarnă, au predominat aceleași specii. Printr-un coeficient de răspândire mai înalt s-au evidențiat speciile *Synechocystis salina* și *Phormidium tenue*. Diatomeele au fost identificate în număr de 17 specii în anul 2009, iar în 2010 diversitatea lor a crescut de 1,6 ori (28 specii). În majoritatea bazinelor Stației de epurare în această perioadă a anului a fost depistat un număr mic de specii bacilariofite cu predominarea următoarelor: *Navicula cryptocephala*, *N. pupula*, *Pinnularia viridis*, *Hantzschia amphioxys*, *Nitzschia tryblionella*, *N. hungarica*, al căror coeficient de răspândire era destul de înalt și oscila în limitele 70–80%. Filumul *Euglenophyta* a fost prezent în anii de investigații 2009 și 2010 cu, respectiv, 11 și 16 specii și varietăți. Cu excepția biodermei decantorului secundar, unde s-au dezvoltat 13 specii euglenine, în toate bazinele cercetate ele s-au întâlnit sporadic. Cu un coeficient de răspândire mai înalt erau prezente speciile *Trachelomonas oblonga* var. *australiana*, *T. hispida*, *T. planctonica* var. *longicollis*. În anul 2010, diversitatea algelor verzi, în comparație cu primul an de cercetare, sporește de 2 ori – de la 19 la 39 de specii. Odată cu speciile care au dominat în sezonul de iarnă, primăvara intens s-au dezvoltat următoarele: *Dictyosphaerium*

pulchelum, *Ankistrodesmus arcuatus*, *Scenedesmus ellipticus*, *S. obliquus*. Un număr mai mare de clorofite se întâlnește în decantorul secundar și în sectorul r. Bâc în punctul de deversare a apelor din SEB.

În comparație cu perioada de iarnă și primăvară, vara numărul speciilor detectate crește. Respectiv, în anul 2009 au fost detectate 92 specii și în anul 2010 – 129 specii. Acest lucru se datorează, în primul rând, reprezentanților algelor din filumurile *Chlorophyta*, *Cyanophyta* și *Bacillariophyta* (Fig.4).

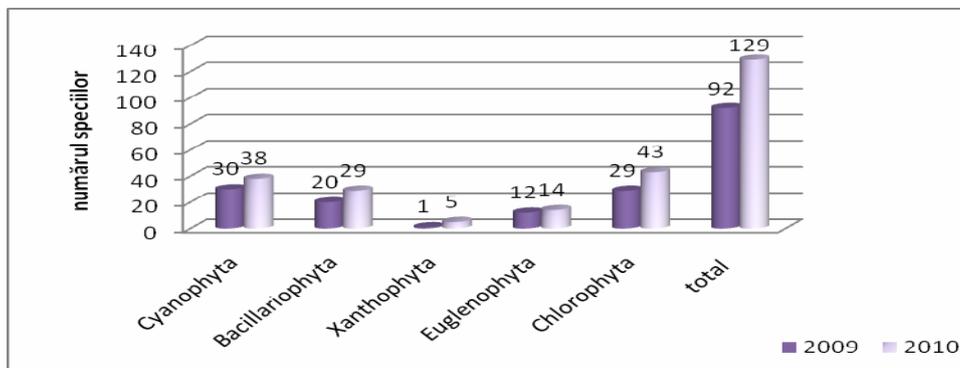


Fig.4. Numărul speciilor de alge din bazinele Stației de epurare din mun. Chișinău în sezonul de vară.

În ce privește numărul de specii de alge evidențiate în această perioadă a anului, în anul 2009 cianofitelor le revin 30 specii, iar în anul 2010 – 38 specii. În bazinele Stației de epurare cianofitele au fost întâlnite în număr de 14–17 specii (cu excepția biodermei decantorului secundar – 27 specii). La speciile care au dominat în anotimpurile precedente se alătură așa reprezentați din filumul *Cyanophyta*, ca: *Dactylococcopsis Elenkinii*, *D. planctonica*, *Lyngbya limnetica*, *L. Borodini*. Numărul speciilor diatomee în vara anului 2010 a crescut cu 9, față de cele 20 identificate în anul 2009. În acest anotimp intens s-au dezvoltat speciile *Navicula cryptocephala*, *N. vulpina*, *Hantzschia amphioxys*, *Nitzschia tryblionella*, *Pinnularia viridis* și *Gomphonema parvulum*. Numărul speciilor de euglenine a fost relativ stabil: 12 în anul 2009 și 14 în anul 2010. Din rândul reprezentanților filumului *Euglenophyta* intens s-au dezvoltat *Trachelomonas volvocina*, *T. oblonga*, *Lepocinclis Playfairiana* și *Phacus curvicauda*. Diversitatea xantofitelor nu este mare. Această încrângătură a fost prezentată de o specie în anul 2009 și de 5 specii în anul 2010, printre care figurează *Chloridella neglecta*, *Heterothrix debilis*, *T. minus*, *T. viride*, *Tribonema* sp.; specia *Chloridella neglecta* a fost întâlnită în primul an de investigații în apele decantorului secundar. Algele verzi au fost prezente în vara anului 2009 cu 29 specii și în aceeași perioadă a anului 2010 diversitatea lor a crescut până la 43 specii. Mai frecvent s-au întâlnit reprezentanții genurilor *Scenedesmus* și *Monoraphidium*, printre care putem nominaliza speciile *Scenedesmus falcatus*, *S. acutus*, *S. quadricauda*, *S. obtusus*, *Monoraphidium tortile*, *M. griffithii*. Sectorul râului Bâc se caracterizează prin cel mai mare număr de specii de clorofite – 28 specii, evidențiate în anul 2010. Cea mai mică diversitate a speciilor din acest filum (5 specii) a fost stabilită în probele de nămol activ colectate în anul 2009.

Din cele expuse reiese că vara numărul total de specii crește în toate bazinele cercetate – legitate comună, cu mici excepții, pentru toate celelalte filumuri.

În rezultatul cercetărilor efectuate s-a stabilit că cea mai bogată algofloră este caracteristică perioadei de toamnă (Fig.5). Analiza probelor colectate ne-a permis să evidențiem 107 specii în anul 2009 și 132 specii în anul 2010.

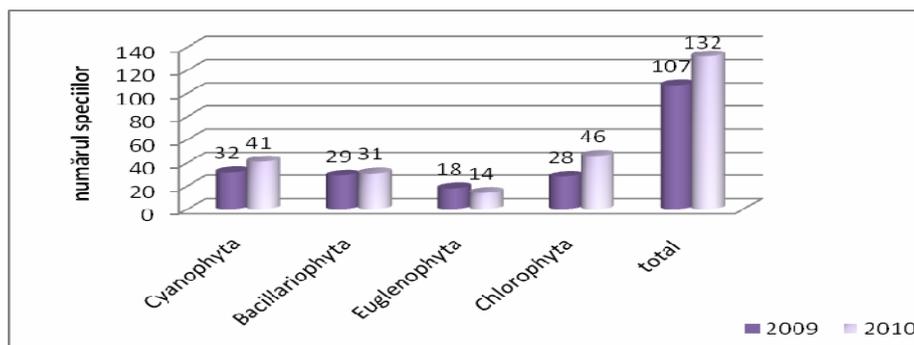


Fig.5. Numărul speciilor de alge în bazinele Stației de epurare din mun. Chișinău în sezonul de toamnă.

În acest anotimp a fost stabilită valoarea maximală a diversității algelor cianofite. Din acest filum în anul 2009 au fost identificate 32 specii și variații, iar în 2010 – 41 specii. Abundent s-au dezvoltat reprezentanții genurilor *Oscillatoria* și *Phormidium* (*Oscillatoria rupicola*, *O. willei*, *O. amphibia*, *O. brevis*, *Phormidium tenue*, *Ph. fragile*), precum și *Mycrocystis aeruginosa*, *Synechocystis salina* ș.a. Din cadrul filumului *Bacillariophyta* a fost stabilită prezența a 29 și 31 specii, respectiv, în anii 2009 și 2010. Cu un coeficient înalt de răspândire în acest anotimp al anului se caracterizează speciile *Navicula cryptocephala*, *N. vulpina*, *Hantzschia amphioxys*, *Nitzschia tryblionella* ș.a. Datorită creșterii cantității de substanțe organice aduse cu apele pluviale de pe terenurile adiacente, crește numărul speciilor euglenine, mai ales în toamna anului 2009, când a fost depistată prezența a 18 specii de alge. Numărul maximal de euglenine a fost observat în decantorul secundar – 7 specii și varietăți de alge. Predominau speciile *Trachelomonas oblonga* var. *australiana*, *T. hispida*, *T. planctonica* var. *longicollis*, *Phacus arnoldii* var. *ovatus*, *Euglena polymorpha*. Toamna anului 2010 se caracterizează prin cea mai mare diversitate de clorofite (46 specii) în comparație cu perioadele de iarnă, primăvară și vară evidențiate pe parcursul celor doi ani de investigații. Totodată, se poate spune că, în comparație cu toamna anului 2009, în anul 2010 numărul algelor verzi practic se dublează. Predomină speciile comune sezonelor anterior analizate.

În rezultatul cercetărilor efectuate în general s-a observat că unele specii se dezvoltă în măsură egală pe parcursul întregii perioade de investigații (*Synechocystis salina*, *Phormidium tenue*, *Navicula cryptocephala*, *Hantzschia amphioxys*, *Nitzschia tryblionella*, *Chlamydomonas reinhardii*, *Chlorella vulgaris*, *Oocystis solitaria*, *Dictyosphaerium pulchellum*).

În același timp, am stabilit că unele specii de alge preferă o anumită perioadă a anului. De exemplu, numai iarna au vegetat activ speciile *Synechocystis minima*, *Gloeocapsa turgida* v. *quaternaria*, *Nostoc linkia*, *Gomphonema angustatum* v. *productum*, *Fragilaria brevistriata*, *Euglena oxyuris*, *Scenedesmus wisconsinensis*. Doar în timpul primăverii au fost detectate speciile *Spirulina platensis*, *Lynghya stagnina*, *Pinnularia viridis* var. *clevei*, *Fragilaria capucina* v. *lanceolata*, *F. intermedia*, *Surirella linearis* v. *constricta*, *Lepocinlis acicularis*, *Treubaria crassispina*, *Coenonochloris ovalis*, *Tetraedron triangulare*, *Closteriopsis acicularis*, *Ankistrodesmus fuffiformis*, *Crucigenia tetrapedia*, *Scenedesmus incrassatulus*, *S. magnus* v. *magnus*. Exclusiv în sezonul de vară au fost prezente speciile *Gloeocapsa minor*, *Anabaenopsis Elenkinii*, *Oscillatoria lacustris*, *Cocconeis pediculus*, *Cymbella ventricosa*, *Chloridella neglecta*, *Heterothrix debilis*, *Tribonema minus*, *Tetraedron caudatum*, *Monoraphidium irregulare*, *Chlorococcum infusionum*, *Characium ornithocephalum* v. *pringsheimii*, *Pediastrum simplex*, *Coenocystis subcilindrica*, *Siderocystopsis fusca*, *Tetrastrum staurogeniaforme*, *Scenedesmus acutiformis* v. *acutiformis*, *Ulothrix subtilissima*. Specific pentru toamnă au fost speciile *Mycrocystis pulvereae*, *Merismopedia major*, *Oscillatoria Kisselevii*, *Cymbella prostrata*, *Nitzschia linearis*, *N. Kuetzingiana*, *Heleochloris pallida*, *Schroederia robusta*, *Pediastrum boryanum*, *Tetraedron minimum*, *T. incus*, *Lagerheimia marsonii*, *Coelastrum pseudomicroporum*, *Scenedesmus apiculatus* v. *apiculatus*, *S. insignis*, *S. subspicatus*.

Concluzii

În anul 2009 în bazinele Stației de epurare și în sectorul râului Bâc în total au fost detectate 137 specii, iar în anul 2010 algoflora s-a dovedit a fi mai bogată cu 83 specii (220).

Cea mai bogată algofloră din punct de vedere taxonomic a fost cea din apele sectorului râului Bâc – 156 specii, iar cel mai mic număr de specii (65 specii) a fost determinat în probele de nămol activ utilizat în procesul de epurare biologică din bazinele de aerare ale Stației.

Pe timp de iarnă în toate bazinele analizate predomină algele bacilariofite, primăvara – eugleninele. Vara pe parcursul anilor de cercetare au dominat clorofitele, în temei cele din clasa clorococcificeelor (*Chlorococcophyceae*), și xantofitele, iar toamna – cianofitele și unele specii de euglenine.

Lista speciilor detectate în bazinele Stației de epurare: *Synechocystis parvula* Perf., *S. salina* Wisl., *S. minima* Woronich., *Synechococcus elongatus* Næg., *Dactylococcopsis elenkinii* Roll., *D. planctonica* Teiling, *Merismopedia glauca* (Echr.) Næg., *M. major* (Smith.) Geitl., *Mycrocystis aeruginosa* Kütz. emend Elenk., *M. pulvereae* (Wood) Forti emend Elenk., *Gloeocapsa magma* (Bréb) Kütz emend Hollerb., *G. turgida* (Kütz.) Hollerb. emend v. *quaternaria* (Zalesky) Hollerb., *G. minor* (Kütz.) Hollerb. ampl., *Nostoc linkia* (Roth.) Born. Et Flag., *Nostoc* sp., *Anabaenopsis Elenkinii* V. Miller, *Anabaenopsis* sp., *Oscillatoria bornetti* (Zukal) Forti var. *tenuis* Skuja., *O. subtilissima* Kütz., *O. Kisselevii* Anissim., *O. Willei* Gardn., *O. putrida*

Schmidle, *O. lacustris* (Kleb.) Geitl., *O. planctonica* Wolosz., *O. jatorvensis* Vouk., *O. irrigua* (Kütz.) Gom., *O. rupicola* Hansg., *O. simplicissima* Gom., *O. chalybea* (Mert.) Gom., *O. amphibia* Ag., *O. amphibia* Ag. f. *tenuis* (Anissim.) Elenk., *O. geminata* (Menegh.) Gom., *O. limnetica* Lemm., *O. granulata* Gardner., *O. brevis* (Kütz.) Gom., *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl., *S. laxissima* G.S. West., *S. major* Kütz., *Phormidium angustissimum* W. et G. S. West., *Ph. frigidum* F.E. Fritsch., *Ph. foveolarum* (Mont.) Gom., *Ph. mucicola* Hub. Pestalozzi et Naum., *Ph. fragile* (Menegh.) Gom., *Ph. molle* (Kütz.) Gom., *Ph. tenue* (Menegh.) Gom., *Ph. Bohneri* Schmidle., *Ph. orientale* G. S. West., *Lyngbya epiphytica* Hieron., *L. Lagerheimii* (Möb.) Gom., *L. Borodini* Kongiss., *L. limnetica* Lemm., *L. cryptovaginata* Schkorb., *L. Kossinkajae* Elenk., *L. Diguettii* Gom., *L. stagnina* Kütz., *L. lutea* Ag. (Gom.), *Lyngbya* sp., *Melosira varians* Ag., *M. distans* (Ehr.) Kütz. v. *lirata* (Ehr.) Bethge, *Cyclotella Kuetzingiana* Thw., *C. Meneghiniana* Kütz., *C. stelligera* Cl. et Grun., *Fragilaria capucina* Desm. v. *lanceolata* Grun., *F. intermedia* Grun., *F. virescens* Ralfs., *F. pinnata* Ehr., *F. brevistriata* Grun., *Synedra ulna* (Nitzsch.) Ehr., *S. acus* Kütz., *S. rumpens* Kütz., *Cocconeis pediculus* Ehr., *Achnanthes conspicua* A. Mayer., *Rhoicosphenia curvata* (Kütz.) Grun., *Navicula pupula* Kütz., *N. cryptocephala* Kütz., *N. cryptocephala* Kütz. var. *intermedia* Grun., *N. cryptocephala* Kütz. var. *veneta* (Kütz.) Grun., *N. cryptocephala* Kütz. var. *hankensis* Skv., *N. cryptocephala* Kütz. var. *angusta* Boye P., *N. rynchocephala* Kütz., *N. rynchocephala* Kütz. var. *hankensis* Skv., *N. vulpina* Kütz., *N. hungarica* Grun. var. *lueneburgensis* Grun., *Navicula* sp., *Pinnularia appendiculata* (Ag.) Cl., *P. interrupta* W. Sm., *P. viridis* (Nitzsch.) Ehr., *P. viridis* (Nitzsch.) Ehr. var. *Clevei* Meist., *Cymbella prostrata* (Berk.) Cl., *C. ventricosa* Kütz., *C. lanceolata* (Ehr.) V.H., *Cymbella* sp., *Gomphonema parvulum* (Kütz.) Grun., *G. parvulum* (Kütz.) Grun. var. *lagenulum* (Kütz. Grun.) Hust., *G. angustatum* (Kütz.) Rabenh., *G. angustatum* (Kütz.) Rabenh. var. *liniare* Hust., *G. angustatum* (Kütz.) Rabenh. v. *productum* Grun., *Hantzschia amphioxys* (Ehr.) Grun., *Nitzschia tryblionella* Hantzsch., *N. tryblionella* Hantzsch. v. *levidensis* (W. Sm.) Grun., *N. hungarica* Grun., *N. angustata* (W. Sm.) Grun., *N. linearis* W. Sm., *N. palea* (Kütz.) W. Sm., *N. Kuetzingiana* Hilse, *N. sigmoidea* (Ehr.) W. Sm., *Nitzschia* sp., *Surirella biseriata* Bréb., *S. linearis* W. Sm., *S. linearis* W. Sm. v. *constricta* (Ehr.) Grun., *Chloridella neglecta* (Pasch. et Geitl.), *Heterothrix debilis* Visch., *Tribonema minus* Hazen., *T. viride* Pasch., *Tribonema* sp., *Trachelomonas volvocina* Ehr., *T. volvocina* Ehr. var. *subglobosa* Lemm sens Swir., *T. Arnoldii* Roll., *T. verrucosa* Stokes., *T. oblonga* Lemm., *T. oblonga* Lemm var. *australiana* Playf., *T. rotunda* Swir., *T. hispida* (Perty) Stein emend Defl., *T. teres* Mask, *T. planctonica* Swir. var. *longicollis* Skv., *Euglena viridis* Ehr., *E. polymorpha* Dang., *E. texta* (Duj) Hubner, *E. acus* Ehr., *E. oxyuris* Schmarda, *Euglena* sp., *Lepocinclis Playfairiana* Defl., *L. acicularis* France, *Lepocinclis* sp., *Phacus agilis* Skuja., *P. curvicauda* Swir., *P. Arnoldii* Swir. var. *ovatus* Popova, *P. Stokesii* Lemm., *P. caudatus* Hübner, *P. caudatus* Hübner var. *tenuis* Swir., *P. caudatus* Hübner var. *volicensis* Drež., *P. lismorensis* Playf., *Astasia sagittifera* Skuja., *Chlamydomonas globosa* Snow., *C. Reinhardii* Dang., *C. Westiana* Pasch., *Chlorococcum infusionum* (Schränk) Menegh., *Dictyococcus mucosus* Korschik., *Heleochloris pallida* Korsch., *H. conica* Korsch., *Characium ornithocephalum* A. Brown v. *pringsheimii* (A.Br.) Komarek, *Schroederia robusta* Korsch., *Treubaria crassispira* G.M. Smith., *Pediastrum simplex* Meyen., *P. boryanum* (Turp.) Menegh. var. *boryanum*, *P. tetras* (Ehrenb.) Ralfs., *Pediastrum* sp., *Golenkinia radiata* Chodat., *Golenkiniopsis longispina* (Korschik.) Korschik., *Dictyosphaerium pulchellum* Wood., *Coenococcus planctonicus* Korschikoff, *Coenocystis subcilindrica* Korsch., *Coenonochloris fottii* (Hind.) Tzar., *C. ovalis* Korsch., *Chlorella vulgaris* Beijer., *Tetraedron triangulare* Korschikoff, *T. minimum* (A.Br.) Hansgirg., *T. incus* (Teiling) G.M. Smith, *T. caudatum* (Corda.) Hansgirg., *Tetraedron* sp., *Siderocystopsis fusca* (Korsch.) Swale, *Lagerheimia marssonii* Lemm., *Oocystis solitaria* Wittrack., *Closteriopsis acicularis* (G.M. Smith) Belcher et Swale, *Monoraphidium komarkovae* Nygaard., *M. tortile* (W. et G. S. West.) Komarkova – Legnerova, *M. griffithii* (Berk.) Komarkova – Legnerova, *M. arcuatum* (Korsch.) Hindák., *M. minutum* (Näg.) Komarkova – Legnerová, *M. contortum* (Thur.) Komarkova – Legnerová, *M. irregulare* (G. M. Smith) Komarkova – Legnerová, *Kirchneriella obesa* (W. West.) Schmidle, *K. lunaris* (Kirchn.) Möbius, *Ankistrodesmus fusiiformis* Corda ex Korschikoff, *A. falcatus* (Corda.) Ralfs., *A. spiralis* (Turn.) Lemm., *A. gracilis* (Reinsch.) Korsch., *Hyaloraphidium contortum* Pascher et Korschik. var. *tenuissimum* Korschik., *Coelastrum microporum* Nägeli., *C. pseudomicroporum* Korschik., *C. spaericum* Nägeli., *C. indicum* Turner, *Crucigenia tetrapedia* (Kirchn.) W. et G.S. West, *C. rectangularis* (Näg.) Gay., *Tetrastrum triangulare* (Chod.) Komarek, *T. triacanthum* Korschik., *T. staurogeniaforme* (Schrod.) Lemm., *Scenedesmus obliquus* (Turp.) Kütz., *S. acutus* Meyen., *S. acuminatus* (Lagerh.) Chodat., *S. acuminatus* (Lagerh.) Chodat. v. *acuminatus*, *S. falcatus* Chodat., *S. incrassatulus* Bohlin, *S. acutiformis* Schröder. v. *acutiformis*, *S. ellipticus* Corda., *S. parvus* (G. M. Smith.) Bourrelly et Manguin., *S. obtusus*

Meyen., *S. arcuatus* (Lemm.) Lemm., *S. apiculatus* (W et G.S. West) Chodat v. *apiculatus*, *S. apiculatus* (W. et G.S. West.) Chodat. var. *indigus* (Hortob.) Hortob., *S. denticulatus* Lagerh. var. *linearis* Hansg., *S. spicatus* W. et G. S. West., *S. subspicatus* Chod., *S. bicaudatus* Dedussenko, *S. caudato – aculeolatus* Chod. v. *caudato – aculeolatus*, *S. insignis* (W. et G.S. West.) Chod., *S. spinosum* Chod., *S. gutwinskii* Chod., *S. quadricauda* (Turp.) Brèbisson., *S. magnus* Meyen v. *magnus*, *S. wisconsiensis* (G. M. Smith.) Chodat., *Scenedesmus* sp., *Ulothrix subtilissima* Kabenh., *Ulothrix* sp., *Oedogonium* sp., *Chaetomorpha* sp., *Cosmarium* sp.

Referințe:

1. Зайченко Е.А. Альгофлора сточных вод сахарных заводов и ее сезонная динамика. - În: Самоочищение, биопродуктивность и охрана водоемов и водотоков Украины. – Киев: Наукова думка, 1975, с.92.
2. Zerhouni R., Bouya D., Ronneau C., Cara J. Étude de l'absorbition des phosphates, azotes chrome et cadmium par trois algues vertes isolees a partir deffluenses urbains // Revue des Sciences de l'eau, 2004, no.17/3, p.317-328.
3. Mălăcea I. Biologia apelor impurificate.- București, 1974, p.43.
4. Денисов Д.Б., Кашулин Н.А., Терентьев П.М., Валькова С.А. Современные тенденции изменения биоты пресноводных экосистем Мурманской области // Вестник МГТУ, т.12, 2009, №3, с.525-538.
5. Горбунова С.Ю., Боровков А.Б., Пренкеншу Р.П. Математическая модель биологической системы по очистке сточных вод // Экология моря, 2008, выпуск 76, с.81- 85.
6. Mikhailiuk T.S., Popova A. F., Keinp R.B., Dubinsky Z. The effect of anthropogenic pollution on the Kanev reservoir (Ukraine) phythoplankton. 1. phythoplankton dynamics at stations with different levels of pollution // Algology, 2008, vol.18, no.1, p.37-49.
7. Оспанова Ж.Х., Хантурин М.Р. Фиторемедиация нефтезагрязненной сточной воды // Вестник ОГУ, 2010, №12, (118), с.74-77.

Prezentat la 27.04.2012

**КАШТАНОВАЯ МОЛЬ *Cameraria ohridella* Desch. and Dim. (Lepidoptera:
Gracillariidae) – ОПАСНЫЙ ВРЕДИТЕЛЬ КАШТАНА ОБЫКНОВЕННОГО
Aesculus hippocastanum L. (Hippocastanaceae)**

Aidaross NASSER NASR NAJI

University of Aden Yemen

Feromonul moliei castanului *Cameraria ohridella* – trimethyl [(1E,8E,10Z)-tetradeca-1,8,10-trienyloxy] silane este cel mai atractiv în doza de 3mg pe parcursul a 30 de zile. Tratatamentul dublu al pomilor de castan cu preparatul *Lufox 105 EC*, în doză de 1L/ha, reduce cu 86,7% populația moliei castanului *Cameraria ohridella*.

Pheromone chestnut moth *Cameraria ohridella* chestnuts – trimethyl [(1E, 8E, 10Z)-tetradeca-1,8,10-trienyloxy] silane is the most attractive dose of 3 mg over 30 days. Double treatment of chestnut trees with the preparation *Lufox 105 EC*. in the dose 1L/ha against chestnut moth *Cameraria ohridella* reduced population by 86.7%.

Введение

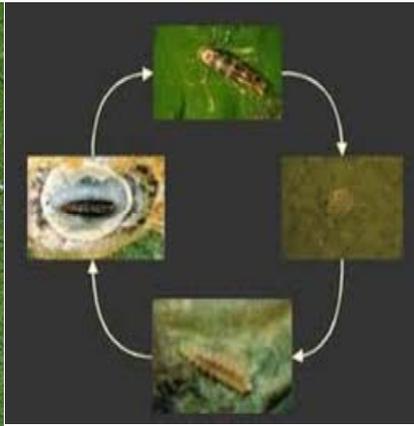
Каштан конский (обыкновенный) *Aesculus hippocastanum*, сохраняющий свою декоративность в течение всего вегетационного периода, – превосходное дерево для посадки на улицах, бульварах, аллеях садов и парков. В этих целях его культивируют в зоне умеренного климата практически во всех европейских странах. В природе каштан обыкновенный произрастает на небольшой территории в горах на Балканах (на севере Греции, Албании, Республики Македонии, Сербии и Болгарии) в листовенных лесах наряду с ольхой, ясенем, клёном, грабом, липой, буком и другими древесными породами, поднимаясь в горы до высоты 1 000-1 200 м над уровнем моря. Встречается в горных районах Ирана и в предгорьях Гималаев. Долговечен (при благоприятных условиях достигает возраста 200-300 лет). Почти не повреждается насекомыми [1,2,3,9]. Однако за последние десять лет каштан повсеместно стал сильно повреждаться молью минёром *Cameraria ohridella*, которая может вызвать полную дефолиацию деревьев, повторное их отрастание и даже осеннее цветение (фото 6). Полная дефолиация деревьев каштана в течение 4-5 лет подряд, осложненная болезнями (гриб *Guignardia aesculi*), может вызвать их полное усыхание [11,12,14]. Это насекомое трофически связано с рядом широколиственных деревьев – некоторыми видами конского каштана и клёна, а также с девичьим виноградом пятилисточковым. Моль встречается всюду, где произрастают её кормовые растения, например, в парках, на обочинах дорог и в городских зелёных насаждениях [1,3].

Имаго минёра *Cameraria ohridella* (фото 1) были отмечены в начале 80-х годов в окрестностях Охридского озера в Македонии. Впервые *Deschka* и *N. Dimic* как новый вид были описаны в 1986 году. В 1996 году Skuhravy [1,3] впервые отметил вредоносность вида, описав полную дефолиацию каштановых посадок в районе монастыря Пиллон (Центральная Греция). Проведенное в 2001-2003 годах картирование в рамках проекта CONTROCAM показало быстрое распространение вредителя на европейском континенте: 1993 – Сербия, 1994 – Венгрия и Германия, 1996 – Австрия, 1997 – Словения, Словакия, 1998 – Италия, Чехия, Швеция, Польша, Голландия, 2000 – Бельгия, Болгария, 2002 – Франция, 2003 – Украина [8]. И уже к 2009 году вредитель практически заселил все посадки каштана на территории всех европейских стран. (*Cameraria ohridella*. Distribution map. Сайт cabi.org: Distribution Maps of Plant Pests, 17 сентября 2011).

В Молдове, где мы проводили свои исследования совместно с сотрудниками Института защиты растений АН Молдовы, каштан конский (обыкновенный) *Aesculus hippocastanum* выращивается как декоративное растение в парках, вдоль улиц городов и автодорог. Начиная с 2004 года посадки каштана в г. Кишиневе подвергаются нападению моли минёра *Cameraria ohridella* Desch. and Dim. Вредитель быстро распространился по республике, и к 2006 году практически все насаждения каштана обыкновенного во всех районах были им заселены [10,11,13]. Быстрому распространению вредителя способствуют благоприятные климатические условия и отсутствие энтомофагов и хищников в новых регионах его проникновения.



1



2



3



4



5



6



7



8



9

Фото 1 – имаго каштановой моли; фото 2 – цикл развития минёра; фото 3,4,5,6 – различная степень повреждения листьев каштана минёром; фото 7,8 – феромонные ловушки; фото 9 – инъекция инсектицида в ствол каштана

В зависимости от зоны локализации и температурных данных, минёр может развиваться в 3-5 на-слаивающихся одна на другую генерациях. Строго ограниченной является только первая (перезимо-вавшая) генерация. После первой декады июня последующие генерации на-слаиваются и параллельно

можно обнаружить яйца, гусениц, куколок и имаго [6,7,8,9]. Бабочка минёра небольших размеров, 6-7 мм в размахе крыльев, передние крылья красно-оранжевые с металлическим отливом, с белыми поперечными полосками. Задние крылья пепельного цвета, обрамлённые. Яйца откладывает с внутренней стороны листа, между жилками, мелкие. Гусеница без конечностей, дорзо-вентрально сжатая, с коричневатой головой и бледно-зелёным корпусом. Питаются гусеницы мезофилом, сохраняя оба эпидермальных слоя листа, образуя мину, которая с ростом гусеницы увеличивается, приобретая овально-удлиненную форму. При большой численности мины соединяются и почти покрывают весь лист (фото 3,4). Листья при этом буреют, усыхают и опадают. Окукливание происходит в минах, куколка рыжевато-коричневая (фото 2). Во второй половине лета крона дерева может выглядеть как поздней осенью ввиду поражения листьев минами (фото-4,5,6). Последствия дефолиации приводят к снижению фотосинтеза, что препятствует вызреванию молодых побегов и ветвей, которые легко вымерзают при холоде и усыхают при засухе, затем отмирают более крупные ветви, а потом и дерево в целом [6,8,9,11]. Основные меры борьбы сводятся к своевременной уборке и уничтожению опавших листьев, в которых сохраняется основная масса куколок, а иногда и неокуклившихся гусениц, и к обработке деревьев химическими препаратами, разрешёнными к применению в населенных пунктах. С 2002 года, в связи с синтезом полового феромона (8E,10Z)-8,10-tetradecadienal; trimethyl [(1E,8E,10Z)-tetradeca-1,8,10-trienyloxy] silane, появилась возможность следить за развитием вредителя и вести непосредственную регуляцию его численности и путем массового отлова самцов [5,6,7,9,12,14] феромонными ловушками (фото 7,8). М.М. Бабидорич [13] отмечает, что польские исследователи разработали метод инъекции химических препаратов в ствол дерева (фото 9), однако данный метод оказался сложным в применении и дорогостоящим. Украинские исследователи [14] предложили проводить 1-2 профилактических обработки деревьев препаратом Люфокс 105 ЕС (75г/л ювеноид-феноксикарба и 25 г/л ингибитора синтеза хитина – люфенурана). В условиях Приднестровья О.В. Антюхова [12] использовала против каштановой минирующей моли ингибитор синтеза хитина – Номолт КС (150 г/л) при норме расхода 0,2 л/га, или неоникотиноид Имидор ВРК (200 г/л) при норме расхода 0,3 л/га. Первую обработку путем опрыскивания стволов и листьев конского каштана она проводила в первой декаде мая, в период массового лёта бабочек и интенсивной кладки яиц вредителем первой генерации. Удаление листвы и перекапывание приствольных кругов декоративных пород, как приемы борьбы с минирующими молями, необходимо проводить в течение всего года.

Перед нами стояла задача уточнить оптимальные дозы синтетического полового феромона каштановой моли *Cameraria ohridella* – trimethyl [(1E,8E,10Z)-tetradeca-1,8,10-trienyloxy] silane, уточнить сроки лёта бабочек каштановой моли в Центральной зоне Молдовы и изучить эффективность обработки деревьев каштана препаратом Люфокс 105 ЕС в борьбе с каштановой молью.

Материалы и методы

Объектом исследования были половой феромон каштановой моли *Cameraria ohridella* – trimethyl [(1E,8E,10Z)-tetradeca-1,8,10-trienyloxy] silane, синтезированный в Институте защиты растений и экологического земледелия АН Молдовы, в дозе 1 мг и 3 мг на диспенсер (каучуковые пробки) и препарат Люфокс. Тестирование феромона проводили на каштанах, высаженных в парковой зоне Института генетики АН Молдовы. В опытах использовали ловушки открытого типа (лист тетрапака 21 x 36 см, смазанный незасыхающим клеем), которые вывешивали на стволах или ветвях каштана на высоте 2,5 м от почвы, на расстоянии 20-30 м между ними. Для каждой дозы использовали по 3 ловушки. Учеты отловленных бабочек проводили один раз в 5 дней до прекращения отлова. Феромонные испарители заменяли через 30 дней, а клеевую поверхность ловушки – по мере загрязнения, но не реже чем один раз в 10 дней. Препарат Люфокс в дозе 1л/га наносили с помощью ручного опрыскивателя «Росинка». Норма расход рабочего раствора составляла 2-3 л на дерево.

Результаты исследований

В наших исследованиях феромонные ловушки были вывешены 03.05.2010, до начала цветения каштанов. Результаты отлова бабочек феромонными ловушками, в пересчёте на одну ловушку, отображены на рис.1. Отлов первых бабочек феромонными ловушками отмечен 09.05.2010, а к 10.05.2010, к началу учетов, он уже составил 11 особей для ловушек с 1 мг феромона и 24 особи для ловушек с 3 мг. На ловушках с дозой феромона в 1 мг за весь период вегетации каштана отлов варьировал от 11

до 258 особей и длился непрерывно, со спадами и подъемами, до конца сентября. На ловушках с дозой в 3 мг число отловленных бабочек колебалось от 12 до 1167 особей, и отлов завершился к 10 октября. Анализ кривых динамики отлова бабочек показал, что в Центральной зоне Молдовы в условиях 2010 года лёта бабочек происходил непрерывно с первой декады мая по вторую декаду октября (около 150 дней) с 4-мя выраженными пиками: 20-30.05.2010 – 240-325 самцов/ловушку; 15-25.06.2010 – 493-735 самцов/ловушку; 15-25.07.2010 – 798-872 самца/ловушку; 15-25.08.2010 – 913-1161 самец/ловушку. Это, по-видимому, свидетельствует о развитии 4-х генераций вредителя и довольно высокой его численности. Для окончательного решения данного вопроса необходимо в будущих исследованиях проводить анализ продолжительности развития вредителя на стадиях яйцо–гусеница – куколка. Следует отметить, что феромонные ловушки являются довольно удобным инструментом для слежения за развитием данного вредителя. Возможно, их целесообразно будет использовать для массового отлова самцов.

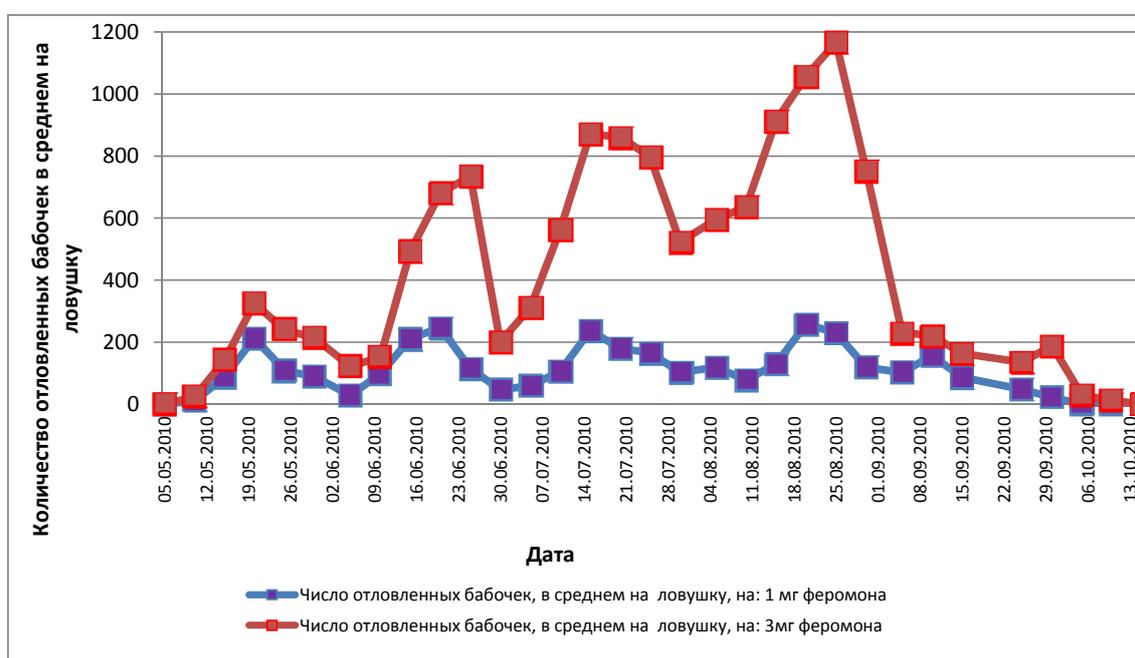


Рис.1. Динамика отлова бабочек каштановой моли *Cameraria ohridella* на ловушки с разной дозой феромона

Визуальными наблюдениями было отмечено, что в безветренную погоду бабочки активно перемещаются с 7 ч утра и до 19 ч, с пиком между 9-ю и 14-ю часами. Весной и в прохладную погоду бабочки концентрируются на освещенной стороне стволов и крупных ветвей. В ходе наблюдений было отмечено, что уже к концу июня листья с минами были расположены почти по всем ярусам деревьев, а в нижнем обильно заселённые листья начинали усыхать. К концу июля все листья, на всех ярусах деревьев, вплоть до вершины, были обильно заселены минами, а к середине сентября сухие листья уже начали опадать.

Следуя указаниям О.В. Антюховой (2008), первую обработку против каштановой минирующей моли на каштанах необходимо проводить в первой декаде мая, в период массового лёта бабочек и интенсивной кладки яиц. Порогом вредоносности каштановой минирующей моли на конском каштане при развитии гусениц первой генерации является достижение 20% поврежденной площади листа, что соответствует 15-30 минам на лист у 10% листьев кроны. Мы провели обработку каштанов препаратом Люфокс 105 ЕС из расчета 1л/га 19 мая и 12 июня, когда появились первые мины, и через 20 дней после первой обработки (по действию препарата). Визуальные учеты, проведенные нами в соответствии с методикой тестирования инсектицидов, показали, что на контрольных деревьях количество мин продолжало нарастать не только в нижнем, но и на других ярусах листвы, и к середине августа вся листва до верхушки деревьев была заселена вредителем. Среднее число мин на лист, на нижнем

ярус достигало 174 шт. при заселении 98-100% листьев, тогда как на деревьях, обработанных препаратом Люфокс105 ЕС, число мин на лист не превышало 23 шт. при заселении до 10% листьев. То есть на обработанных деревьях численность вредителя не превышала пороговую. Эффективность обработки составила 86,7%.

Выводы:

1. Испытанный нами синтетический половой феромон каштановой моли *Cameraria ohridella* – trimethyl [(1E,8E,10Z)-tetradeca-1,8,10-trienyloxy] silane в дозе 1 мг и 3 мг на диспенсер (каучуковые пробки) активно привлекал самцов минёра в течение 30 дней. Доза феромона в 3 мг была в 2,5-3 раза более аттрактивной, чем доза в 1 мг.

2. Двукратная обработка деревьев каштана обыкновенного раствором препарата Люфокс105 ЕС в дозе 1л/га в период начала развития первой генерации вредителя позволяет значительно (86,7%) снизить численность популяции каштановой моли *Cameraria ohridella* до конца вегетационного периода развития каштана.

3. Полученные нами предварительные результаты по эффективности синтетического полового феромона и препарата Люфокс105 ЕС необходимо проверить на больших площадях.

Литература:

1. Avtzis Nikolaos D. Three-year studies on the existence of *Cameraria ohridella* (Lepidoptera, Gracillariidae) in Greece // 1st International Cameraria Symposium. Cameraria ohridella and other invasive leaf-mines in Europe, IOCB, Prague, march 24-27, 2004, p.3.
2. Ion D. Șandru. Larva minieră a frunzelor de castan (*Cameraria ohridella*), Sănătatea plantelor, Stațiunea de cercetări Agricole Timiș, iunie 1999, p.29.
3. Kalinova B., Svatos A., Kindl J., Hovarka O., Hrdy I., Kuldova O., Hoskovec M. // J.Chem. Ecol. 2003, 29, 387-404.
4. Kehrl, P. & Bacher, S. Date of leaf litter removal to prevent emergence of *Cameraria ohridella* in the following spring (англ.) // *Entomologia Experimentalis et Applicata*. – The Netherlands Entomological Society, 2003. T.107, p.159-162.
5. Kuldova I., Strinz L., Hrdy I. Standardized pheromone-based system and propheromones for monitoring the horse chestnut leafminer, *cameraria ohridella* // 1st International Cameraria Symposium (Cameraria ohridella and other invasive leaf-mines in Europe, IOCB, Prague, march 24-27, 2004, p.22.
6. Oltean I., Lucia Ganscă, T. Perju și colaboratorii. Biopesticid feromonal utilizat în combaterea ecologică a moliei miniere *Cameraria ohridella* Desch.&Dim., dăunător major al castanului sălbatic (ornamental) // Protecția Plantelor, Romania, nr.59-60, 2005, p.74.
7. Svatos A., Kalinova B., Hoskovec M., Kindl O., Hovorka O., Hrdy I.: Tetrahedron Lett., 1999, 40, 7011-7014.
8. Svatos A. et al. Semiochemicals in control of *Cameraria ohridella*? // 1st International Cameraria Symposium. Cameraria ohridella and other invasive leaf-mines in Europe, IOCB, Prague march 24-27, 2004, p.41.
9. Subcev M. et. al. Phenology of *cameraria ohridella* (Lepidoptera: Gracillariidae) in Bulgaria // 1st International Cameraria Symposium. Cameraria ohridella and other invasive leaf-mines in Europe, IOCB, Prague, march 24-27, 2004, p.40.
10. Timuș Asea. Molia minieră a castanului a ajuns la Chișinău // Fermierul, 2004, nr.106.
11. Timuș Asea, Mihailov Irina. Molia minieră a castanului – *Cameraria ohridella* Deschka and Dimic. Lucrări științifice, vol.13. - Chișinău: UASM, 2005, p.245.
12. Антюхова О.В. Морфологические и биолого-экологические особенности каштановой минирующей моли в Приднестровье // Вестн. Приднестров. ун-та., 2008, №2, с.73-79.
13. Бабидорич М.М. Каштановая минирующая моль в Молдове // XI1 Междун. симпозиум “Нетрадиционное растениеводство. Эниология. Экология и здоровье”. - Алушта, 2007, С.352-355.
14. Зерова М.Д., Никитенко Г.Н., Нарольский Н.Б., Гершензон З.С., Свиридов С.В., Лукаш О.В. и Бабидорич М.М. Каштановая минирующая моль в Украине / Научный редактор Плющ И.Г. - Київ: ТОВ «Велес», 2007. - 87 с.

Prezentat la 27.02.2012

EFFECTUL TRATĂRII SEMINTELOR DE SOIA CU SUBSTANȚE DE NATURĂ HUMICĂ ȘI FENOLICĂ ASUPRA CREȘTERII ȘI DEZVOLTĂRII SISTEMULUI RADICULAR

Ana BÎRSAN, Vladimir ROTARU*, Iurii SCUTARU**, Ana CUCER, Dăgălina BÎRSAN****

Catedra Biologie Vegetală

*Institutul de Genetică și Fiziologie a Plantelor al AȘM

**Universitatea Tehnică de Stat a Moldovei

***Liceul Teoretic „Spiru Haret”

The radicular system has the ability to react to unfavorable environmental changes via morphological, structural and physiological modifications, feature defined as root plasticity. Changes in root plasticity, in response to environmental conditions were demonstrated in various agricultural crops. In order to highlight the effect of the humic and phenolic compounds on plants the reaction of different soybean genotypes has been studied. The radicular system parameters: the length of main root, the root volume, the root biomass, the number and biomass of the nodules formed by nitric fixing bacteria have been investigated. The analyses have been done at the stage of soybean blossoming. The plants have been grown in optimal condition of cultivation.

The chemical seed treatment has caused the reduction of fresh roots biomass of genotypes sensitive to drought (Licurici and Horboveanca), favouring the accumulation of biomass of bacterial nodules in the Licurici genotype and raising the number of nitric fixing formations in the Horboveanca genotype. Small concentrations of substances have increased the volume of radicular system and the root biomass, while higher concentrations did not affect the radicular system development in drought tolerant genotypes (Zodiac and S4-04). Adminstrating a combination of LG 1.0% and 0.05%OC substances favored the development of the soybean symbiotic system.

Sistemul radicular are capacitatea de a reacționa prin răspunsuri morfologice, structurale și fiziologice la schimbările nefavorabile de mediu, particularitate definită *plasticitate radiculară* [1,7]. Răspunsurile specifice de plasticitate ale sistemului radicular includ modificări de alungire și distribuție a rădăcinii principale, a rădăcinilor laterale, a perișorilor absorbantți, precum și în capacitatea de absorbție a apei și nutrienților [16]. Modificarea plasticității radiculare, ca răspuns la un anumit mediu, a fost demonstrată la diverse culturi agricole [1,9]. La soia, studii asupra plasticității morfologice radiculare sub influența deficitului de apă s-au realizat în condiții de câmp [1,12,16]. S-a demonstrat că, în timp ce potențialul apei din sol descrește, numărul de rădăcini laterale per unitate din lungimea rădăcinii este semnificativ crescut. În condiții de umiditate suficientă, rădăcinile laterale la soia sunt distribuite, în general, la suprafața solului. Însă, sub influența deficitului de apă multe rădăcini laterale proliferază la adâncimi mai mari.

Numeroase surse bibliografice atestă rolul decisiv al influenței unor substanțe bioreglatoare asupra proceselor de dezvoltare a rădăcinii plantelor, argumentând că o mai bună și mai rapidă creștere a sistemului radicular contribuie la o mai bună adaptare la condițiile nefavorabile de mediu [8,10,13,17,18]. Datele din literatura de specialitate relatează despre posibilitatea utilizării compușilor de natură humică și fenolică în procesul de creștere a plantelor [8]. Sunt binecunoscute proprietățile antioxidante, antivirale, antibacteriene, antifungice, alelochimice ale compușilor fenolici, ceea ce sugerează oportunitatea explorării acestora în sectorul agricol în calitate de biopesticide și reglatori de creștere a plantelor [8,11], mecanismul de acțiune și rolul acestor compuși în plante fiind divers și incomplet elucidat.

Reieșind din cele menționate, în scopul evidențierii efectului compușilor de natură humică și fenolică asupra plantelor, am studiat reacția de răspuns a diferitelor genotipuri de soia în cazul tratării semințelor cu diverse concentrații ale acestor substanțe. S-a analizat influența compușilor sus-numiți asupra parametrilor sistemului radicular: lungimea rădăcinii principale, volumul rădăcinii, biomasa rădăcinii, numărul de nodozități formate de bacteriile azotfixatoare și biomasa acestora, la etapa de butonizare a plantelor crescute în condiții de câmp. În studiu au fost utilizate șase genotipuri de soia: Licurici, Horboveanca, Zodiac, S4-04, Enigma și Colina. Semințele de soia au fost tratate cu substanța de natură humică (LG) în concentrații de 0,5 și 1,0%; de natură fenolică (OC) în concentrație de 0,0125 și 0,05%, precum și cu combinațiile acestor compuși: LG 0,5% + OC 0,0125% și LG 1,0% + OC 0,05%.

Genotipurile studiate au reacționat diferit la tratarea exogenă cu compuși de natură humică și fenolică. Dintre parametrii analizați, lungimea rădăcinii a fost afectată negativ de tratamentul chimic la majoritatea genotipurilor, în special la tratarea cu combinația de LG+OC, cu excepția genotipului Horboveanca. La el s-au

atestat valori majorate comparativ cu martorul a lungimii și volumului rădăcinii la tratarea singulară cu LG și OC, lungimea rădăcinii nefiind afectată de combinația LG+OC. Totodată, biomasa rădăcinilor genotipului Horboveanca s-a redus considerabil (cu 15-18%) în variantele în care semințele au fost supuse tratării exogene cu LG și cu circa 30% în variantele tratate cu combinația dintre substanțe, în timp ce compusul de natură fenolică OC nu a influențat acest parametru la genotipul menționat. Administrarea singulară a compusului LG (0,5%) a favorizat dezvoltarea sistemului radicular la genotipurile rezistente la secetă, majorând volumul sistemului radicular cu 56% la soiul Zodiac și cu 12% – la S4-04. De asemenea, valorile parametrului cercetat au crescut cu circa 20% la ambele genotipuri rezistente (Zodiac și S4-04) în cazul tratării semințelor cu OC (0,0125%). Totuși, cele mai pronunțate majorări au fost atestate la soiul Colina – cu aproximativ 46% mai mult comparativ cu martorul. Combinația dintre substanțe a sporit cu circa 60% volumul rădăcinii doar la genotipul Colina. Aceeași legitate s-a observat și referitor la acumularea de biomasă a rădăcinilor. Substanțele studiate au majorat cu circa 10-40% biomasă proaspătă la genotipul Colina, cu 5-25% la genotipul Zodiac și cu 17-32% la genotipul S4-04. Concentrațiile mari de substanțe administrate, de regulă, au menținut parametrii studiați la nivelul martorilor. De menționat că în majoritatea cazurilor tratarea cu substanța de natură fenolică (OC) a majorat semnificativ volumul sistemului radicular: cu 6% (Zodiac), cu 32% (Colina), cu 70% (S4-04), menținând la nivelul martorului biomasă sistemului radicular al acestor genotipuri. Genotipul Licurici a manifestat o reacție negativă clară la tratarea semințelor cu compuși de natură humică, fenolică, precum și la tratarea lor cu combinația dintre aceste substanțe. Astfel, substanțele utilizate au redus considerabil lungimea și volumul rădăcinii (cu $\approx 10-54\%$), precum și biomasă proaspătă (cu $\approx 30-57\%$) a rădăcinii plantelor genotipului Licurici, sensibil la secetă. O reacție opusă genotipului Licurici a avut genotipul Enigma, la care tratamentul cu substanțele sus-numite a favorizat acumularea de biomasă proaspătă în toate cazurile analizate.

Astfel, în condiții optime de cultivare, tratarea cu substanțe chimice de natură humică și fenolică a condiționat reducerea biomasei proaspete a rădăcinilor de soia la genotipurile sensibile la secetă (Licurici și Horboveanca). Administrarea compuşilor în concentrații mici duce la majorarea volumului și a biomasei rădăcinii, iar concentrațiile mari nu afectează dezvoltarea sistemului radicular, în cazul genotipurilor rezistente la secetă (Zodiac și S4-04).

Un alt parametru studiat a fost formarea de nodozități pe rădăcinile plantelor, dat fiind faptul că între rădăcinile leguminoaselor și bacteriile azotfixatoare (la soia, în special, cu *Bradyrhizobium japonicum*) se stabilește o relație de simbioză, cu rol semnificativ în fixarea azotului [15].

Numeroase studii au demonstrat că unele bacterii asociate suprafețelor radiculare pot stimula creșterea și dezvoltarea plantelor de soia, fiind numite din acest motiv „plant growth-promoting rhizobacteria” [2,6,18,21]. Mecanismele prin care rizobacteriile pot stimula creșterea și dezvoltarea plantelor nu sunt încă pe deplin elucidate, cunoscându-se însă faptul că ele implică: fixarea azotului atmosferic [5,15]; solubilizarea fosforului anorganic și a altor nutrienți [3]; sinteza unor fitohormoni (acid indolilacetic, acid giberelic, citokinine) [19]; sinteza unor enzime (β -1,3-glucozază, chitinază) implicate în reacția defensivă împotriva fitopatogenilor [4,8,14]. În același timp, unele date experimentale denotă că compușii humici și fenolici joacă un rol important în interacțiunile dintre plante și mediul înconjurător [13,20].

Studiul comparativ asupra numărului de nodozități la plantele martor ale celor șase soiuri luate în cercetare a demonstrat prezența unui număr sporit de formațiuni la genotipurile S4-04 și Licurici (Fig.1). Numărul mai mare de formațiuni per plantă a corelat cu biomasă proaspătă mai mare a nodozităților la genotipul S4-04 (Fig.2). La genotipul Licurici, însă, biomasă proaspătă a nodulilor a fost redusă, fiind la nivelul biomasei nodozităților genotipurilor ce au format un număr mai mic de formațiuni (Fig.1 și 2).

Dimensiunile nodozităților au variat, de asemenea, în funcție de genotip (Foto 1), de concentrația și tipul substanței administrate, demonstrând astfel că genotipurile cercetate au reacționat diferit la tratamentul chimic. S-a observat că administrarea combinației de substanțe în concentrație mare (LG 1,0% + OC 0,05%) a majorat substanțial dimensiunile și biomasă nodozităților formate, comparativ cu martorul, la toate genotipurile de soia cercetate.



Enigma **Colina** **S4-04**

Foto 1. Variația dimensiunilor nodozităților la unele genotipuri de soia:

A - Martor; B - LG 1%+OC 0,05%.

După numărul de nodozități, răspuns pozitiv la tratamentul cu substanțe chimice, în majoritatea cazurilor, au manifestat genotipurile Horboveanca și Colina, răspuns negativ – Zodiac și Enigma, iar genotipurile Licurici și S4-04 au avut o reacție diferențiată. De menționat că nu în toate cazurile numărul mare de nodozități a corelat cu biomasa acumulată mai mare. Numărul majorat de nodozități a corespuns cu acumularea sporită de biomasă a acestora la administrarea combinației de substanțe în concentrație mare (LG 1,0% + OC 0,05%), ceea ce indică asupra efectului sinergetic al substanțelor cercetate și, propabil, asupra efectului alelopativ al substanțelor studiate.

În același timp, doar în cazul genotipului Zodiac numărul mai mic de nodozități a corelat cu biomasa mai mică a nodozităților, în timp ce în alte cazuri un număr mai mare de nodozități formate au avut o masă mică, și invers: un număr mai mic de nodozități au acumulat o biomasă mai mare, nodozitățile fiind de dimensiuni mai mari. Cele mai mari valori ale biomasei acumulate a nodozităților s-au atestat la genotipurile S4-04 și Colina. La acesta din urmă, majorarea numărului de nodozități în variantele tratate a corespuns cu biomasa sporită a nodozităților.

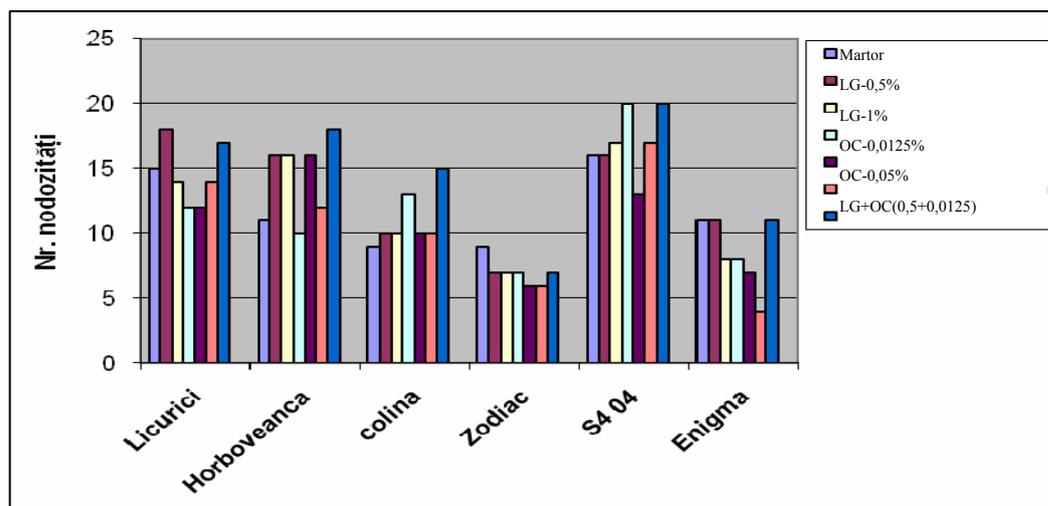


Fig.1. Influența substanțelor de natură humică și fenolică asupra numărului de nodozități per plantă la diverse genotipuri de soia.

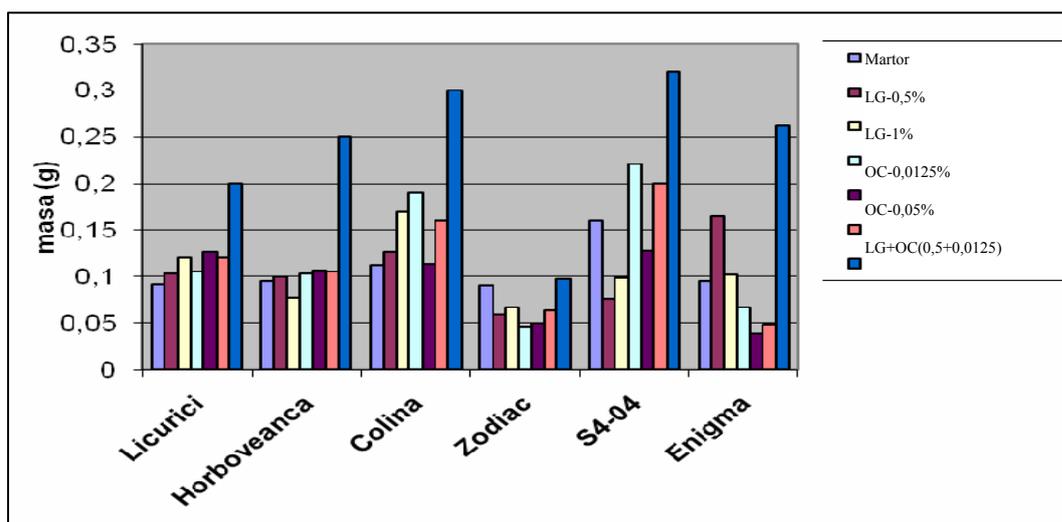


Fig.2. Influența substanțelor de natură humică și fenolică asupra biomasei nodozităților per plantă la diverse genotipuri de soia.

În ceea ce privește fenotipul boabelor și al nodozităților, s-a observat că culoarea boabelor neagră la genotipul S4-04 a corelat cu culoarea mai întunecată a nodozităților, iar culoarea nodulilor deschisă la celelalte genotipuri a corespuns cu culoarea galben-deschis a boabelor.

Concluzii

Tratarea cu compuși chimici de natură humică și fenolică a condiționat reducerea biomasei proaspete a rădăcinilor genotipurilor sensibile la secetă (Licurici și Horboveanca) crescute în condiții optime de cultivare, favorizând acumularea de biomasă a nodozităților bacteriene la genotipul Licurici și majorarea numărului de formațiuni azotfixatoare la genotipul Horboveanca.

Concentrațiile mici de substanțe au determinat creșterea volumului și biomasei rădăcinii, în timp ce concentrațiile mari nu au afectat dezvoltarea sistemului radicular în cazul genotipurilor rezistente la secetă (Zodiac și S4-04).

Administrarea combinată a substanțelor LG 1,0% + OC 0,05% favorizează dezvoltarea aparatului simbiotic la soia.

În majoritatea cazurilor între parametrii morfologici ai sistemului radicular, concentrația substanței, numărul de nodozități și masa acestora nu au fost depistate dependențe stricte.

Referințe:

- Allmars R.R., Nelson W.W., Voorkees W.B. Soybean and corn rooting in south western Minnesota In: Root distribution and related water inflow // Soil Sc. Soc. America proceedings, 1975, vol.39, p.771-779.
- Dashti N., Zhang F., Hynes R., Smith D.L. Application of plant growth-promoting rhizobacteria to soybean (*Glycine max* [L] Merr) increases protein and dry matter yield under short-season condition // Plant and Soil, 1997, vol.188, p.33-41.
- De Freitas J.R., Banerjee M.R., Germida J.J. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.) // Biol. Fertil. Soils., 1997, vol.24, p.358-364.
- Fridlender M., Inbar J., Chet I. Biological control of soilborne plant pathogens by a β -1,3-glucanase-producing *Pseudomonas cepacia* // Soil Biol. Biochem., 1993, vol.25, p.1211-1221.
- Jacobson C.B., Pasternak J.J., Glick B.R. Partial purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR 12-2 // Can. J. Microbiology, 1994, vol.40, p.1019-1025.
- Khalid A., Arshad M., Zahir Z.A. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat // Appl. Microbiol., 2004, vol.96, p.473-480.
- Lynch J.P., Ho M.D. Rhisoeconomics: carbon costs of phosphorus acquisition // Plant and Soil, 2005, vol.269, p.45-56.
- Macias F.A. et al. Allelopathy: chemistry and mode of action of allelochemicals. - CRC Press. LLC, 2004.
- Malamy J.E., Benfey Ph.N. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana* // Development, 1997, vol.124, p.33-44.
- Melenciu M. Autoreglarea statusului hidric al plantelor isohidrice (*Zea mays* L.) și anisohidrice (*Sorghum bicolor* L. Moench) în condiții de insuficiență de umiditate // Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții, 2009, nr.3, p.59-67.
- Motaleb G., Nanachi P., Kua S.H., Fauziah O., Asmah R. Evaluation of phenolic content and total antioxidant activity in *Berberis vulgaris* fruit extract // J.Biol.Sci., 2005, vol.5, p.648-653.
- Reicosky D.C., Deaton D.E. Soybean water extraction, leaf water potential, and Evapotranspiration during drought // Agronomy journal, 1979, vol.71, p.45-50.
- Ren Sen Zeng, Azim U. Mallik, Shi Ming Luo. Allelopathy in Sustainable Agriculture and Forestry. - Springer Science+Business Media, 2008.
- Renwick A., Campbell R., Coe S. Assessment of in vivo screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis* // Plant Pathol., 1991, vol.40, p.524-532.
- Rotaru V., Bîrsan A., Tverdohle A., Taran M. Formarea aparatului simbiotic la genotipurile plantelor de soia în condiții stresogene de umiditate // Congresul IX Internațional al Geneticienilor și Amelioratorilor. - Chișinău, 2010, p.136.
- Rotaru V., Bîrsan A., Tverdohle A. Variabilitatea morfologică a sistemului radicular la genotipurile de soia (*Glycine max*. L.) în condiții deficitare de fosfor // Conferința științifică „Genetica și Fiziologia Rezistenței Plantelor”. - Chișinău, 2011. p.50.
- Ștefăruță A., Brânză L., Melenciu M., Zubarev V., Bulhac I. Efectul unor galați și salicilați asupra relațiilor statusului apei plantelor de *Zea mays* L. // Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții, 2007, nr.1, p.46-53.
- Zahir Z.A., Arshad M., Frankenberger W.T.J. Plant growth promoting rhizobacteria: applications and perspectives in agriculture // Advances in Agronomy, 2003, vol.81, p.97-168.
- Wnag T.L. Wood E.A. Brewin N.J. Growth regulators. Rhizobium and nodulation in peas Indole 3-acetic acid from the culture medium of nodulating and non-nodulating strain of *R. leguminosarum* // Planta, 1982, vol.155, p.345-349.
- Блажей А., Шутый Л. Фенольные соединения растительного происхождения. - Москва, 1977.

Prezentat la 07.03.2012

UNELE ASPECTE PRIVIND INFLUENȚA PREPARATULUI *MELONGOZIDA O* ȘI A MICROELEMENTELOR ASUPRA ACTIVITĂȚII INDICELUI CLOROFILIC, CONȚINUTULUI GLUCIDELOR ÎN FRUNZE ȘI ASUPRA RODIRII LA POMII DE MĂR

Anatol CECAN, Gheorghe ȘIȘCANU, Tudor RALEA

Institutul de Genetică și Fiziologie a Plantelor al AȘM

The foliar treatments applied with Melongozida O, a product of natural source in combination with the microelements Zn and B contributes more intensively to the synthesis of carbohydrates and on chlorophyll index in leaf, in comparison with the separate usage of the mentioned preparation. The activity is intensified in the period of fruit maturing which could create favorable metabolic conditions for the processes of floral induction.

Unul dintre pilonii de bază ai economiei naționale a Republicii Moldova este pomicultura. În acest context pentru obținerea unor recolte de fructe stabile și calitative este necesară aplicarea unor măsuri agrotehnice de reglare a proceselor metabolice în favoarea creșterii și dezvoltării plantelor. În acest scop, în ultimii ani o atenție deosebită se acordă utilizării bioregulatorilor, cum este glicozida Melongozida O obținută din semințele *Solanum melongena* L [1]. Cercetările efectuate anterior la diferite plante pomicole au constatat acțiunea stimuloare a acestui preparat de proveniență naturală în asociere cu microelemente în ce privește menținerea unui echilibru fiziologic între creștere și rodire, rezistența plantelor la acțiunea factorilor nefavorabili ai mediului ambiant [2-4].

Scopul cercetărilor constă în evidențierea acțiunii preparatului Melongozida O și a microelementelor Zn și B asupra activității aparatului fotosintetic și a conținutului glucidelor în frunze la pomii de măr.

Material și metode

Investigațiile au fost efectuate în condițiile casei de vegetație (lizimetre) cu soiul *Florina* altoit pe portaltoi pitic – M-26 și semipitic MM-106. Tratamentele foliare cu soluții de Melongozida O în concentrație de 0,001%, de Zn (sulfat de zinc) și de B (acid boric) în concentrații de 0,1% și, respectiv, de 0,05% au fost efectuate la începutul perioadei de vegetație în două reprize: prima la 8-10 zile după înflorire (19.05.2011), a doua – la 7 zile după prima (26.05.2011). La varianta-martor plantele au fost stropite cu apă.

Probele de frunze de pe formațiunile fructifere (pintenii) cu fructe și fără fructe (ultimele se consideră că vor forma muguri de rod pentru recolta anului următor) au fost colectate pe parcursul perioadei de vegetație conform fazelor fenologice, menționate în textul prezentei lucrări.

Au fost determinați următorii indici: activitatea indicelui clorofilic (aparatură CM 1000); conținutul glucidelor în frunze [5]; intensitatea înfloririi pomilor. Datele obținute au fost prelucrate statistic [6].

Rezultate și discuții

Cercetările efectuate la soiul *Florina* altoit pe portaltoi pitic M-26 au stabilit că activitatea indicelui clorofilic la plantele martor în fenofaza începutul creșterii lăstarilor (20.05.11) este mai mare în frunzele pintenilor fără fructe decât în cele cu fructe (Fig.1). Dimpotrivă, tratamentele foliare cu preparatul Melongozida O și cu microelementele Zn și B atestă că intensitatea indicelui clorofilic este în diminuare în frunzele pintenilor fără fructe și crește în frunzele celor cu fructe. Aceeași legătură s-a evaluat și la plantele altoite pe portaltoi semipitic MM-106, cu excepție că la plantele netratate intensitatea acestui indice este mai mare în frunzele pintenilor cu fructe.

În fenofaza creșterii intensive a lăstarilor (30.06.2011) la soiul *Florina* activitatea indicelui clorofilic este în scădere în frunzele pintenilor fără fructe, atât la plantele-martor, cât și la cele tratate cu preparatele menționate. Mai accentuat activitatea acestui indice s-a manifestat la varianta Melongozida O+Zn+B aplicată soiului *Florina* altoit pe portaltoi semipitic MM-106. De menționat că, în comparație cu martorul activitatea indicelui clorofilic în frunzele pintenilor fără fructe și cu fructe este mai mare la soiul *Florina* altoit pe portaltoi pitic în cazul utilizării soluțiilor de microelemente Zn și B, iar la pomii altoiți pe portaltoi semipitic, dimpotrivă, ea este în diminuare.

În fenofaza încetării creșterii lăstarilor (12.07.2011) și intrării fructelor în pârgă, formarea și diferențierea mugurilor de rod la pomii altoiți pe portaltoi M-26 și MM-106 activitatea indicelui clorofilic este mai sporită în frunzele pintenilor fără fructe. În comparație cu martorul, tratamentele foliare utilizate au contribuit la micșorarea activității acestui indice. Activitatea mai intensă a indicelui clorofilic în frunzele pintenilor fără fructe decât în cele cu fructe în această perioadă a vegetației denotă că centrul dominant de atracție a asimilatelor sunt organele reproductive, fiind și centre de formare a mugurilor floralii.

Așadar, cercetările efectuate admit situația că cu cât intensitatea indicelui clorofilic prezintă valori mai mari, cu atât eficacitatea aparatului fotosintetic este în favoarea nu doar a sintezei clorofilei „a”, dar și în procesele de formare a substanțelor metabolice în frunze. Din cele expuse rezultă că intensitatea mai intensă a indicelui clorofilic este ca donator al asimilatelor formate în frunze spre organe sau sisteme consumatoare.

Glucidele rezultă din activitatea fotosintetică a plantelor – sursă importantă de energie necesară metabolismului. S-a constatat și rolul acestor substanțe în procesele fructificării [7]. Tratamentele foliare cu soluții ce conțin preparatul Melongozida O și microelementele Zn și B au contribuit la acumularea glucidelor reducătoare în frunzele pintenilor cu fructe și fără fructe în fenofaza începutul creșterii lăstarilor (23.05.2011, Fig.2).

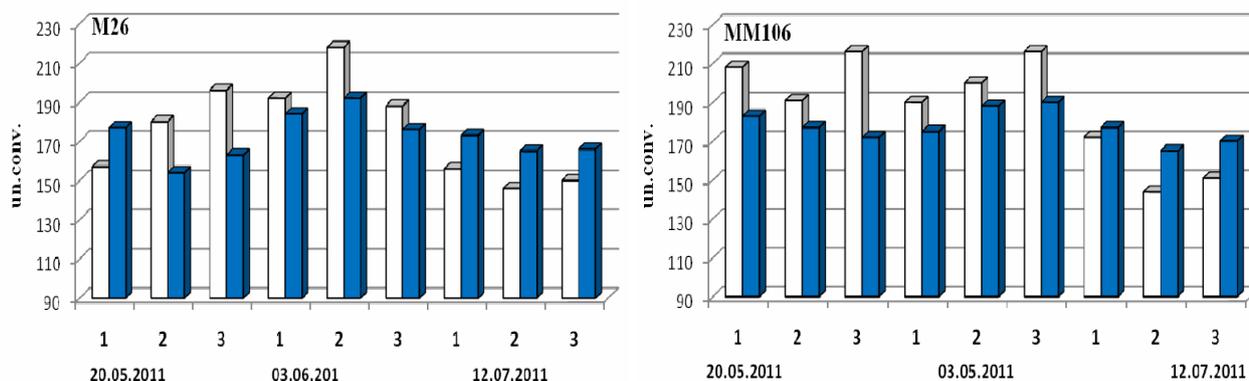


Fig.1. Influența preparatului Melongozida O și a microelementelor Zn și B asupra activității indicelui clorofilic în frunzele pomilor de măr, un.conv. Soiul *Florina*, M26, MM106.

Legenda: 1 – martor; 2 – Zn+B; 3 – Melongozida O+Zn+B. □ – frunzele pintenilor cu fructe; ■ – frunzele pintenilor fără fructe.

Dimpotrivă, în această perioadă a vegetației conținutul zaharozei și al glucidelor totale în frunzele cercetate este în diminuare. Unul dintre indicii ce caracterizează direcția și intensitatea metabolismului glucidelor este raportul dintre fracții. În comparație cu martorul, tratamentele aplicate au contribuit la mărirea raportului dintre glucidele reducătoare de zaharoză în frunze, ceea ce afirmă intensificarea proceselor de sinteză a glucidei reducătoare. Mai accentuat sinteza s-a manifestat la varianta tratării foliare cu soluții de microelemente Zn și B în frunzele pintenilor cu fructe.

S-a constatat că în fenofaza încetării creșterii lăstarilor (05.07.2011), perioadă ce corespunde cu declanșarea proceselor inducției florale, de formare și diferențiere a mugurilor de rod la plantele tratate cu preparatele menționate, conținutul glucidelor totale și al zaharozei în frunze este mai sporit. Această legitate se afirmă și în fenofaza anterioară – creșterea intensivă a lăstarilor (14.06.2011), numai că nivelul cantitativ al celor trei forme ale glucidelor (totale, reducătoare și al zaharozei) este aproximativ de 1,2–1,5 ori mai mare față de martor. Se evidențiază că în această perioadă conținutul zaharozei este în diminuare în frunzele pintenilor fără fructe la varianta Melongozida O+Zn+B decât în cele cu fructe. Constatarea valorilor mai mici ale zaharozei, ca cel mai important compus de transport al glucidelor spre acceptor, și anume – în frunzele menționate, în fenofaza încetării creșterii lăstarilor are loc ca urmare a circumstanței că centrul dominant de atracție a substanțelor energogene sunt formațiunile fructifere unde se desfășoară formarea mugurilor floralii pentru recolta anului următor.

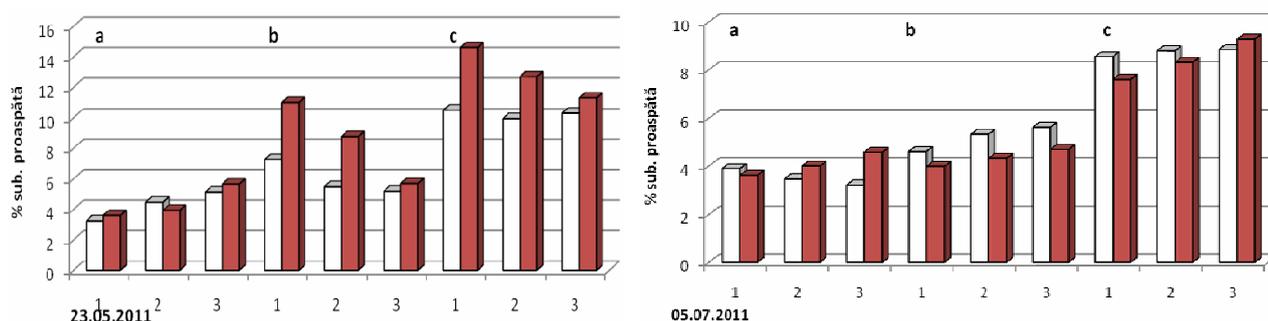


Fig.2. Influența preparatului Melongozida O și a microelementelor Zn și B asupra conținutului glucidelor în frunzele pomii de măr, % sub. proaspătă, soiul *Florina*, M-26, 2011

Legenda: 1 – martor; 2 – Zn+B; 3 – Melongozida O+Zn+B. □ – frunzele pintenilor cu fructe; ■ – frunzele pintenilor fără fructe.

Formarea mugurilor de rod este unul dintre indicii ce reflectă starea fiziologică a plantelor, reacția la condițiile mediului ambiant și a măsurilor agrotehnice aplicate. Cel mai mare număr de flori în primăvara anului 2012 (25.04) la soiul *Florina* altoit pe portaltoi pitic M-26 s-a constatat la tratarea foliară a plantelor cu preparatul Melongozida O în amestec cu microelementele Zn și B (245 buc.), urmat de varianta Zn+B (205 buc.), față de martor (170 buc.). La soiul *Florina* altoit pe portaltoi semipitic MM-106 acești parametri s-au încadrat între cifrele 170, 190 și 155 buc. la martor.

Așadar, la soiul *Florina* cel mai mare număr de flori la pomii altoiți pe portaltoi M-26 au fost evaluate la varianta Melongozida O+Zn+B, iar la cei altoiți pe MM-106 – la tratarea cu soluții de Zn+B.

La soiul *Golden Delicious* altoit pe portaltoi pitic numărul mai mare de flori au fost constatate la tratarea cu soluții de microelemente Zn și B (216 buc.) și 168 buc. la martor, iar la cel altoit pe portaltoi semipitic – la varianta Melongozida O+Zn+B (160 buc.) și, respectiv, 104 buc. la plantele netratate.

Concluzii

Tratamentele foliare ale pomilor cu soluții ale preparatului Melongozida O de proveniență vegetală utilizat în amestec cu microelementele Zn și B în condițiile casei de vegetație (lizimetre) cu regim optimal de aprovizionare cu apă a solului au exercitat influență asupra activității aparatului fotosintetic, a indicelui clorofilic și asupra conținutului glucidelor în frunze, asupra formării mugurilor de rod la pomii de măr. S-a evidențiat reacția diferită a plantelor la acțiunea preparatelor menționate în dependență de soi și portaltoi.

Referințe

1. Titova N., și colab. Reglarea exogenă a fotosintezei și metabolismului plantelor de cais. - În: Structura și funcționalitatea sistemelor biologice – diversitate și universalitate. - Chișinău, 2011, p.231-234.
2. Iurea D. și colab. Studii asupra conținutului de pigmenți la diferite soiuri de măr tratate cu Ecostim. - În: Agrobiodiversitatea vegetală în Republica Moldova. - Chișinău, 2008, p.355-359.
3. Cecan A. și colab. Preparatul Melongozida O în amestec cu microelemente și impactul asupra conținutului glucidelor și al substanței uscate în frunze la pomii de măr // Studia Universitatis. Seria „Științe ale naturii”. - Chișinău, 2010, nr.6(36), p.34-37.
4. Власюк П. Биохимические элементы в жизнедеятельности растений. - Киев: Наукова думка, 1969, с.223-369.
5. Ермаков А. и др. Методы биохимического исследования растений. - Ленинград: Колос, 1986, с.47-41.
6. Юдин Ф. Методы агрохимических исследований. - Москва: Колос, 1975, с.154-173.
7. Коломиец И. Преодоление периодичности плодоношения яблони. - Киев: Урожай, 1976, с.101-141.

Prezentat la 15.05.2012

ECO-PHYSIOLOGICAL INDICATORS OF BIOLOGICAL QUALITY OF CALCAREOUS CHERNOZEM AFTER LONG-TERM AGRICULTURAL USE

*Ecaterina EMNOVA, Anna HANGANU, Vasiliu GNIDIUC**

Institute of Genetics and Plant Physiology

**Educational Experiment Station “Chetrosu”, Moldavian Agricultural State University*

Practica de lucrare a solului (cu și fără întoarcerea brazdelor) a manifestat cel mai puternic efect asupra parametrilor biologici ai cernoziomului carbonatic din sud-estul Moldovei. Lucrarea solului fără întoarcerea brazdelor în combinație cu administrarea îngrășămintelor verzi (sideratelor)+NPK rezultă în cantitatea mai mare de C_{mic} , cele mai mici valori ale respirației microbiene a solului și ale coeficientului metabolic (qCO_2). Utilizarea multianuală a erbicidelor nu a influențat parametrii microbieni. Cu toate acestea, cernoziomul carbonatic după un termen lung (42 de ani) în exploatare agricolă cu asolament, sistem de lucrare a solului protectiv (ploșcorezul), amendament de îngrășămintă organice și minerale, de erbicide în doze minime încă pierde în mod constant substanța organică din sol. Mărimea biomasei microbiene este aproape de optim, dar se demonstrează activitatea de mineralizare excesivă a substanței organice și o viteză sporită de eliminare a CO_2 .

Introduction

Soil quality is the capacity of soil to sustain plant and animal productivity, maintain or enhance water and air quality, and promote plant and animal health [1-3]. Terms of soil quality and soil health may be used synonymously, however first term is generally associated with soil's fitness for a specific use, and second term is used in a sense to indicate the capacity of soil to function as a vital living system [4]. The soil quality encompasses three basic components: biological, chemical and physical properties while soil health is determined by ecological characteristics [3]. By this reason, soil quality is considered the broader concept than soil health [5]. Soil quality is conceptualized as a major linkage between the strategies for agricultural conservation management practices and achievements of the major goals of sustainable agriculture [6]. The assessment of soil quality or health, and direction of change with time, is considered as the primary indicator of sustainable land management [3].

Soil microorganisms play important roles in soil quality and plant productivity. Soil microbial biomass is an important parameter of ecological tests, since microorganisms mediate critical ecosystem carbon and nutrient cycles. Soil respiration is one of the oldest and still the most frequently used parameter for quantifying microbial metabolic activity in soil [7]. Soil microorganisms divert more energy from growth into maintenance as stress increases and thus the ratio of basal soil respiration to microbial biomass (the metabolic quotient qCO_2) can be a much more sensitive indicator of stress [8-9]. Having in mind the interlinkage between the soil biotic component and biogeochemical cycling, Anderson and Domsch [10-11] have proposed the use of eco-physiological indicators (microbial biomass carbon, basal soil respiration, microbial and metabolic quotients) to estimate the soil management practices.

Chernozem soil occupies 70% of total Moldovan land territory [12], arable land consists of 1842.6 thousand ha or 54.4% [13]. Soil degradation is the global problem, but it is especially severe in developing countries, where natural resources are under great stress, and resource-poor farmers cannot to afford the input required for restoration of degraded soils and ecosystems [14]. During many years soil research has concentrated on soil chemical and physical factors, with comparative neglect of biological factors. Consequently, there was relatively limited understanding of how best to capitalize on the dynamics and potentials of soil biology so as to enhance the regenerative capacity of soil systems for agriculture. Biological estimation of the quality of Moldavian chernozem is now the focus of research for soil microbiologists and biochemists [15-18]. The Educational Experiment Station (EES) “Chetrosu” of State Agricultural University of Moldova was established in 1949 on calcareous chernozem in South-East of Moldova (Anenii Noi area, village Chetrosu, 30 km distance from Chisinau). The long-term field experiment since 1969 reflecting the different kinds of intensive agricultural soil management practices as a combination of elements of conventional and organic cropping systems is supported for 42 years. The two soil fertilization systems used for interval 1989-2003 had to be stopped owing to the financial difficulties, but the synthetic herbicide use is continued so far.

The objective of this research was to study the effect of the long-term moldboard tillage (plow) versus moldboardless (subsurface) tillage (paraplow), long-term use of weed control agrichemicals (herbicide) for corn cultivation versus mechanical weeding, and aftereffect of fertilization systems (green manure+NPK versus cattle manure) on some soil general biochemical parameters related to microbial activity, reflecting the biological quality of calcareous chernozem soil placed in South-East Moldova.

Materials and methods

The site has a systematic block design of 5-field crop rotation. Individual plots measured 55 m² (5.5m x 10 m) and designed in 4 replicates. The field crops are comprised of a pea (*Pisum sativum*) - winter wheat (*Triticum durum*) - corn for grains (*Zea mays L.*) (1) - corn for grains (2) – alfalfa (*Medicago sativa*). In 2011 the field was cultivated with corn for grains treated by herbicides as always. The three experimental factors used since 1989 include: A. Tillage - moldboard tillage (plow) vs moldboardless tillage (paraplow). B. Agrichemicals - long-term use of weed control chemicals (herbicide) for corn protection vs mechanical weeding (control). C. Fertilization - post-action of previously (1989-2003) used fertilization systems (green manure+N₁₂₀P₁₂₀K₁₂₀ vs cattle manure (60 t/ha). The arable layer of calcareous chernozem initially contained 3.68% of soil organic matter (SOM, the former term “humus”) [19]. The mean values of SOM in 0-20 cm layer for 1984-1993 years constituted 2.80-2.88% (correspondingly, C_{org} =1.62-1.67%). The soil solution revealed a slightly alkaline reaction. *Soil sampling* was performed September 10, 2011 (before the corn harvest) from the top layer (0-20 cm) of arable field plots. Samples were taken from each of 3 replicates per treatment by combining 5 soil probes inside of each replicate, in total 24 samples. After removing vegetal rests and stones soil was passed through 2 mm sieve. Samples were stored at 4°C no longer than one month.

Microbial biomass carbon (C_{mic}) assay was conducted by use of rehydration method [20] Soil samples (2 replicates of 10 g) were oven dried at 65°C for 24 h, resulting in disruption of the microbial cell wall permeability. Repeated rehydration of dry soil samples with 0.5 M K₂SO₄ at a ratio 1:2 (w/v) resulted in microbial cell destruction and release of microbial carbon into solution. The 2 replicates of 10 g fresh soil samples were placed in refrigerator to serve as control. Salt-extractable organic C concentrations in the dried and fresh samples were simultaneously measured using dichromate oxidation. The aliquote 1.6 ml of filtered soil extract was carefully mixed in tube with 2.4 ml of dichromate solution: 1,28 g K₂Cr₂O₇ in 400 ml of deionized water is dissolved in 2 L of H₂SO₄ (d=1,84 g/cm³). The mixture was incubated at 140°C for 20 min. The optical density is measured at 340 nm against of blank mixture of reagents without soil salt extract. The amount of carbon in the soil extracts was calculated according to [20]. Biomass C is recorded as μg C per g oven dry soil.

Basal soil respiration (C-CO₂ elimination rate) was determined by adopted method proposed by Isermeyer [21]. Briefly, soil (25-50 g of dry soil, adjusted to water content 40% WHC, was weighted at the bottom of 1L glass jars containing two vessels with 10 ml of distilled water for air humidifying and 20 mL of 1 M NaOH for CO₂ trapping. The jars were sealed and incubated at 21°C in the dark for 14 d. CO₂ released during soil incubation was trapped in NaOH and determined by titrimetric analysis. The soil respiration was recorded as μg C-CO₂ g⁻¹ dry soil h⁻¹ at 21°C as the average rate during the whole 14 days incubation.

Metabolic quotient (qCO₂) or the quantity C-CO₂ produced per unit of microbial biomass C per unit of time was calculated as a ratio C-CO₂ : C_{mic} and was expressed in mg C-CO₂ g⁻¹ C_{mic} h⁻¹ [22]. *Total organic carbon (C_{org})* was assayed using air-dried soil samples by wet oxidation with dichromate in an acid medium and evaluation of the excess of dichromate according to the method of Tiurin [23]. The value of total C_{org} is recorded as % of dry soil mass. *Soil organic matter (SOM)* content was calculated by multiplication of C_{org} values on 1.724 [23]. *Microbial quotient* was calculated as a ratio C_{mic} : C_{org} and its value is expressed in % microbial C inside organic C [10]. Analysis of variances (ANOVA) (StatSoft STATISTICA 7.0) and paired t-tests (Microsoft Office 2010, Excel) were applied to evaluate differences between soil treatments.

Results and discussion

Total organic carbon (C_{org}) of calcareous chernozem soil from South-East of Moldova under long-term agricultural use was ranged, between 1.40%-1.55% and 1.51%-1.67%, respectively, for moldboard and moldboardless tilled soils (table 1), what adequately corresponds to soil organic matter (SOM or humus) content 2.41%-2.67% and 2.61-2.88%. These data confirm that the loss of SOM in the majority treatments of investigated soil continues with time in comparison to initial 3.68% in 1989 and 2.80-2.88% in 1993.

According to three-way ANOVA analysis, two of three investigated factors - Tillage and Agrichemicals - significantly ($P < 0.05$) influence the level of C_{org} and SOM – the principal component of soil fertility (table 2). The impact of fertilization systems (green manure+NPK versus cattle manure) was insignificant, although the only combination of moldboardless tillage and cattle manure amendment maintains the values of SOM and C_{org} , respectively, 2.88% and 1.67%, similar observed in 1993 ones.

Table 1

Eco-physiological indicators of soil biological quality reflecting the intensity of soil biochemical processes

Parameter		Microbial biomass carbon, C_{mic}	Microbial quotient, $C_{mic} : C_{org}$	Basal soil respiration, C-CO ₂ rate	Metabolic quotient, qCO ₂	Total organic carbon, ^a C_{org}
Units of measurement		$\mu\text{g C g}^{-1}$ dry soil	%	$\mu\text{g C-CO}_2 \text{ g}^{-1}$ soil h^{-1} at 21°C	$\text{mg C-CO}_2 \text{ g}^{-1} C_{mic} \text{ h}^{-1}$	%
Treatments		Moldboard (conventional) tillage (plow)				
Green manure +NPK	control	^b 253 ± 15	1.68 ± 0.12	2.08 ± 0.58	8.4 ± 1.1	1.51 ± 0.04
	herbicide	252 ± 18	1.73 ± 0.17	2.55 ± 1.10	10.1 ± 2.8	1.46 ± 0.04
Cattle manure	control	266 ± 20	1.72 ± 0.08	2.41 ± 0.66	9.2 ± 3.1	1.55 ± 0.06
	herbicide	239 ± 22	1.72 ± 0.23	2.26 ± 0.46	9.6 ± 2.6	1.40 ± 0.12
		Moldboardless (subsurface) tillage (paraplow)				
Green manure +NPK	control	274 ± 5	1.76 ± 0.11	1.86 ± 0.48	6.8 ± 1.8	1.55 ± 0.08
	herbicide	294 ± 36	1.96 ± 0.37	1.83 ± 0.19	6.3 ± 1.1	1.51 ± 0.13
Cattle manure	control	295 ± 16	1.76 ± 0.05	3.86 ± 0.53	13.2 ± 2.3	1.67 ± 0.08
	herbicide	284 ± 28	1.88 ± 0.23	3.44 ± 0.51	12.2 ± 2.7	1.51 ± 0.04

^aMean values of soil organic matter (SOM), a former term “humus”, of calcareous chernozem for ten years (1984-1993) constituted 2.80-2.88% or, correspondingly, C_{org} constituted 1.62-1.67% in 0-20 cm layer; ^bMean ± S.D. (standard deviation, σ), n=3.

Microbial biomass carbon (C_{mic}) presents the important labile component of soil owing to high sensibility to any ecological stresses. According to our data neither fertilizers no herbicides use had no significant effect ($P > 0.05$) on the size of the microbial biomass in calcareous chernozem (table 1-2). But third factor – moldboardless tillage promotes the bigger amount of C_{mic} . Mean values of C_{mic} ranged between 239-266 $\mu\text{g C g}^{-1}$ dry soil for calcareous chernozem subjected to moldboard tillage (plowing) versus 274-295 $\mu\text{g C g}^{-1}$ dry soil - to moldboardless tillage (paraplow). It could be explained by the revealed bigger amounts of C_{org} in moldboardless tillaged soil. Thus, reduced tillage practices provide a more plant residues in soil top layer that results in increase C_{org} and other parameters related to soil quality.

Microbial quotient ($C_{mic} : C_{org}$) reflects the soil carbon available for growth and soils with better quality should have a higher microbial quotient [10]. According to results of this study (tables 1-2) all kinds of intensive agricultural soil management practices used in frames of investigated long-term experiment (for 42 years) did not affect the microbial quotient. The calcareous chernozem demonstrated the microbial quotient $C_{mic} : C_{org}$ ranged between 1.68% and 1.96%, with the tendency of a more efficiency at moldboardless tillage.

Basal soil respiration (BSR or C-CO₂ elimination rate) indicates the metabolic activity of soil microorganisms. According to three-way ANOVA analysis data (table 2) only the fertilization systems revealed significant influence upon microbial C-CO₂ elimination rate. But despite of insignificant affect of tillage practices, ANOVA analysis demonstrate the significant ($P < 0.001$) interaction between Tillage*Fertilization factors. The most evident differences were observed for microbial communities from soils with moldboardless tillage (paraplow). Mean values of C-CO₂ rate ranged between 1.83-1.86 $\mu\text{g C-CO}_2 \text{ g}^{-1}$ soil h^{-1} at 21°C for calcareous chernozem fertilized by green manure+NPK versus 3.44-3.86 C-CO₂ g^{-1} soil h^{-1} at 21°C – by cattle manure (table 1). The moldboard tillage (plowing) levels the differences in soil fertilization systems

and results in more similar microbial activity ranged between 2.08-2.55 $\mu\text{g C-CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ soil h}^{-1}$ and 2.26-2.41 $\mu\text{g C-CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ soil h}^{-1}$, respectively, for green manure+NPK versus cattle manure. Thus, the soil respiration or microbial activity was significantly higher in soil under moldboardless tillage and fertilized by cattle manure. Contrary expectations, long-term use (at least for last 22 years) of a variety of herbicides in the cultivation of corn for grains in the crop rotation did not affect the activity of soil microbial communities.

Table 2

Summarized results of three-way ANOVAs for soil general biochemical parameters

Dependent variables	Independent variables	F ^a	P-value ^b
Microbial biomass carbon (C_{mic})	Tillage	14.53	0.0015**
	Fertilization	0.11	0.74
	Agrichemicals	0.28	0.60
Total organic carbon (C_{org}) (0-20 cm)	Tillage	6.62	0.020*
	Fertilization	0.59	0.46
	Agrichemicals	9.15	0.008**
Microbial quotient ($C_{mic} : C_{org}$)	Tillage	2.64	0.12
	Fertilization	0.03	0.86
	Agrichemicals	1.37	0.26
Basal soil respiration ($C\text{-CO}_2 \text{ rate}$)	Tillage	3.52	0.07
	Fertilization	16.97	0.0008***
	Agrichemicals	0.04	0.85
	Tillage*Fertilization	16.79	0.0008***
Metabolic quotient ($q\text{CO}_2 = C\text{-CO}_2 : C_{mic}$)	Tillage	0.12	0.73
	Fertilization	11,15	0.004**
	Agrichemicals	0.03	0.87
	Tillage*Fertilization	10.03	0.006**

^a F-test or Fisher's criteria;

^b confidence level. *** = $P < 0.001$; ** = $0.001 < P < 0.01$; * = $0.01 < P < 0.05$

Metabolic quotient ($q\text{CO}_2$ or the quantity C-CO₂ produced per unit of microbial biomass C per unit of time) indicates the efficiency by which soil microorganisms use C-resources in the soil, including the microbial requirements of maintenance energy [10]. It is expected that stressed soils will provide higher $q\text{CO}_2$ values than less-stressed soils [5]. In similar way to BSR parameter, metabolic quotient according to three-way ANOVA (table 2) was significantly influenced only by the fertilization systems ($P < 0.01$), and demonstrated the dependence on significant ($P < 0.01$) interaction between Tillage*Fertilization factors. For soils with moldboardless tillage (paraplow) the mean values of C-CO₂ rate ranged between 6.3-6.8 $\mu\text{g C-CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ soil h}^{-1}$ at 21°C for chernozem fertilized by green manure+NPK versus 12.2-13.2 $\mu\text{g C-CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ soil h}^{-1}$ at 21°C - fertilized by cattle manure (table 1). The soils under moldboard tillage (plowing) revealed less differences in $q\text{CO}_2$ parameters caused by fertilization systems and results in more similar values of microbial respiration per units of microbial biomass ranged between 8.4-10.1 $\mu\text{g C-CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ soil h}^{-1}$ and 9.2-9.6 $\mu\text{g C-CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ soil h}^{-1}$, respectively, for green manure+NPK versus cattle manure. Thus, the soil specific respiration $q\text{CO}_2$ was also significantly higher in soil under moldboardless tillage (paraplow) and fertilized by cattle manure. Long-term use of different herbicides in the cultivation of corn for grains in crop rotation did not affect the efficiency of C-resources use by soil microorganisms.

Lastly, of three investigated factors the soil tillage practice revealed the strongest effect on microbiological parameters of calcareous chernozem of South-East Moldova. The moldboardless tillage (paraplow) results in higher amount of C_{mic} , that is, microbial biomass growth. The more favorable aftereffect of used green manure +NPK fertilizers also was observed for calcareous chernozem under moldboardless tillage. The same, the

basal soil respiration (C-CO₂ rate) and metabolic quotient (qCO₂) parameters showed the lowest values. The multiannual herbicide use under field concentrations did not influence the microbiological parameters. Still, the calcareous chernozem after long-term (42 years) agricultural use with crop rotation, protective moldboardless tillage, and soil amendment by organic and mineral fertilizers, herbicides is steadily losing the soil organic matter.

As to biological quality estimation of soil, according to criteria proposed by Anderson [10], the C_{mic}: C_{org} ratio of agricultural and forest soils at neutral pH is very similar and in the range between 2.0 and 4.4% C_{mic} of total C_{org}, depending on nutrient status and soil management. The metabolic quotient qCO₂ ranged between 0.5 and 2.0 mg C-CO₂ g⁻¹ C_{mic} h⁻¹ in neutral soils. Values below 2.0 for the C_{mic}: C_{org} ratio or above 2.0 for the qCO₂ could be considered as critical for soils with a neutral soil pH [10]. Unfortunately, so far the correction of these criteria for soils with alkaline pH values is absent.

The evaluation of our results on calcareous chernozem soil from South-East Moldova under long-term agricultural use has shown the C_{mic}: C_{org} ratio in the range between 1.68% and 1.96% that is close to optimal minimum 2.0%. But the mean qCO₂ values in the range between 8.4 and 13.2 mg C-CO₂ g⁻¹ C_{mic} h⁻¹ were 4-6 times above optimal maximum 2.0. It can be the reasonable explanation of the loss of C_{org} from calcareous chernozem after long-term agricultural use. The highest values of BSR and qCO₂ parameters were found for chernozem under protective tillage practice (paraplow) and fertilized with the cattle manure. But it may be the temporary impact of the manure on the rate of soil CO₂ emissions, due to use by soil microorganisms and growing crops of organic substances which simultaneously contain C and N elements. Some another researchers [24] also have found that the soil CO₂ emission rate at peak times in the organic fertilization system was higher than under the conventional system. However, even if the cropping systems had a temporary impact on the rate of soil CO₂ emissions, the soil C output calculated as the average of cumulative CO₂ emission over the 3-year period did not show significant differences between the organic and conventional systems [24].

Conclusions

The calcareous chernozem of South-East Moldova after long-term (42 years) agricultural use with crop rotation, protective moldboardless tillage practice, and soil amendment by organic and mineral fertilizers, herbicides is steadily losing the soil organic matter. While the size of the microbial biomass is close to optimal, but it shows an enhanced mineralization activity of the microbial decomposer compartment in relation to soil organic matter, judging by the increased CO₂ evolution. The soil tillage practice revealed the strongest effect on microbiological parameters of calcareous chernozem. The moldboardless tillage results in the higher amount of C_{mic}, the more favorable aftereffect of green manure + NPK fertilizers with the lowest values of the basal soil respiration (C-CO₂ rate) and metabolic quotient (qCO₂) parameters. The multiannual herbicide use under field concentrations did not influence the microbiological parameters.

References:

1. Doran J.W., Parkin T.B. Defining and assessing soil quality. In: Defining Soil Quality for a Sustainable Environment / J.W. Doran, D.C. Coleman, D.F. Bezdicek, and B.A. Stewart (Eds.) / Soil Sci. Soc. Am. Special Publication 1994, no.35, p.3-21.
2. Doran J.W., Parkin T.B. Quantitative indicators of soil quality: A minimum data set. In: Method for assessing soil quality / J.W. Doran and A.J. Jones (Eds.) / Soil Sci. Soc. Am. Special Publication 1996, no.49, p.25-37.
3. Karlen D.L., Mausbach M.J., Doran J.W., Cline R.G., Harres R.F., Schuman G.E. Soil quality: A concept, definition, and framework for evaluation // Soil Sci. Soc. Am. J., 1997, vol.61, p.4-10.
4. Doran J.W., Zeiss M.R. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality // Appl. Soil Ecology, 2000, vol.15, p.3-11.
5. van Bruggen A.H.C., Semenov A.M. In search of biological indicators for soil health and disease suppression // Appl. Soil Ecology, 2000, vol.15, p.13-24.
6. Parr J.F., Papendick R.I., Hornick S.B., Meyer R.E. Soil quality: attributes and relationship to alternative and sustainable agriculture // Am. J. Altern. Agric., 1992, vol.7, p.5-11.
7. Pal R., Das P., Chakrabarti K., Chakraborti A., Chowdhury A. Side effects of pencycuron on nontarget soil microorganisms in waterlogged soil: Field experiment // Appl. Soil Ecology, 2008, vol.38, p.161-167.
8. Anderson T.-H., Domsch K. H. Determination of eco-physiological maintenance requirements of soil microorganisms in a dormant state // Biol. Fertil. Soils, 1985, vol.1, p.81-89.

9. Kennedy, A.C., Papendick R.I. Microbial characteristics of soil quality // *J. of Soil and Water Conservation*, 1995, vol.50, p.243-248.
10. Anderson T.-H. Microbial eco-physiological indicators to assess soil quality // *Agr. Ecosyst. Environ*, 2003, vol.98, p.285-293.
11. Anderson T.-H., Domsch K.H. Soil microbial biomass: The eco-physiological approach // *Soil Biol. Biochem.*, 2010, vol.42, p.2039-2043.
12. Andrieș S. *Agrochimia elementelor nutritive. Fertilitatea și ecologia solurilor*. - Chișinău, 2011.
13. Программа освоения деградированных земель и повышения плодородия почв. Ч.1. Амелиорация деградированных почв. - Кишинэу: Pontos, 2005, с.24.
14. Lal R. Sustainable soil management and ecosystem services. – În: *Sustainable, including ecological agriculture – problems and perspectives*. - Bălți: Presa Universitară, 2007, p.120-122.
15. Емнова Е.Е. Современная экологическая концепция качества почв как составная часть концепции устойчивого сельского хозяйства // *Buletinul AȘM*, 2004, nr.4(294), p.63-70.
16. Emnova E., Toma S., Daraban O., Druta Ia. Гидролитическая активность чернозема типичного и мобилизация питательных элементов растений. – În: *Creșterea impactului cercetării și a dezvoltării capacității de inovare*. - Chișinău: USM, 2011a, p.230-234.
17. Emnova E., Toma S., Daraban O., Druta Ia., Boincean B., Nica L. Биохимические особенности типичного чернозема под сахарной свеклой в севообороте. – În: *Sfecla de zahăr – cultura strategică în dezvoltarea durabilă a agriculturii Republicii Moldova*. - Chișinău: Tipografia Centrală, 2011b, p.175-183.
18. Корчмару С., Меренюк Г., Урсу А., Боинчан Б. Система микробиологической оценки качества пахотных зональных почв Молдовы // *Mediul Ambient*, 2010, nr.4(52), p.22-28.
19. Bucur Gh., Nicolaev N., Rurac M., Coltun M., Gnidiuc V. Elaborarea metodelor de sporire a efectului agrotehnic, economic și ecologic al sistemelor de lucrare a solului - *Universitatea Agrară de Stat din Moldova. Facultatea de Agrochimie*, 2007.
20. Благодатский С.А., Благодатская Е.В., Горбенко А.Ю., Паников Н.С. Регидратационный метод определения микробной биомассы в почве // *Почвоведение*, 1987, № 4, с.64-71.
21. Isermeyer H. In: Alef K., Nannipieri P. (Eds.) *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. - London: Academy, 1995, p.214-216.
22. Wardle D. A., Ghani A. A critique of the microbial metabolic quotient (qCO_2) as a bioindicator of disturbance and ecosystem development // *Soil Biol. Biochem.*, 1995, vol.27, p.1601-1610.
23. Аринушкина Е.В. *Руководство по химическому анализу почв*. - Москва: Изд-во МГУ, 1970.
24. Mancinelli R., Campiglia E., Di Tizio A., Marinari S. Soil carbon dioxide emission and carbon content as affected by conventional and organic cropping systems in Mediterranean environment // *Appl. Soil Ecology*, 2010, vol.46, p.134-142.

Prezentat la 02.02.2012

CERCETĂRI CU PRIVIRE LA CARACTERELE CANTITATIVE ALE SPICULUI LA *TRITICUM AESTIVUM* L.

I. DEPENDENȚE CORELAȚIONALE, PARTICULARITĂȚI DE MOȘTENIRE ÎN GENERAȚIA F₁

Ștefan SANDIC, Galina LUPAȘCU, Svetlana GAVZER, Elena SAȘCO

Institutul de Genetică și Fiziologie a Plantelor al AȘM

The paper presents data about the structural elements analysis of winter wheat spike. Through cluster analysis were established different variety groups – parents and hybrids that are similar on the high index value basis. Correlation analysis showed that each cultivar or hybrid has different degree of connection between the investigated elements. Grain weight per spike correlates particularly with the 1000 grain weight. In most cases the production elements were inherited in F₁ as positive dominance or supra-dominance.

Introducere

Asocierea reușită într-un singur soi a caracterelor de interes prin metode de hibridare prezintă o cale reală de obținere a genotipurilor valoroase și durabile. În scopul vizat, este necesară utilizarea unui material inițial bine caracterizat sub aspect genetic. Pentru alegerea corectă a componentilor de hibridare, aceștia trebuie să fie analizați în baza nivelului indicilor de producție, interacțiunilor genice și interdependențelor între diverse însușiri [1,2]. Crearea modelului de soi implică stabilirea legăturilor corelaționale ale diferitelor caractere cantitative importante [3].

În baza analizei corelaționale, s-a constatat că elementul de bază în structura productivității grâului este greutatea boabelor per spic. În dependență de mediu, o influență mare asupra acesteia poate avea numărul de boabe per spic, masa a 1000 de boabe (MMB), înălțimea plantelor și numărul de tulpini productive. La soiurile cu diferită proveniență geografică s-a constatat că productivitatea se formează în baza diferitelor asocieri ale elementelor productivității [4].

Rezultatele analizei corelaționale a legăturilor componentilor de bază ai productivității spicului pot fi utilizate în calitate de teste indirecte la selectarea genotipurilor necesare. Dintre corelațiile elucidate, un interes major prezintă dependențele dintre masa spicului principal, masa boabelor și numărul boabelor per spic [5,6]. S-a constatat o legătură corelațională între MMB, numărul boabelor per spic și masa spicului. La unele soiuri, o importanță mare pentru productivitatea spicului are MMB, la altele – lungimea spicului, numărul spiculețelor, stabilitatea fenotipică a caracterului cantitativ fiind dependentă de soi [7]. Deci, fiecare genotip asigură formarea masei boabelor per spic prin diferite legături corelaționale între elementele de producție ale spicului, în calitate de componenți ai acesteia.

Conform unor opinii, MMB este unicul dintre indicii elementari de bază ai productivității care, în dependență de gradul de interacțiune *genotip x mediu* la etapa de umplere a boabelor, corelează mediu sau puternic cu productivitatea spicului [8].

Scopul cercetărilor a constat în elucidarea nivelului, legăturilor corelaționale și a modului de transmitere ereditară în generația F₁ a unor caractere cantitative valoroase ale spicului la grâul comun de toamnă.

Material și metode

În calitate de material pentru cercetare au servit soiurile-părinți de grâu comun de toamnă, hibridii F₁ și F₂, care au prezentat combinațiile Cobra x Apache, Niconia x Odeschi 267, Select x BȚ 43-02, Căpriană x BȚ 16-04: 1 – Cobra, 2 – F₁ Cobra x Apache, 3 – F₂ Cobra x Apache, 4 – F₂ Apache x Cobra, 5 – Apache, 6 – Selania, 7 – F₁ Selania x Accent, 8 – F₁ Accent x Selania, 9 – Accent, 10 – Niconia, 11 – F₁ Niconia x Odeschi 267, 12 – F₁ Odeschi 267 x Niconia, 13 – F₂ Niconia x Odeschi 267, 14 – Odeschi 267, 15 – Select, 16 – F₁ Select x BȚ 43-02, 17 – F₁ BȚ 43-02 x Select, 18 – F₂ Select x BȚ 43-02, 19 – BȚ 43-02, 20 – Balada, 21 – F₁ Balada x Aluniș, 22 – F₁ Aluniș x Balada, 23 – Aluniș, 24 – Căpriană, 25 – F₁ Căpriană x BȚ 16-04, 26 – F₁ BȚ 16-04 x Căpriană, 27 – F₂ Căpriană x BȚ 16-04, 28 – BȚ 16-04.

Experiențele s-au efectuat în condiții de câmp ale anului 2011. În calitate de caractere metrice au servit lungimea spicului principal, numărul spiculețelor, numărul boabelor și greutatea boabelor per spic, masa a 1000 de boabe (MMB).

În medie, pentru soiurile-părinți au fost analizate câte 40 de spice, pentru hibridii F₁ – 20, pentru hibridii F₂ – 120-140 de spice; în total – 1310 spice.

Analizele clusteriană (metoda *k*-medii), corelațională (*r*) și de scanare multidimensională s-au efectuat în pachetul de soft STATISTICA 7.

Rezultate și discuții

Datele prezentate denotă că valorile medii ale elementelor de structură ale spicului au variat în limite diferite, deviația depinzând de soi/hibrid (Fig.1). Astfel, lungimea spicului a prezentat valorile 8,1...10,9 cm; numărul spiculețelor per spic: 17,6...20,8; numărul boabelor per spic: 40,6...67,3; greutatea boabelor per spic: 1,2...2,6 g.

Masa a 1000 de boabe, determinată în baza mediei generale, a variat în limitele 28,0...38,8 g.

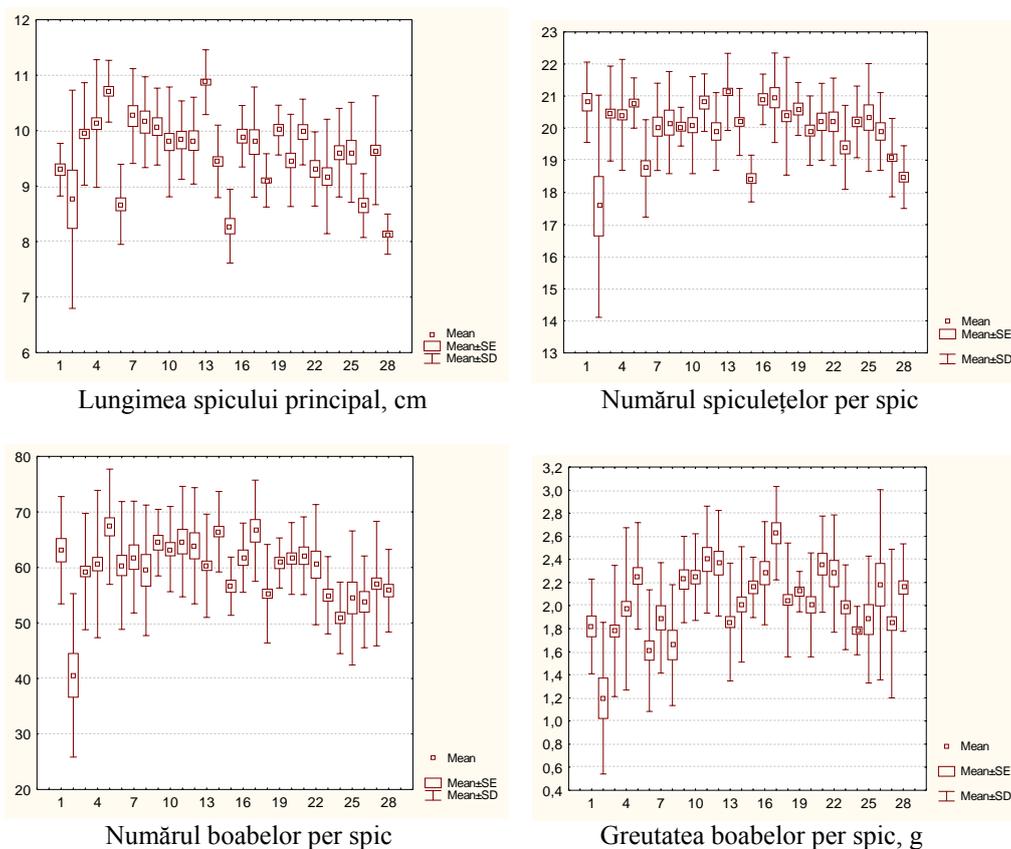


Fig.1. Date comparative ale unor indici de producție ai spicului la grâul comun de toamnă.

Notă: semnificația numerelor 1...28 este indicată în *Material și metode*

În baza analizei clusteriene (metoda *k*-medii), s-a constatat că grupurile de soiuri și hibridi, separate în 3 clustere, s-au deosebit după nivelul și variabilitatea caracterelor cercetate (Tab.1).

Tabelul 1

Nivelul și variabilitatea indicilor de producție în clustere

Caractere	Clusterul 1		Clusterul 2		Clusterul 3	
	Media	σ	Media	σ	Media	σ
Lungimea spicului principal, cm	8,91	0,56	9,79	0,61	9,92	0,35
Numărul spiculețelor per spic	19,34	1,06	20,10	0,72	20,45	0,40
Numărul boabelor per spic	52,81	5,23	61,01	2,52	63,54	2,31
Greutatea boabelor per spic, g	1,92	0,33	1,85	0,14	2,32	0,14
MMB, g	35,71	2,91	30,36	1,93	36,56	1,84

Genotipurile și hibridii din clusterul 3 au prezentat indici de producție avansați și cele mai diminuate valori ale deviației standard pentru indicii cercetați, din care motiv prezintă interes practic.

S-a stabilit că în calitate de membri ai *clusterului 1* au fost: 2 – F₁ Cobra x Apache, 15 – Select, 18 – F₂ Select x BȚ 43- 02, 23 – Aluniș, 24 – Căpriană, 25 – F₁ Căpriană x BȚ 16-04, 26 – F₁ BȚ 16-04 x Căpriană, 28 – BȚ 16-04; ai *clusterului 2*: 1 – Cobra, 3 – F₂ Cobra x Apache, 4 – F₂ Apache x Cobra, 6 – Selania, 7 – F₁ Selania x Accent, 8 – F₁ Accent x Selania, 13 – F₂ Niconia x Odeschi 267, 14 – Odeschi 267, 20 – Balada, 27 – F₂ Căpriană x BȚ 16-04; ai *clusterului 3*: 5 – Apache, 9 – Accent, 10 – Niconia, 11 – F₁ Niconia x Odeschi 267, 12 – F₁ Odeschi 267 x Niconia, 16 – F₁ Select x BȚ 43- 02, 17 – F₁ BȚ 43- 02 x Select, 19 – BȚ 43- 02, 21 – F₁ Balada x Aluniș, 22 – F₁ Aluniș x Balada.

Conform datelor analizei varianței (Tab.2), indicii lungimea spicului și numărul spiculețelor per spic nu au fost relevanți pentru separarea soiurilor/hibridilor F₁ în clustere, întrucât varianța interclusteriană a fost mai mică decât cea intraclusteriană. În cazul numărului, greutatea boabelor per spic și MMB, dimpotrivă, varianța interclusteriană a fost mai mare, ceea ce relevă că norma de reacție a acestor indici este definitorie pentru diferențierea soiurilor/hibridilor F₁ în grupuri distincte.

Tabelul 2

Analiza varianței clusterelor

Caractere	Varianța interclusteriană	Varianța intraclusteriană	F	p
Lungimea spicului principal, cm	5,1725	6,6363	9,743*	0,000
Numărul spiculețelor per spic	5,6145	13,9331	5,037*	0,015
Numărul boabelor per spic	543,4932	296,5665	22,908*	0,000
Greutatea boabelor per spic, g	1,2608	1,0780	14,620*	0,000
MMB, g	221,2739	123,2865	22,435*	0,000

*- p<0,05

Analiza corelațională a indicilor de producție ai spicului pentru fiecare soi și hibrid a demonstrat existența legăturilor de diferit nivel. Astfel, r pentru relațiile 1-2 a variat în limitele 0,29...0,94; 1-3: 0,09...0,96; 1-4: 0,03...0,95; 2-3: 0,07-0,88; 2-4: 0,04...0,83; 3-4: 0,17...0,95 (Tab.3). Rezultatele relevă că greutatea boabelor per spic, în calitate de caracter integral, se formează prin legături corelaționale între componenții săi, specifice pentru fiecare genotip/hibrid. Aceasta este demonstrat și prin scanarea multidimensională (Fig.2): lotul cercetat s-a diferențiat în clustere cu diferit grad de similitudine. În felul acesta, pot fi identificate clustere de soiuri și hibridi cu legături corelaționale înalte sau slabe între componenții de producție ai spicului. De exemplu, F₁ Cobra x Apache (2) s-a distanțat de majoritatea lotului datorită înaltelor legături corelaționale (r=0,83...0,96) între indicii testați, iar soiul Odeschi 267 (14), dimpotrivă – datorită legăturilor slabe (r=0,14...0,49).

Tabelul 3

Analiza corelațională a unor indici de producție la soiurile-părinți și la descendenții F₁, F₂ de grâu

Nr. crt.	Genitor/ hibrid F ₁ , F ₂	Legături între indicii:					
		1-2	1-3	1-4	2-3	2-4	3-4
1	Cobra	0,59*	0,53*	0,51*	0,43	0,28	0,78*
2	F ₁ Cobra x Apache	0,94*	0,96*	0,95*	0,88*	0,83*	0,95*
3	F ₂ Cobra x Apache	0,71*	0,22*	0,05	0,36*	0,24*	0,64*
4	F ₂ Apache x Cobra	0,58*	0,61*	0,39*	0,52*	0,37*	0,71*
5	Apache	0,55*	0,50*	0,32*	0,46*	0,30	0,78*
6	Selania	0,76*	0,67*	0,23	0,73*	0,31*	0,61*
7	F ₁ Selania x Accent	0,87*	0,51*	0,08	0,51*	0,22	0,75*
8	F ₁ Accent x Selania	0,84*	0,75*	0,56*	0,63*	0,42	0,93*
9	Accent	0,41	0,25	0,26	0,68*	0,40	0,65*
10	Niconia	0,94*	0,78*	0,69*	0,70*	0,58*	0,78*
11	F ₁ Niconia x Odeschi 267	0,59*	0,58*	0,34	0,57*	0,55*	0,63*
12	F ₁ Odeschi 267 x Niconia	0,79*	0,38	0,29	0,61*	0,49*	0,64*
13	F ₂ Niconia x Odeschi 267	0,40*	0,29*	0,04	0,41*	0,14	0,64*
14	Odeschi 267	0,49*	0,34*	0,19	0,54*	0,14	0,17
15	Select	0,82*	0,36	0,10	0,40*	0,25	0,83*

16	F ₁ Select x BȚ 43- 02	0,77*	0,09	0,11	0,08	0,04	0,80*
17	F ₁ BȚ 43- 02 x Select	0,90*	0,60*	0,21	0,58*	0,30	0,68*
18	F ₂ Select x BȚ 43- 02	0,41*	0,35*	0,29*	0,46*	0,28*	0,77*
19	BȚ 43- 02	0,50*	0,48*	0,47*	0,52*	0,58*	0,87*
20	Balada	0,92*	0,70*	0,49*	0,68*	0,52*	0,61*
21	F ₁ Balada x Aluniș	0,85*	0,72*	0,41	0,65*	0,36	0,73*
22	F ₁ Aluniș x Balada	0,70*	0,59*	0,47*	0,49*	0,49*	0,82*
23	Aluniș	0,85*	0,72*	0,52*	0,69*	0,46*	0,73*
24	Căpriana	0,29	0,62*	0,60*	0,07	0,16	0,89*
25	F ₁ Căpriana x BȚ 16-04	0,89*	0,71*	0,69*	0,69*	0,65*	0,93*
26	F ₁ BȚ 16-04 x Căpriana	0,55*	0,30	0,26	0,57*	0,46*	0,38
27	F ₂ Căpriana x BȚ 16-04	0,83*	0,63*	0,41	0,74*	0,51*	0,73*
28	BȚ 16-04	0,69*	0,55*	0,03	0,68*	0,30*	0,55*

*- $p < 0,05$

Notă: 1-2 – lungimea spicului - numărul spiculețelor per spic; 1-3 – lungimea spicului - numărul boabelor per spic; 1-4 – lungimea spicului - greutatea boabelor per spic; 2-3 – numărul spiculețelor per spic - numărul boabelor per spic; 2-4 – numărul spiculețelor per spic - greutatea boabelor per spic; 3-4 – numărul boabelor per spic - greutatea boabelor per spic.

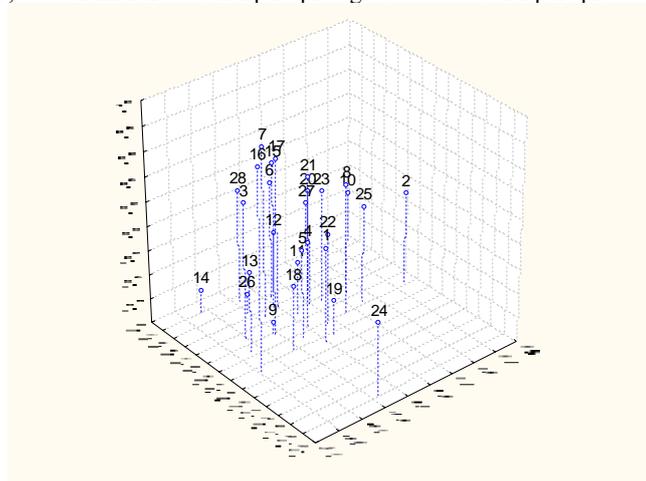


Fig.2. Scanarea multidimensională a soiurilor-părinți și a hibrizilor în baza corelațiilor între caracterele cantitative ale spicului.

Pentru cuantificarea mai exactă a soiurilor și hibrizilor în baza legăturilor corelaționale (slabe, medii, puternice) între caracterele analizate, s-a procedat la analiza clusteriană (*k*-medii) (Fig.3).

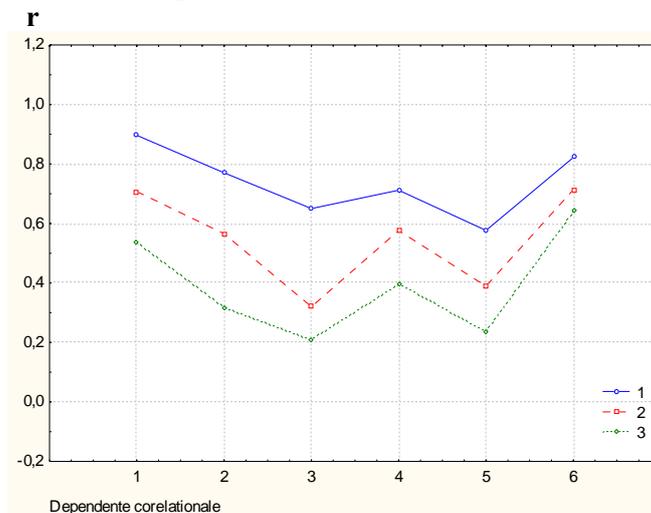


Fig.3. Analiza clusteriană (*k*-medii) a soiurilor-părinți și a hibrizilor F₁, F₂ în baza corelațiilor între caracterele cantitative ale spicului.

Datele obținute relevă ca tendința celor 3 cluster a fost similară: corelații mai înalte pentru relațiile *lungimea spicului – numărul spiculețelor per spic* (1), *numărul boabelor per spic – greutatea boabelor per spic* (6) și corelații diminuate pentru *lungimea spicului – greutatea boabelor per spic* (5). Mediile coeficienților de corelație pentru soiurile/hibridii din clusterul 1 au variat în limitele 0,58...0,90; din clusterul 2: 0,32...0,71; din clusterul 3: 0,21...0,64 (Tab.4).

Tabelul 4

Media coeficienților de corelație în cluster

Caractere	Clusterul 1	Clusterul 2	Clusterul 3
Lungimea spicului – numărul de spiculețe per spic	0,90	0,71	0,54
Lungimea spicului – numărul de boabe per spic	0,77	0,57	0,31
Lungimea spicului – greutatea boabelor per spic	0,65	0,32	0,21
Numărul de spiculețe – numărul de boabe per spic	0,71	0,58	0,40
Numărul de spiculețe – greutatea boabelor per spic	0,58	0,39	0,23
Numărul de boabe – greutatea boabelor per spic	0,82	0,71	0,64

Conform aceleiași analize (*k*-medii), s-a constatat că *clusterul 1* a fost format de genitorii/hibridii: 2 – F₁ Cobra x Apache, 8 – F₁ Accent x Selania, 10 – Niconia, 20 – Balada, 23 – Aluniș, 25 – F₁ Căpriană x BȚ 16-04; *clusterul 2*: 1 – Cobra, 4 – F₂ Apache x Cobra, 5 – Apache, 6 – Selania, 7 – F₁ Selania x Accent, 11 – F₁ Niconia x Odeschi 267, 12 – F₁ Odeschi 267 x Niconia, 17 – F₁ BȚ 43- 02 x Select, 19 – BȚ 43- 02, 21 – F₁ Balada x Aluniș, 22 – F₁ Aluniș x Balada, 27 – F₂ Căpriană x BȚ 16-04, 28 – BȚ 16-04; *clusterul 3*: 3 – F₂ Cobra x Apache, 9 – Accent, 13 – F₂ Niconia x Odeschi 267, 14 – Odeschi 267, 15 – Select, 16 – F₁ Select x BȚ 43- 02, 18 – F₂ Select x BȚ 43- 02, 24 – Căpriană, 26 – F₁ BȚ 16-04 x Căpriană.

Analiza corelațională a dependențelor pentru întreg setul de soiuri/hibridi analizați a demonstrat că cea mai înaltă corelație pozitivă s-a manifestat pentru greutatea boabelor per spic – MMB: 0,80, urmată de lungimea spicului – numărul de spiculețe: 0,73; greutatea boabelor per spic – numărul boabelor per spic: 0,65; numărul spiculețelor per spic – numărul boabelor per spic: 0,64; lungimea spicului principal – numărul boabelor per spic: 0,52 (Tab.5).

Tabelul 5

Analiza corelațională a dependențelor unor caractere cantitative ale spicului

Caractere	r
Lungimea spicului principal – numărul spiculețelor per spic	0,73*
Lungimea spicului principal – numărul boabelor per spic	0,52*
Lungimea spicului principal – greutatea boabelor per spic	0,16
Lungimea spicului principal – MMB	-0,19
Numărul spiculețelor per spic – numărul boabelor per spic	0,64*
Numărul spiculețelor per spic – greutatea boabelor per spic	0,46*
Numărul spiculețelor per spic – MMB	0,09
Numărul boabelor per spic – MMB	0,09
Greutatea boabelor per spic – numărul boabelor per spic	0,65*
Greutatea boabelor per spic – MMB	0,80*

*– p<0,05

Datele obținute relevă că greutatea boabelor per spic, în calitate de caracter integrativ, a depins într-o măsură mai mare de MMB (0,80*) decât de un alt component – numărul boabelor per spic (0,65*). Ambii componenți de producție – MMB și numărul boabelor per spic – pot servi în calitate de factori independenți (x), în baza cărora se elaborează ecuația regresională pentru calculul greutateii boabelor per spic, care prezintă o funcție (dependentă – y). Astfel, pentru predicția relațiilor caracterelor investigate, valabile în primul rând genotipurilor și populațiilor aflate în studiu, ușor pot fi utilizate ecuațiile regresionale indicate în Figura 4.

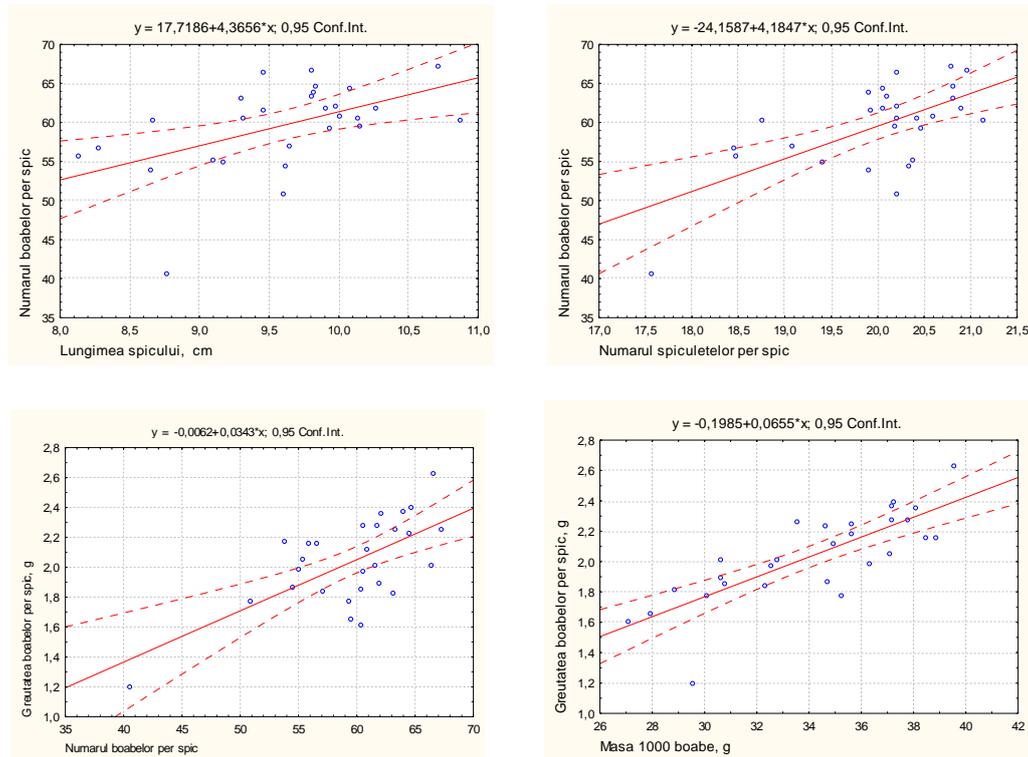


Fig.4. Dependențele regresionale ale unor importanți indici de producție ai spicului.

S-a constatat că nivelul și orientarea gradului de dominație (h_p) a variat în funcție de caracter și combinație. Din 50 de variante (10 combinații x 5 caractere), în 27 cazuri (54%) s-a manifestat supradominația pozitivă a părintelui care mărește caracterul. Frecvența cazurilor de supradominație pozitivă (10 – maximală, după numărul combinațiilor) în cadrul caracterului, în ordinea descreșterii, a fost următoarea: numărul de spiculețe per spic – 8, greutatea boabelor per spic – 7, MMB – 5, lungimea spicului – 4, numărul de boabe per spic – 3. Cele mai înalte valori ale h_p s-au manifestat în cazul greutății boabelor per spic (24,5...36,0) la combinațiile F_1 BȚ 43-02 x Select, F_1 Balada x Aluniș, F_1 Aluniș x Balada (Tab.6).

Tabelul 6

Gradul de dominație a unor indici de producție ai spicului la combinații reciproce de grâu

Combinația	Lungimea spicului	Numărul de spiculețe	Numărul de boabe per spic	Greutatea boabelor în spic	Masa a 1000 de boabe
F_1 Selania x Accent	+1,27	+1,01	-0,26	-0,10	-0,05
F_1 Accent x Selania	+1,11	+1,20	-1,43	-0,84	-0,76
F_1 Niconia x Odeschi 267	+0,03	+13,00	-0,14	+2,25	+1,67
F_1 Odeschi 267 x Niconia	+0,02	-5,00	-0,62	+2,20	+1,62
F_1 Select x BȚ 43- 02	+0,87	+1,28	+1,46	+7,00	+0,25
F_1 BȚ 43- 02 x Select	+0,76	+1,32	+3,78	+24,50	+1,66
F_1 Balada x Aluniș	+4,59	+2,04	+1,15	+36,00	+1,99
F_1 Aluniș x Balada	-0,04	+2,04	+0,66	+28,00	+1,83
F_1 Căpriana x BȚ 16-04	+1,01	+1,15	+0,46	-0,53	-1,29
F_1 BȚ 16-04 x Căpriana	-0,29	+0,65	+0,18	+1,11	-0,77

Deși numărul spiculețelor per spic este un caracter dificil pentru ameliorare în virtutea normei de reacție restrânse, datele obținute relevă că manifestarea fenomenului de supradominație pozitivă oferă șanse de depistare a genotipurilor cu indici înalți ai caracterului în populațiile segregante.

S-au constatat dependențe de nivel mediu între gradul de dominație al greutății boabelor per spic și lungimea spicului (0,54), numărul de boabe per spic (0,62) și MMB (0,70). Se poate presupune că aceste carac-

tere sunt controlate de sisteme genice comune. De menționat că nivelul și orientarea h_p au variat semnificativ la majoritatea hibridilor reciproci, ceea ce denotă implicarea factorului matern în interacțiunile alelice care controlează fenotipul caracterelor cantitative analizate.

Concluzii

1. Soiurile și hibridii F_1 , F_2 de grâu comun de toamnă se deosebesc în baza elementelor de producție ale spicului – lungimea spicului principal, numărul spiculețelor, numărul boabelor și greutatea boabelor per spic, masa a 1000 de boabe, ceea ce face posibilă separarea acestora în clustere distincte.

2. Greutatea boabelor per spic, în calitate de indice integral de producție al spicului, corelează pozitiv, în special, cu masa a 1000 de boabe ($r=0,80^*$) și cu numărul boabelor per spic ($r=0,65^*$), iar între ultimii 2 indici nu există corelații.

3. Greutatea boabelor per spic (y) prezintă dependență regresională cu masa a 1000 de boabe (x): $y=-0,1985 + 0,0655 x$, iar cu numărul boabelor per spic (x): $y=-0,0062 + 0,0343 x$.

4. Prin analiză clusteriană (k -medii) s-a constatat că soiurile și hibridii F_1 , F_2 de grâu comun de toamnă se diferențiază puternic nu doar în baza nivelului indicilor de producție ai spicului, ci și în baza gradului de dependență între aceștia. Soiurile-părinți Niconia, Balada, Aluniș și hibridii F_1 Cobra x Apache, Accent x Selania, Căpriana x BȚ 16-04 prezintă cele mai înalte dependențe corelaționale (0,58...0,90) între caracterele analizate.

5. La hibridii F_1 , în majoritatea cazurilor (54%) s-a manifestat supradominația pozitivă a alelelor care măresc elementele de producție ale spicului. Gradul de dominanță al greutateii boabelor per spic corelează cu gradul de dominanță al numărului boabelor per spic ($r=0,62^*$) și al masei a 1000 de boabe ($r=0,72^*$), ceea ce atestă controlul genetic comun al acestor caractere.

Referințe:

1. Giura A. și colab. Cercetări de genetică efectuate la Fundulea, 2007, vol. LXXV (jubiliar), p.25-42.
2. Hristov N., Mladenov N., Kondic-Spika A. et al. Effect of environmental and genetic factors on the correlation and stability of grain yield components in wheat // Genetika, 2011, vol. 43, no 1, p.141-152.
3. Тищенко В.Н., Чекалин Н.М. Корреляционно-регрессионный анализ количественных признаков у озимой мягкой пшеницы: Генетические корреляции между количеством междоузлий и другими признаками и индексами у селекционных линий озимой пшеницы // Генетические основы адаптивной селекции озимой пшеницы в зоне лесостепи. - Полтава, 2005, с.55-60.
4. Никитина В.И. Изменчивость хозяйственно-ценных признаков яровой мягкой пшеницы и ячменя в условиях лесостепной зоны Сибири и ее значение для селекции: Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. - Красноярск, 2007.
5. Munir M., Chowdhry M.A., Malik T.A. Correlation studies among yield and its components in bread wheat under drought conditions // J. Agri. Biol., 2007, vol.9 (2), p.287-290.
6. Akram Z., Ajmal S.U., Munir M. Estimation of correlation coefficient among some yield parameters of wheat under rainfed conditions // Pak. J. Bot., 2008, vol.40 (4), p.1777-1781.
7. Иващенко В.В. Селекционно-генетическая оценка количественных признаков сортов озимой мягкой пшеницы по адаптивности в связи с селекцией на гомеостатичность: Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. - Краснодар, 2002.
8. Никитина В.И. Изменчивость хозяйственно-ценных признаков яровой мягкой пшеницы и ячменя в условиях лесостепной зоны Сибири и ее значение для селекции: Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. - Красноярск, 2007.

Prezentat la 07.03.2012

CERCETĂRI CU PRIVIRE LA CARACTERELE CANTITATIVE ALE SPICULUI LA *TRITICUM AESTIVUM* L.

II. MANIFESTAREA VARIABILITĂȚII TRANSGRESIVE ÎN GENERAȚIA F₂

Galina LUPAȘCU, Ștefan SANDIC, Svetlana GAVZER, Elena SAȘCO

Institutul de Genetică și Fiziologie a Plantelor al AȘM

This article presents data on the level and frequency of positive transgressions for the production elements of winter common wheat. It was established that genotypic factor is of great importance in the expression of transgressive potential of hybrid combinations. Were obtained the data on the level of dependency for the relations of transgressions with the degree of dominance, genetic distances of parents, also on the distribution of phenotypic classes in parental and segregating F₂ populations.

Introducere

Ameliorarea plantelor autogame, inclusiv a grâului, depinde de obținerea selectanților homozigoți, superiori genotipurilor parentale. Segregarea transgresivă poate fi un factor-cheie în ameliorarea plantelor de cultură. Fenomenul se manifestă la generația F₂ sau la generații mai târzii, prin fenotipuri care depășesc norma de reacție a populațiilor parentale din care au provenit [1]. Indicii de bază ai transgresiilor sunt nivelul și frecvența acestora în populație [2]. Plantele particulare transgresive, observate în generațiile timpurii (F₂, F₃), pot fi heterozigote, din care motiv superioritatea lor nu se menține în generațiile ulterioare. Frecvența transgresiilor în populațiile homozigote depinde de combinație, adică de genotipurile părinților implicați în încrucișare. Întrucât ameliorarea însușirilor grâului și ale altor culturi autogame este dificilă, obiectivul major al geneticienilor și al amelioratorilor este stabilirea metodelor eficiente de elucidare a genotipurilor parentale de interes practic. Rода nu poate fi mărită *ad infinitum* din cauza diferitelor restricții – genetice, fiziologice și morfologice. Frecvența joasă a efectelor transgresive poate fi consecința *linkage*-ului la etapa de combinare a părinților. S-a constatat implicarea efectelor de interacțiune genică în manifestarea transgresivă a caracterelor. Un aspect important este pronosticul condițiilor și al frecvenței transgresiilor în populațiile homozigote. Unii autori consideră că segregarea transgresivă se întâlnește mai frecvent, în cazul când diferența dintre părinți este mică, iar varianța aditivă – înaltă. Această predicție poate fi făcută, totuși, în cazul lipsei interacțiunilor *genotip x mediu*, epistaziilor și *linkage*-ului între genele responsabile de caracterul biometric cercetat [3]. Relativ recent, distanțele genetice între părinți, evaluate în baza markerilor moleculari, promiteau o capacitate de predicție eficientă pentru performanța descendenților. Buirkhamer et al. (1998), examinând asociațiile între distanțele/similitudinile genetice ale părinților în baza markerilor moleculari (STS-PCR, AFLP) și varianța genetică a liniilor F₃, F₅ provenite dintr-o singură sămânță, au ajuns la concluzia că distanța genetică nu prezintă un criteriu pentru varianța genetică a descendenților și numărul segreganților transgresivi [4]. Din punct de vedere teoretic, stabilirea metodelor eficiente de selecție este ușoară, însă în practică aceasta nu este simplu din cauza *linkage*-ului frecvent între caracterele cantitative, care pune în dificultate obținerea rezultatelor imediate în cadrul programelor de ameliorare. La orz, a fost stabilită dependența între frecvența transgresiilor, nivelul heterozisului și varianța alelelor favorabile la genotipurile parentale [5-7].

În prezent se recunoaște că nu există o teorie convingătoare despre fenomenul de transgresie a caracterelor, nici explicații unice și adecvate ale acestui fenomen genetic. Cu toate acestea, se fac încercări de elaborare a metodelor eficiente de selecție transgresivă [8].

Scopul cercetărilor a constat în elucidarea potențialului transgresiv al unor caractere cantitative ale spicului principal la grâul comun de toamnă și a dependențelor acestuia de unii factori genetici importanți.

Material și metode

În calitate de material pentru cercetare au servit soiurile-părinți de grâu comun de toamnă, hibridii F₁ și F₂, care au prezentat combinațiile Cobra x Apache, Niconia x Odeschi 267, Select x BȚ 43-02, Căpriană x BȚ 16-04.

Experiențele s-au efectuat în condiții de câmp 2011, în 2 repetiții, amplasate în blocuri randomizate. În calitate de caractere metrice au servit lungimea spicului principal, numărul spiculețelor, numărul boabelor și

greutatea boabelor per spic, masa a 1000 de boabe (MMB). În total au fost apreciate 1070 de spice: câte 40 pentru genitori, 20 – F₁ și 120-140 – F₂.

Gradul și frecvența transgresiilor au fost calculate conform autorilor Воскресенская, Шпот [7]. Analizele clusteriană (dendrograma de repartiție – metoda *Unweighted Pair-Group Average*) și corelațională (r) s-au efectuat în pachetul de soft STATISTICA 7.

Rezultate și discuții

Genitorii luați în studiu au prezentat următoarele medii pentru lungimea spicului, numărul spiculețelor, numărul boabelor per spic și greutatea boabelor per spic: $9,4 \pm 0,3$; $20,0 \pm 0,3$; $60,5 \pm 2,0$; $2,1 \pm 0,1$, respectiv. Deviațiile standard au fost mai mari în cazul numărului boabelor per spic (5,7), dar mai mici – pentru greutatea boabelor per spic (0,1). Astfel, genotipurile s-au deosebit cel mai mult în baza primului indice (Fig.1).

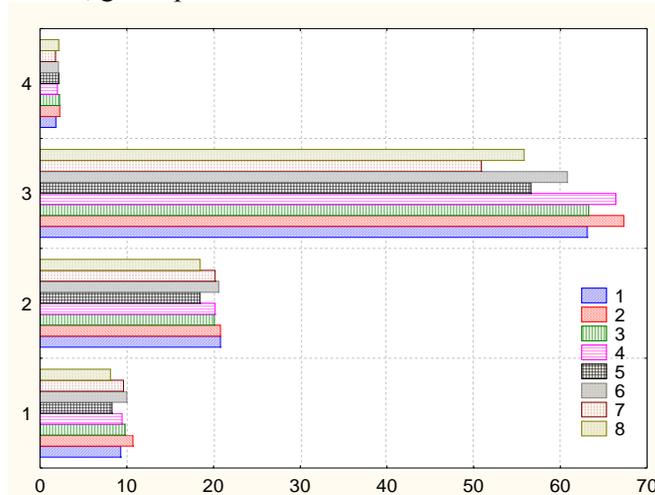


Fig.1. Nivelul unor indici cantitativi la soiurile-părinți de grâu.

Pe orizontală: 1 – lungimea spicului principal, 2 – numărul de spiculețe per spic, 3 – numărul de boabe per spic, 4 – greutatea boabelor per spic.

Pe verticală în dreapta: 1 – Cobra, 2 – Apache, 3 – Niconia, 4 – Odeschi 267, 5 – Select, 6 – BȚ 43-02, 7 – Căpriana, 8 – BȚ 16-04

Prin analiza dendrogramei de repartiție s-a constatat că gradul de similitudine/deosebire între genitori, evaluat în baza distanțelor euclidiene, conform lungimii spicului, numărului spiculețelor și boabelor per spic, greutatea boabelor per spic și MMB, a variat în limitele 0,9... 16,6, respectiv, pentru Select – BȚ 16-04 și Apache – Căpriana (Fig.2, Tab.1).

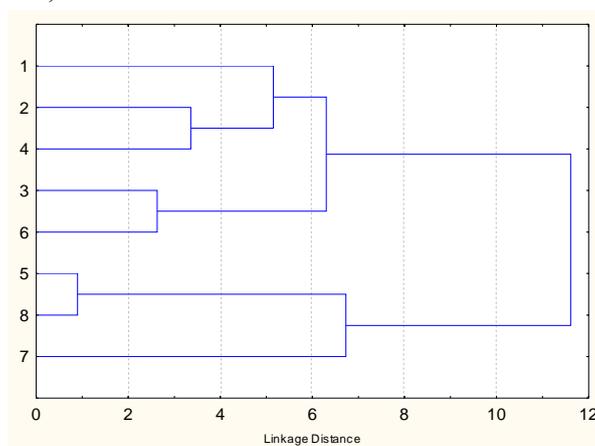


Fig.2. Dendrograma de repartiție a genitorilor de grâu în baza unor indici cantitativi ai spicului.

1 – Cobra, 2 – Apache, 3 – Niconia, 4 – Odeschi 267, 5 – Select, 6 – BȚ 43-02, 7 – Căpriana, 8 – BȚ 16-04

Tabelul 1

Matrița distanțelor euclidiene între genitorii de grâu

Genotip	1	2	3	4	5	6	7	8
1	0,0							
2	6,5	0,0						
3	6,8	4,7	0,0					
4	3,8	3,4	5,9	0,0				
5	11,9	12,3	7,6	12,7	0,0			
6	6,6	6,7	2,6	7,2	6,1	0,0		
7	13,8	16,6	12,4	16,2	6,9	9,9	0,0	
8	12,6	13,1	8,5	13,6	0,9	6,9	6,5	0,0

1 – Cobra, 2 – Apache, 3 – Niconia, 4 – Odeschi 267, 5 – Select, 6 – BȚ 43-02, 7 – Căpriana, 8 – BȚ 16-04

Aceasta relevă o bună diferențiere a genotipurilor utilizate în calitate de părinți, întrucât au prezentat niveluri diferite ale caracterelor cantitative – însușire utilă pentru cercetarea transgresiilor.

În scopul elucidării distanțelor genotipice între genitori pentru fiecare din caracterele analizate, s-a procedat la calculul raportului (%) acestora față de un soi de referință – soiul standard Odeschi 51, considerându-se că diferențele de acesta reflectă și deosebirile între genitori. Distanțele genotipice între părinți au variat în funcție de caracterul cantitativ, în limitele 3,9...19,3; 0,1...11,4; 5,8...9,0; 1,9...20,8% pentru lungimea spicului principal, numărul spiculețelor, numărul boabelor și greutatea boabelor per spic, respectiv (Tab.2).

Tabelul 2

Diferențele între genitori în baza unor caractere cantitative

Genitori	Lungimea spicului, %	Diferențe între părinți, %	Numărul spiculețelor per spic, %	Diferențe între părinți, %	Numărul boabelor per spic, %	Diferențe între părinți, %	Greutatea boabelor per spic, %	Diferențe între părinți, %
Cobra	103,7	15,7	109,3	0,1	115,4	7,7	86,3	20,8
Apache	119,4		109,2		123,1		107,1	
Niconia	109,3	3,9	105,6	0,5	115,7	5,8	106,6	11,3
Odeschi 267	105,4		106,1		121,5		95,3	
Select	92,3	19,3	96,8	11,4	103,5	7,7	102,4	1,9
BȚ 43-02	111,6		108,2		111,2		100,5	
Căpriana	107,0	16,4	106,1	9,0	93,1	9,0	84,4	18,0
BȚ 16-04	90,6		97,1		102,1		102,4	

Cele mai mici diferențe între soiurile-părinți s-au manifestat în cazul numărului de boabe per spic, iar cele mai mari – în cazul greutateii boabelor per spic.

Calculul transgresiilor pozitive în populația F_2 , a demonstrat diferențe semnificative între combinații, atât în cazul gradului, cât și privind frecvența acestora, ceea ce relevă rolul important al factorului genotip și al interacțiunii între genitori la formarea caracterelor cantitative ce depășesc cel mai bun părinte (Tab.3).

Caracterele cercetate s-au diferențiat după capacitatea de manifestare a transgresiilor. Cele mai pretabile în acest sens s-au dovedit a fi lungimea spicului (cu excepția combinației Select x BȚ 43-02), urmată de greutatea boabelor per spic și numărul boabelor per spic.

Din 5 combinații, doar Select x BȚ 43-02 a prezentat transgresii semnificative pentru numărul spiculețelor per spic. Întrucât acest caracter are normă de reacție restrânsă și, deci, este destul de dificil a ameliora prin procedee de selecție, combinația prezintă interes practic deosebit.

Tabelul 3

**Nivelul transgresiilor pozitive pentru unii indici de producție
la grâul comun de toamnă**

Combinăție	Lungimea spicului		Numărul spiculețelor		Numărul boabelor per spic		Greutatea boabelor per spic	
	Grad, %	Frecvență, %	Grad, %	Frecvență, %	Grad, %	Frecvență, %	Grad, %	Frecvență, %
Cobra x Apache	2,6	2,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,8
Apache x Cobra	11,3	10,0	0,0	0,0	1,49	1,7	10,4	3,3
Niconia x Odeschi 267	19,7	72,5	0,0	0,0	0,0	0,0	4,9	2,5
Select x BȚ 43-02	0,0	0,0	9,5	21,5	9,4	7,5	17,5	12,5
Căpriană x BȚ 16-04	7,2	16,6	2,9	1,7	13,5	10,8	11,1	4,2

Combinăția hibridă reciprocă Cobra x Apache/Apache x Cobra a prezentat valori diferite pentru gradul și frecvența transgresiilor (cu excepția numărului spiculețelor per spic), ceea ce denotă influența factorului matern în manifestarea fenomenului.

S-au constatat dependențe pozitive înalte (0,93...1,00) între gradul și frecvența transgresiilor caracterelor examinate (Tab.4). Aceasta are o mare importanță pentru elucidarea populațiilor hibride de grâu comun de toamnă care conțin un număr mare de plante transgresive.

Tabelul 4

**Dependența corelațională între gradul și frecvența transgresiilor pozitive
pentru unele caractere valoroase la grâul comun de toamnă**

Caractere	r
Lungimea spicului principal	0,99*
Numărul spiculețelor per spic	0,97*
Numărul boabelor per spic	1,00*
Greutatea boabelor per spic	0,93*

* $p < 0,05$

În scopul elucidării posibilității de predicție a potențialului transgresiv în populațiile F_2 , în baza gradului de dominație a caracterului la hibridii F_1 , s-a procedat la analiza corelațională a acestora pentru fiecare caracter. Astfel, s-a constatat lipsa corelației pentru lungimea spicului, corelații medii nesemnificative statistic (0,35...0,61) pentru numărul spiculețelor și boabelor per spic și corelații înalte veridice (0,83...0,89) – în cazul greutateii boabelor per spic (Tab.5).

Tabelul 5

**Dependența corelațională între potențialul transgresiv pozitiv în F_2
și gradul de dominație a caracterului în generația F_1**

Caractere	Gradul transgresiilor	Frecvența transgresiilor
Lungimea spicului principal	0,07	0,09
Numărul spiculețelor per spic	0,44	0,35
Numărul boabelor per spic	0,61	0,61
Greutatea boabelor per spic	0,83*	0,89*

* – $p < 0,05$

S-a stabilit existența corelațiilor înalte ale gradului și frecvenței transgresiilor pentru relațiile *numărul spiculețelor per spic – greutatea boabelor per spic*, dar mai diminuate pentru *numărul boabelor per spic – greutatea boabelor per spic* (Tab.6).

Tabelul 6

Dependența corelațională între diferite tipuri de transgresii

Caractere	Gradul transgresiilor	Frecvența transgresiilor
Numărul spiculețelor per spic – greutatea boabelor per spic	0,93*	0,98*
Numărul boabelor per spic – greutatea boabelor per spic	0,79*	0,56

* $p < 0,05$

Aceasta relevă importanța identificării populațiilor segregante F_2 cu potențial înalt al transgresiilor pozitive în ceea ce privește caracterul *numărul spiculețelor per spic*.

Prin analiza histogramelor de distribuție a plantelor (spicului principal) la combinația Căpriana x BȚ 16-04, în baza greutății boabelor per spic, s-a constatat că deși părinții au prezentat repartiții cu abateri de la distribuția normală, populația F_2 a fost practic simetrică, unimodală (Fig.3).

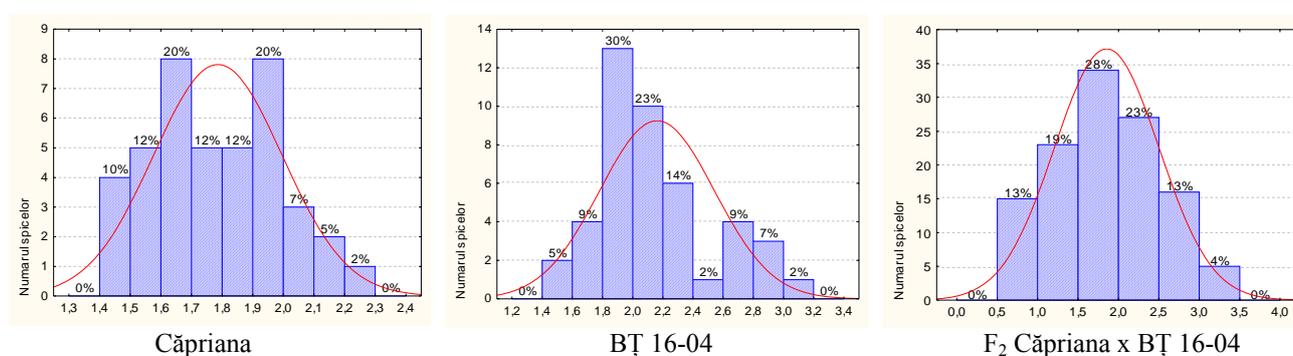


Fig.3. Repartiția fenotipică a plantelor în baza *greutății boabelor per spic* la părinți și hibridii F_2 de grâu.

Fenomenul relevă că procesele recombinabile în genotipurile F_1 asigură manifestarea tuturor alelelor implicate în formarea caracterului, deci obținerea unui spectru larg de clase fenotipice, ceea ce creează o bază genetică diversă a genotipurilor obținute.

Concluzii

1. Gradul și frecvența transgresiilor pozitive ale elementelor de producție a spicului la grâu comun de toamnă diferă puternic la combinațiile hibridelor F_2 , ceea ce relevă importanța genotipurilor implicate în hibridare.

2. S-au constatat corelații pozitive înalte (0,93...1,0) între gradul și frecvența transgresiilor pozitive pentru elementele de producție a spicului, ceea ce oferă șanse de reușită la identificarea populațiilor hibride cu număr mare de genotipuri care prezintă aceste caractere.

3. Distanțele genetice între soiurile-părinți corelează negativ (-0,77...-0,97) cu gradul și frecvența transgresiilor, în cazul lungimii spicului și greutății boabelor per spic, și pozitiv (0,76...0,89) – cu numărul spiculețelor per spic și cu numărul boabelor per spic.

4. S-a constatat o corelație pozitivă înaltă (0,83; 0,89) între gradul/frecvența transgresiilor în F_2 și gradul de dominație a greutății boabelor per spic în generația F_1 , ceea ce are importanță predictivă pentru identificarea populațiilor F_2 cu potențial transgresiv înalt.

Referințe:

- Rieseberg L.H. et al. Transgressive segregation, adaptation and speciation // *Heredity*, 1999, no.83, p.363-37.
- Донцова А.А., Филиппов Е.Г. Типы наследования по признаку «высота растений» у гибридов F_2 озимого ячменя // *Научный журнал Куб.ГАУ*, 2011, №66(02), с.1-10.
- Kuczynska A., Surma M., Adamski T. Methods to predict transgressive segregation in barley and other self-pollinated crops // *J. Appl. Genet.*, 2007, no.48 (4), p.321-328.

4. Ibidem.
5. Powell W., Thomas W. A comparison of the phenotypic distribution of single seed descent families and second cycle hybrids in barley // *J. Genet. Breed.*, 1992, no.46, p.91-98.
6. Surma M. Biometryczno-genetyczna analiza cech iloociowych mieszańców i linii podwojonych haploidów jęczmienia jarego // *Rozprawy i Monografie*. - Poznań, 1996, p.110.
7. Surma M. et al. Phenotypic distribution of barley SSD lines and doubled haploids derived from F₁ and F₂ hybrids // *Euphytica*, 2006, no.149, p.19-25.
8. Радченко И.Н. Проявление положительной трансгрессивной изменчивости по элементам продуктивности колоса у гибридов F₂ озимой мягкой пшеницы // *Селекция і насінництво*, 2008. Вип.96, с.72-79.

Prezentat la 07.03.2012

ФОТОСИНТЕТИЧЕСКАЯ ПРОДУКТИВНОСТЬ СОРТОВ ПЕРСИКА ПРИ РАЗЛИЧНОЙ НАГРУЗКЕ ПЛОДАМИ

Раиса МАЛИНА, Георгий ШИШКАНУ, Нина ТИТОВА

Институт генетики и физиологии растений АН Молдовы

A fost studiată productivitatea fotosintetică la plantele de piersic, soiurile *Collins*, *Молдавский желтый* și *Redhaven* ce se deosebeau prin conținutul de fructe în condiții de lizimetru. Cercetările au fost efectuate pe parcursul perioadei de vegetație. A fost determinată intensitatea fotosintezei, respirației și transpirației, de asemenea conținutul de pigmenți și monitorizarea procesului de productivitate. Au fost stabiliți indicii ce caracterizează plantele cu productivitate înaltă și stabilită influența reglatoare a centrelor de atracție asupra activității fotosintetice la pomii roditori.

The photosynthetic productivity of peaches of the following kinds: *Kollins*, *Moldavskii jeltii* and *Redhaven* have been studied with different fruit load in the conditions of lysimetres. The fruit-bearing trees have been studied during the season according to vegetation phases. CO₂exchange of gases, transpiration and respiration, composition and quantity of photosynthetic de pigments, as well as the monitoring of production process have been established. The characteristics of highly productive plants have been discovered, the regulating influence of the quantity of attraction centres on the photosynthetic activity of fruit-bearing plants has been established.

Введение

Суммарная продуктивность персиковых насаждений складывается из индивидуальных особенностей каждого дерева, которая, в свою очередь, зависит от генетики сорта и его происхождения, совместимости привоя и подвоя, приспособленности к местным климатическим условиям, реализации потенциальных возможностей растения в конкретных экологических условиях. Связь отдельных признаков, характеризующих фотосинтетическую активность растений и их продуктивность, носит, как правило, сложный, далеко не прямолинейный характер, во многом еще недостаточно изучена и зависит от культуры и условий ее возделывания [1-3]. В задачу исследований входило определение показателей высокопродуктивных деревьев персика некоторых сортов, сохраняющих стабильный урожай при различных погодных условиях и эффективно использующих фотосинтетический потенциал для образования плодов.

Материалы и методы

Исследования фотосинтетической активности персика проводились в 2010-2011гг. на 5–6-летних растениях, произрастающих в лизиметрах. Календарные даты приведены на 2011 год. В лизиметрах поддерживался оптимальный режим влажности почвы, плотность размещения деревьев двухрядная, м²/м², между блоками расстояние 1,5 м. Были изучены три сорта персика: Коллинс, Редхавен, Молдавский желтый. Деревья были разделены на две группы в зависимости от величины нагрузки плодами: вариант А – нагрузка была от 15 до 25 завязей, в варианте Б она составила 40-60 завязей на одно дерево. В течение периода вегетации от распускания почек до опадения листьев по фазам развития изучали фотосинтетический и дыхательный газообмен, транспирацию с помощью прибора РТМ-48[4], дыхание листьев и плодов на аппарате Варбурга [5], вели учет листовых параметров. Количественный и качественный состав фотосинтетических пигментов определялся на спектрофотометре СФ Т60U [6]. Мониторинг индекса хлорофилла регистрировался хлорофиллометром СМ-1000 [7]. В конце вегетации проводилась регистрация ростовых и продукционных процессов согласно вариантам опыта [8].

Результаты и их обсуждение

Известно, что обмен веществ, его интенсивность и общая направленность определяют характер развития растения, прохождение отдельных этапов онтогенеза. На каждом из этапов происходит переключение в системе донор – акцептор, которое служит сигналом для активирования синтеза новых ферментных белков и одновременно ингибирования предыдущих процессов. Переключение метаболических реакций организма составляет основу всех переломных моментов в жизненном цикле растения, складывающемся из определенных фаз развития. По нашему мнению, в сезонной вегетации персика можно условно выделить шесть ключевых моментов. Первая фаза – это раскрытие

почек и цветение, она продолжалась 21 день, с 22 апреля по 10 мая. Цветение персика наступает одновременно с распусканием листовых почек за счет запасов метаболитов, накопленных в побегах и корнях. Вторая фаза – интенсивный рост побегов и формирование листового полога, активное деление и растяжение клеток, ювенильный период для всех органов, продолжалась около 40 дней, с 11 мая по 15 июня. Третья фаза – зрелость листьев, при которой включается главный акцептор – плодообразование, и происходит дифференциация и созревание эндосперма (16.06-01.07). Четвертая фаза – созревание плодов, когда внутренние изменения проявляются явно в виде качественных структурных преобразований околоплодника разрыхлением его клеток, накоплением сахаров, эфиров, изменением окраски фруктов (08.07-10.08). В пятой фазе все ростовые функции были, в основном, приостановлены, так как происходил самый энергоемкий процесс – подготовка, закладка урожая будущего года, структурирование почек и созревание побегов (10.08-24.08). Шестая фаза – подготовка к периоду покоя, сопровождалась оттоком ассимилятов в побеги и корни и длилась с 25 августа до конца октября.

Таким образом, сезонный цикл развития растений персика разных сортов включает активные и скрытые фазы, короткие и длительные переходы от одного состояния к другому. С 3-4-летнего возраста молодые саженцы выходят на стабильный режим вегетации, образуется ценоз, функционирующий как единый организм, с достаточно устойчивой биологической продуктивностью [9]. Внутри садового сообщества отдельные деревья в разные годы значительно различаются по урожаю. Одной из задач исследования было выявить причины этой разнокачественности и определить достаточно стабильные по урожайности экземпляры. Установлено, что у растений с большой нагрузкой плодами (вариант Б) четко проявляется смена акцептора, передача основного импульса развития: листья-плоды-побеги, явно выражены три подъема кривой, угол ее наклона достигает 60-70° и практически дублируется при устойчивой работе листового аппарата. При незначительной нагрузке плодами (вариант А) отмечены плавные переходы между фазами и угол наклона кривой значительно ниже (рис.1,2). Аналогичные схемы получены и для других сортов. Различия между вариантами А и Б сохраняются по годам, состав группы может меняться.

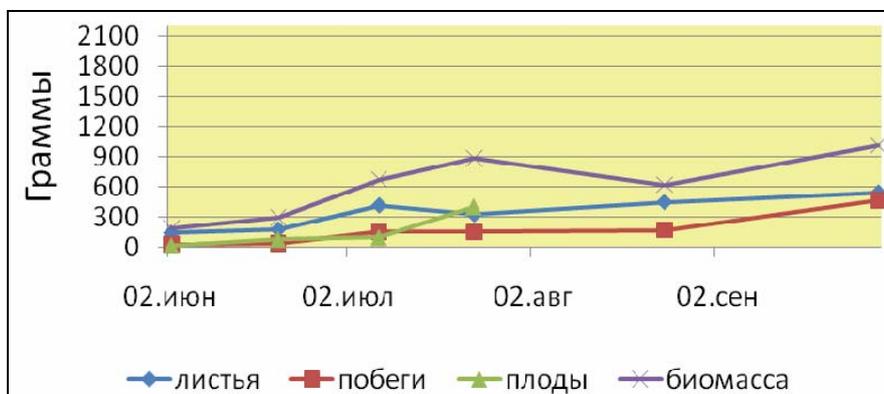


Рис.1. Динамика накопления сухого вещества, 2011 г., Молдавский жёлтый (А).

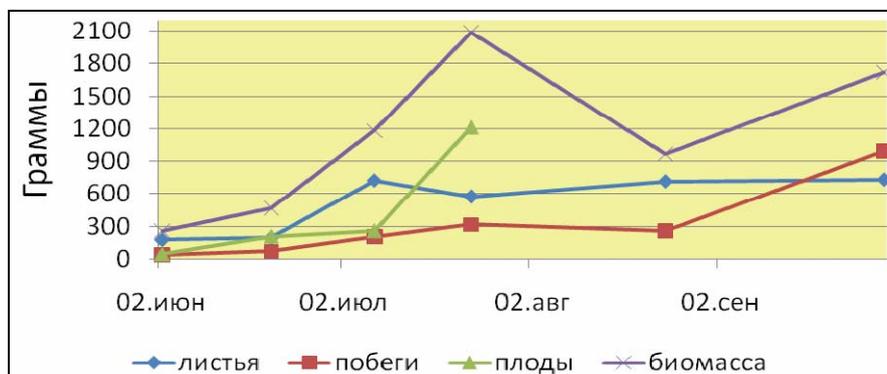


Рис.2. Динамика накопления сухого вещества, 2011 г., Молдавский жёлтый (Б).

Первый этап сезонной вегетации многолетнего растения происходит за счет накопленных запасов пластических веществ в корнях и скелетных ветвях. Раскрытие почек и интенсивный рост побегов формируют габитус дерева. Интенсивное разворачивание листовой поверхности опережает нарастание их массы. Все части растения в этот период содержат большое количество воды, до 75-80%. От скорости раскрытия и устойчивой работы листьев зависит формирование остальных органов растения, поэтому именно листья первыми достигают зрелости. Косвенным показателем зрелого органа служит оводненность органа. Для листьев этот показатель находится в пределах 65-70%, который в норме сохраняется до конца сезона при регулировании режима полива. Более точно зрелое состояние листьев можно зафиксировать, измеряя индекс хлорофилла (ИХл) хлорофиллометром СМ-1000. У молодых листьев ИХл быстро нарастает, достигая определенной стабильной величины, которая указывает на полную готовность развитых листьев к фотосинтезу. В этот период их показатели максимальны. Первые зрелые листья на персике появились в конце мая, а в середине июня их начитывалось до 7-9. Скорость роста побегов и, соответственно, нарастание площади листьев в этот период у варианта Б в 1,5-1,7 раза больше, чем в первой группе. У них также отмечены максимальные показатели ИХл. Эти признаки могут быть использованы для ранней диагностики высокоурожайных сортов. Во второй половине июня листья достигли своего оптимального развития, за счет структурных элементов и количества хлорофилла увеличилась толщина листа. Наступил самый ответственный период в жизни многолетнего растения – плодообразование и созревание плодов. «Биохимическая лаборатория листа» находилась на пике интенсивности работы, максимально высокие показатели всех изучаемых параметров приходились именно на эту фазу. Деревья варианта Б, с большой нагрузкой плодами, отличались рядом особенностей. На уровне органа они обладали повышенной на 15-20% массой одного листа, увеличенной на 15-25% удельной поверхностной плотностью листа (УППЛ). На уровне целостного растения – большей скоростью формирования листьев. На уровне структурных элементов урожайные деревья отличались повышенным на 20-25% содержанием хлорофилла и особенно каротиноидов, которое сохранялось на протяжении всего периода вегетации (рис.3) и проявляется ежегодно. На уровне биохимических и биофизических реакций, отражающих качество работы фотосинтетического аппарата (ФА), результаты выглядели следующим образом. Интенсивность фотосинтеза и транспирации в период созревания плодов у вариантов с большой нагрузкой плодами увеличена в 2-4 раза по сравнению с группой А. Дыхание листьев, определенное по методу Варбурга, в варианте Б было в 2-3 раза выше и это различие сохранялось на протяжении всего сезона. Закономерность для вышеперечисленных показателей проявлялась в разные годы, хотя абсолютные значения могли быть иными.

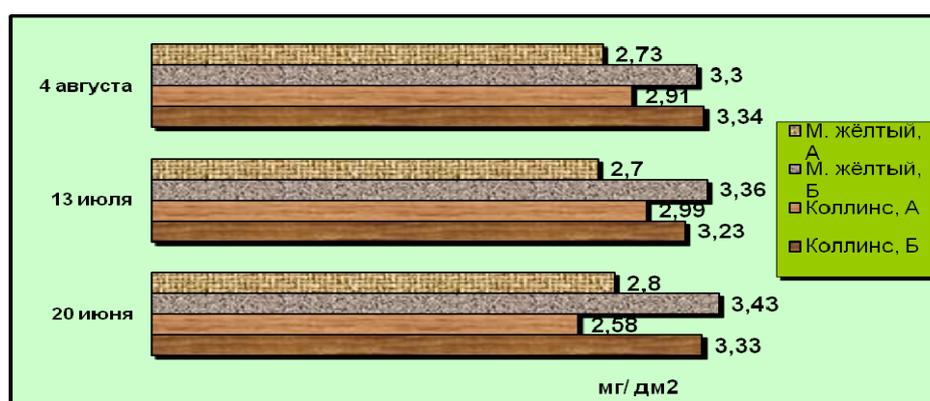


Рис. 3. Содержание хлорофилла а + б в листьях персика, 2011 г.

У растений с большой нагрузкой плодами, по мнению Мокроносова А.Т. [10], смещаются донорно-акцепторные связи и усиливается нагрузка на фотосинтетический аппарат со стороны аттрагирующих центров, что вызывает интенсификацию фотосинтеза. Но высокая удельная активность фотосинтеза становится фактором высокого урожая лишь при условии, что этот признак сочетается с хорошим ассимиляционным потенциалом дерева и с оптимальной структурой ростовых процессов (см. таблицу).

Таблица

СО₂-газообмен листьев персика, 2010-2011гг.

Варианты	Интенсивность фотосинтеза, мкмольСО ₂ /м ² *с		Дыхание, мкмольСО ₂ /м ² *с		Транспирация, мг/ м ² *с		Интенсивность дыхания по Варбургу, мкл/час*г	
	2010	2011	2010	2011	2010	2011	2010	2011
Коллинс, Б	17.1	9,8	3.3	2,7	39.1	23,7	602	304
Коллинс, А	5.0	2,1	2.2	1,3	16.3	7,2	130	23
Молдавский желтый, Б	18.0	12,7	3.6	2,8	54.7	28,7	530	282
Молдавский желтый, А	3.8	5,6	3.3	2,3	11.7	14,0	68	69
Редхавен, А	-	7,5	-	2,3	-	22,9	94	326

Фотосинтез является единственным источником энергии новообразования органических веществ в растении. Именно этот процесс, при помощи которого создается 90-95% сухого вещества всего растения, определяет продуктивность. Однако для получения высокого урожая ФД должна быть сопряжена со всеми процессами жизнедеятельности растения. Установлено, что экстенсивные признаки, такие как листовой индекс (ЛИ), фотосинтетический потенциал (ФП), масса листьев характеризуют в большей мере их биологическую продуктивность (рис.4). Площадь листьев одного дерева отражает потенциальные возможности сорта, а урожай формируется за счет внутренней перестройки метаболизма листового аппарата, интенсификации его работы, активности фотосинтеза и скорости передачи ассимилятов из листьев в плоды, что подтверждено результатами биофизических и биохимических исследований.

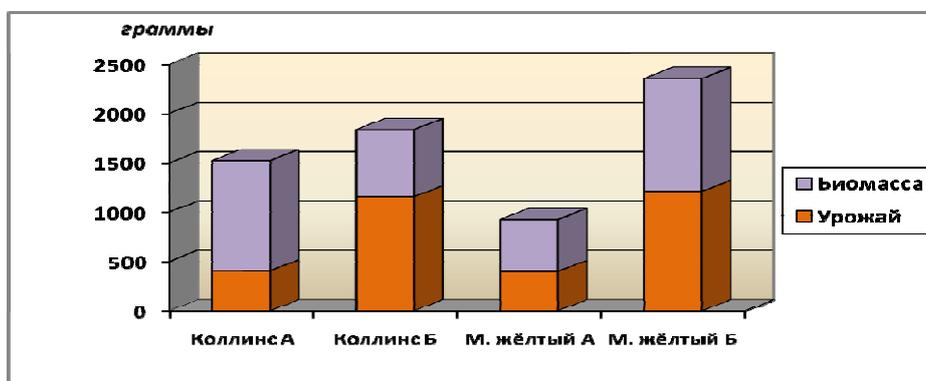


Рис.4. Биологическая и хозяйственная продуктивность сортов персика (биомасса включает листья, побеги текущего года и плоды в пересчете на сухую массу).

Установлено, что центральное место в сезонной вегетации многолетнего культурного растения занимает процесс плодообразования. Условия при цветении дерева и внутренний запас сил определяют количество фертильных завязей. Количество цветков на одно дерево за годы исследования было примерно одинаковым – от 100 до 250, среднее – 150. Процент завязывания плодов – от 10% до 30%. Неопыленные цветки возвращают в побег почти все питательные вещества; масса пустого цветка на 70% меньше, чем опыленного. После опадения недоразвитых завязей на дереве в среднем оставалось около 40 плодов. Средний урожай на одно дерево сохранялся на уровне предыдущего года, около 4 кг. Индивидуальные различия по годам вариативны: 24% деревьев сохранили высокую нагрузку (45-60 плодов), у 16% предел урожайности – 5-20 плодов, остальные растения (60%) имели переменную нагрузку, от 25 до 50 плодов, и колебания по урожайности от двух до пяти килограммов. В ювенильный период, около полутора месяцев, объем завязи увеличился от одного до 8 см³, но масса сухих веществ была незначительной. В последующие две недели рост был приостановлен, а количество сухого вещества в семени утроилось за счет активного притока ассимилятов. Количество плодов и, следовательно, точек притяжения создаваемых фотопродуктов служит сигналом, под который подстраивается внутренняя

работа ФА. Этот ритм сохранялся и после сбора урожая для создания запасных веществ, мигрирующих в корни. Масса плода достигала 90-100 г у ранних сортов (Коллинс) и 130-160 г у позднеспелых (Молдавский желтый). Площадь листьев, работающих на создание одного грамма фруктов, для вариантов с большой нагрузкой плодами, вариантов Б, была 2,6-3,6 дм², для низкоурожайных – 7-9 дм². Установлено, что продуктивность листьев (ПЛ) – отношение сырой массы плодов на единицу площади листьев, варьирует в широких пределах – 200-800 г/м². Однако если продолжить пересчет на количество плодов, то получится стабильный результат характеристики сорта, не зависящий от года и других параметров. ПЛ для сорта Коллинс – 11 г/м² на один плод, у сорта Молдавский желтый – 14 г, Редхавен – 16 г. Эффективность работы фотосинтетического аппарата (ФА) обусловлена скоростями первичных реакций фотосинтеза, особенностями структурной организации фотосинтетической единицы, а также стабильностью его работы в различных условиях. При одинаковых внешних условиях и однотипности генома, эффективность работы ФА регулируется потребностями аттрагирующих центров.

Роль побегов в течение вегетации меняется. В начале вегетации их основная функция – опорная и проводящая для листьев и плодов. После сбора урожая происходит глубокая перестройка и переключение центра аттракции, побеги становятся главным потребителем органических веществ растения. Дифференциация и закладка почек сопровождалась снижением интенсивности роста и накопления массы, так как в этот период определяется программа развития и состояния дерева на будущий год – наиболее энергоемкий процесс. С июля по октябрь общая длина побегов менялась незначительно, размеры прироста составили до 25-30 см на одно дерево, как и в предыдущий год. При стабильном содержании воды в побеге (50-56%) на протяжении четырех месяцев, его масса в сентябре увеличилась в 2-3 раза, в ноябре снова сократилась до минимального уровня. Таким образом, в сентябре-октябре наблюдался активный сток питательных веществ из кроны в корни. Вне зависимости от сорта годичный прирост древесины составил 200-230 г. Но плотность и масса перемещенных ассимилятов существенно различалась. Для малоурожайных сортов масса запасных веществ была в пределах 110-140 г., а для высокоурожайных – 230-350 г на одно дерево. Признаками высокопродуктивных сортов на уровне побега можно считать повышенную скорость роста в мае, большую относительную (рассчитанную на единицу длины) массу побега в сентябре, осенью доля побегов по отношению к листьям должна составлять не менее 60%.

Исследования фотосинтетической деятельности сортов персика в течение вегетации выявили в целом следующие особенности высокоурожайных деревьев:

- В динамике накопления сухой биомассы по органам растения четко выражены переходы, отражающие перемещение центров аттракции в сезонном ритме растения.
- Скорость развития листьев и роста побегов на ранних этапах вегетации в 1,5-1,8 раза выше, чем у растений с малым количеством плодов.
- При одинаковой площади листьев и их массы высокий урожай образуется за счет интенсивности фотосинтеза, скорости оттока фотопродуктов, направленности на формирование плодов, а не вегетативной массы.
- Эффективность работы фотосинтетического аппарата (ФА) обусловлена скоростями первичных реакций фотосинтеза и регулируется потребностями аттрагирующих центров.

Заключение

Гомеостаз зрелого плодоносящего дерева разных сортов в благоприятных условиях поддерживается на определенном уровне. На образование плодов может быть направлено от 30 до 60% годового прироста надземной биомассы за счет внутреннего резерва процессов биосинтеза. Регулирование донорно-акцепторных отношений, ритма и эффективности ассимиляции CO₂, а также сопряженных реакций находится в зависимости от количества и запросов аттрагирующих центров.

Литература:

1. Кумаков В.А. Физиология растений в помощь селекции. - Москва: Наука, 1974. - 300 с.
2. Климов С.В. Адаптация растений к стрессам через изменение донорно-акцепторных отношений на разных уровнях структурной организации // Успехи современной биологии, 2008, т. 128, № 3, с.281-299.

3. Шишкану Г., Титова Н., Малина Р., Воронцов В. CO₂-газообмен и продуктивность растений абрикоса и персика в зависимости от действия стероидного гликозида Молдстим и микроэлементов цинка и марганца // *Studia universitatis. Seria «Științe ale naturii»*, USM, 2011, nr.1(41), p.97-102.
4. Балаур Н.С., Воронцов В.А. Клейман Э.И., Тон Ю.Д. Новая технология многокомпонентного мониторинга CO₂-обмена у растений // *Физиология растений*, 2009, т.56., с.466-470.
5. Семихатова О.А., Чулановская М.В. Манометрические методы изучения дыхания и фотосинтеза растений. Москва: Наука, 1965. - 164 с.
6. Годнев Т.Н. Хлорофилл, его строение и образование в растении. - Минск, 1963. - 147 с.
7. FIELDSCOUTCM -1000 Chlorophyll Meter SpectrumTechnologies, 2006. - 74 p.
8. Гуляев Б.И., Рожко И.И., Рогаченко А.Д. Фотосинтез, продукционный процесс и продуктивность растений. - Киев: Наукова думка, 1989. - 152 с.
9. Гегечкори Б.С., Кладь А.А., Рудь М.Ю. Фитомасса яблони в насаждениях с различной формой кроны // Докл. Российской Академии с-х наук, 2011, №3, с.18-21.
10. Мокроносов А.Т. Фотосинтетическая функция и целостность растительного организма. - Москва: Наука, 1983. - 64 с.

Prezentat la 13.03.2012

НЕКОТОРЫЕ МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ВЫДЕЛЕНИЮ И ИЗУЧЕНИЮ ДЕЙСТВИЯ ТОКСИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ ГРИБА *ALTERNARIA* НА ПРОРОСТКИ ТОМАТОВ

Светлана НИКОЛАЕВА, Аркадий НИКОЛАЕВ, Виктория ШУБИНА, Леонид ВОЛОЩУК

Институт защиты растений и экологического земледелия АН Молдовы

Obiectivele investigației: selectarea izolatelor locale din ciuperca *Alternaria* cu proprietăți toxice înalte; obținerea toxinelor solubile în apă; selectarea condițiilor de cultivare a agentului patogen, cele mai optime pentru producerea toxinelor solubile în apă; selectarea soiurilor de tomate cel mai sensibile la toxine; evaluarea proprietăților izolatelor de *Alternaria* la toxigenitate pentru răsaduri de roșii. Este stabilit că izolatele de *Alternaria* diferă în toxigenitate. Soiul sensibil la *Alternaria* este mai sensibil la toxine decât cel mai rezistent. La temperatura de 20°C toxicitatea se manifestă mai pronunțat decât la cea de 27°C. Toxicitatea tulpinilor de ciupercă depinde de compoziția mediului pe care ciuperca este crescută. Extractul apos de miceliu a fost mai puțin toxic decât lichidul cultural. Toxicitatea este determinată de particularitățile izolatelor de *Alternaria*, precum și de mediul nutritiv pe care izolatele au fost cultivate. Prezența conidiilor în extractul apos de miceliu stimulează dezvoltarea materialului săditor, fapt observat în toate tulpinile și în toate mediile nutritive.

The objectives of our research were to: - select of the local isolates of the fungus *Alternaria* with high toxigenic properties; - select of the most optimal cultivation conditions of the pathogen for the production of water-soluble toxins; - provide a water-soluble toxin; - select of the tomatoes varieties which are most sensitive to the alternaria toxins; - evaluate of toxigenic properties of *Alternaria* isolates on the seedlings of tomatoes. It was established that isolates of *Alternaria* differs in their toxigenicity. Cultivar of tomato more sensitive to alternarioses is more sensitive to the toxin than the more resistant. At 20°C toxicity is more pronounced than at 27°C. Toxicity of isolates of the fungus depends on the composition of the medium on which the fungus is grown. The aqueous extract of mycelium was less toxic than the culture medium. Toxigenicity of isolates depends of the peculiarities of *Alternaria* isolates, and the medium on which isolates were cultivated. The presence of conidia in the aqueous extract of mycelium led to the stimulation of seedlings development. This was noted for all isolates and in all nutrient media.

Грибы рода *Alternaria*, сапрофиты и факультативные паразиты, широко распространены в природе. Они входят в большую группу патогенов-некротрофов, убивают клетки растения-хозяина своими токсинами, а убитые клетки служат субстратом для развития патогена.

Токсины считаются специальным орудием патогенов растений, с помощью которых они внедряются в растения.

Токсины могут быть хозяево-неспецифическими, то есть обладать общими фитотоксическими свойствами и действовать на широкий круг растений, а могут быть и хозяево-специфическими и действовать только на определенные сорта или генотипы растений.

Генетические и биохимические исследования показали, что, по меньшей мере, в части взаимодействия патоген-растение токсины являются определителями специфичности. В этих случаях устойчивость или восприимчивость к грибам коррелирует с нечувствительностью или чувствительностью к токсинам. Фитотоксичность используется в качестве селективного агента для селекции *in vitro* с целью повышения устойчивости растений [1].

Концентрация грибных токсинов в растениях может достигать достаточно больших величин. Например, теназуоновая кислота обнаруживалась в плодах томатов в максимальной концентрации 13,9 мг/100 г, а альтернариол в яблоках – 5,8 мг/100 г. Токсины видов *Alternaria*, патогенных для ячменя, могут обнаруживаться в пиве. Многие из токсических метаболитов, продуцируемых грибами, ядовиты не только для растений, но также для человека и животных [2].

Чувствительность к токсину и восприимчивость к патогену не всегда коррелируют. Демидов Е. и др. [3] отмечают положительную корреляционную зависимость между агрессивностью изолятов и токсичностью фильтратов их культуральных жидкостей ($r=0,77 \pm 0,14$). В то же время другие исследователи не отмечают такой корреляции [1,4]. Не отмечают ее Ганнибал Ф. и Берестецкий А. [5],

изучая патогенность и токсигенность изолятов *A. tenuissima* на бодяке полевом. В их исследованиях обработка растений томата конидиями *A. cirsinoxia* привела к появлению слабой листовой пятнистости, которая не прогрессировала и не давала спороношения. Вероятно, появление некрозов было вызвано действием фитотоксинов, выделяемых прорастающими конидиями, не способными заразить данное растение.

Известен факт, когда токсин из прорастающих спор *Pyricularia oryzae* способствовал успешному заражению риса непатогенным изолятом *Alternaria alternata* [6]. Это может иметь значение в случаях смешанных инфекций, когда в одной инфекционной капле могут присутствовать одновременно споры нескольких видов патогена. Этим, возможно, можно объяснить случаи заражения растений патогенами, считавшимися ранее непатогенными для некоторых растений.

Многие растения, поражаемые альтернариозом, имеют короткий период восприимчивости в стадии проростков и длинный период устойчивости молодых растений. И только в стадии созревания-плодоношения увеличивается восприимчивость растений [7]. Это обстоятельство необходимо учитывать, проводя опыты по искусственному заражению растений. Очевидно также, что все мероприятия, замедляющие старение растений, будут повышать их устойчивость к альтернариозу.

Альтернариоз томатов – широко распространенное заболевание в регионах с теплым и засушливым климатом. Кроме томатов альтернариозом поражаются картофель, баклажаны, перец, а также табак и другие представители семейства *Solanaceae*, то есть экономически значимые культуры. Болезнь широко распространена в Молдове, Украине, Румынии, Республике Беларусь, России и в других странах.

Задачей наших исследований являлось решение следующих вопросов:

- выделение местного изолята гриба *Alternaria* с высокими токсигенными свойствами;
- подбор условий культивирования патогена, наиболее оптимальных для продуцирования водорастворимых токсинов;
- получение водорастворимого токсина;
- подбор наиболее чувствительного к токсину сорта томатов;
- проверка возможности оценки изолятов альтернарии по токсигенным свойствам на проростках томатов.

Материал и методы исследований

В наших опытах были использованы изоляты гриба *Alternaria*, предварительно не проверенные на вирулентность:

- М-59 - с листьев томата частного хозяйства, с. Бачой;
- ВИ-37 - с листьев томата, сорт Джина, экспериментальный участок Института защиты растений и экологического земледелия;
- Ранний 83-49 - с листьев томата сорта Ранний 83;
- ВИ -39 - с листьев томата сорта Джина (Эксперим. участок ИЗР и ЭЗ);
- КТ 68-1 - с листьев картофеля сорта Ирга (Эксперим. участок ИЗР и ЭЗ);
- 2/07 - с листьев томата, экспериментальный участок Института сельского хозяйства, г. Тирасполь;
- G 348-28 - с листьев томата сортоучастка Института генетики и физиологии растений АН Молдовы, г. Кишинев;
- А 9-1 - плод томата сорта Рио Гранде, относительно устойчивого к альтернариозу.
- ГЛТ-3, ГЛТ-7, ГЛТ-8 выделены с гербарных образцов листьев томатов с характерными признаками ранней сухой пятнистости, с различающимися своими культурально-морфологическими признаками.

Токсин гриба *Alternaria* получен по методике Анненкова Б.Г. [8].

Кроме картофельно-глюкозной среды, признанной самой оптимальной для выработки токсинов [9], использовали и другие питательные среды. Так, в одном из опытов брали среду Чапека как классическую для грибов, на которой хорошо рос патоген и отпрыски культур, поражаемых альтернарией.

Картофельно-морковная среда считается наиболее оптимальной для конидиеобразования патогена и определения его видовой принадлежности.

Патоген выращивали на жидких и агаризованных средах.

Токсическое действие проверяли на проростках томатов. В начале эксперимента использовали семена сортов с разной степенью устойчивости к альтернариозу, а в дальнейшем – только семена восприимчивого сорта Ранний 83.

Критерием оценки действия токсина в наших опытах служила реакция проростков томата (скорость развития, длина стебелька и корешка).

Повторность опыта 2-4-кратная, выборка – 40-60 семян.

Данные опытов обрабатывались статистически с использованием пакета программ Microsoft Exell 2007.

Результаты исследований и их обсуждение

Из трех изолятов гриба альтернария (М-59, ВИ 37-1 и Ранний 83-49) в полном соответствии с методикой Анненкова Б.Г. был выделен и проверен на токсичность суммарный токсин гриба альтернария по отношению к проросткам трех сортов, отличающихся разной степенью устойчивости к альтернариозу.

На третьи сутки со времени замачивания семян в воде на сорте Ранний 83 (восприимчивый) наклюнулось 87% семян, а в варианте с токсином - 0%; на сорте Баллада (средневосприимчивый) – соответственно 84,3% и 48,2%. Таким образом, восприимчивый к альтернариозу сорт сильнее реагировал на токсин гриба, чем более устойчивый.

В таблице 1 представлены данные по состоянию проростков трех сортов томатов с разной степенью устойчивости к альтернариозу, семена которых замачивались в воде или растворе токсина (7-е сутки проращивания). Из таблицы видно, что токсин практически не влиял на процент прорастания семян. В то же время четко проявилось угнетающее действие токсина на развитие проростков. При этом сильнее угнетение проявилось на восприимчивом сорте Ранний 83. Данные таблицы свидетельствуют, что при низкой температуре действие токсина было выражено отчетливой. Это видно на примере сорта Ранний 83, который изучался и при 20 и 27°C. При более высокой температуре рост проростков был лучше.

Таблица 1

Влияние токсина гриба *Alternaria* на прорастание семян и состояние проростков томата, отличающихся по восприимчивости к альтернариозу, при разных температурах проращивания

Сорт томата	Вариант	% проросших семян	Состояние проростков		
			наличие семядольных листочков (%)	длина (мм)	
				стебелек	корешок
<i>Температура 27°C</i>					
Ранний 83 (восприимчив к альтернариозу)	Вода	100	11,4	12,0±0,5	27,7±0,8
	Токсин	90,5	0	3,3±0,3	8,6±0,4
Баллада (средневосприимчив к альтернариозу)	Вода	94,1	19,6	18,0±0,8	53,1±3,1
	Токсин	93,9	1,8	13,3±0,7	15,5±0,7
<i>Температура 20°C</i>					
Ранний 83 (восприимчив к альтернариозу)	Вода	98,1	0	4,0±0,5	16,4±1,6
	Токсин	72,7	0	0,6±0,2	4,5±0,6
Дар (относительно устойчив к альтернариозу).	Вода	100	51,8	8,8±0,4	31,3±1,5
	Токсин	98,2	3,5	3,7±0,3	12,9±0,7

В следующей серии опытов изоляты альтернарии выращивались при температуре 28°C на двух жидких питательных средах – картофельно-глюкозной и картофельно-морковной, в течение 20 дней. По истечении указанного срока культуральные жидкости фильтровали, замачивали в фильтрате на 1 сутки семена сортов Ранний 83 и Дар и выкладывали во влажные камеры на фильтровальную бумагу. В таблице 2 представлены данные по состоянию проростков на 7-е сутки.

Из таблицы 2 видно, что все изоляты альтернарии проявили большую фитотоксичность по отношению к обоим сортам на картофельно-глюкозной среде. При этом более восприимчивый сорт Ранний 83 был более чувствителен к токсину, чем более устойчивый сорт Дар. Наибольшую фитотоксичность по отношению к сорту Ранний 83 на картофельно-глюкозной среде показал изолят G 348-28. На сорте Дар этот изолят также был высокотоксичен. Следует отметить также, что относительная активность разных изолятов не всегда коррелировала с составом среды и с сортом.

Таблица 2

Токсическое действие разных изолятов альтернарии, выращивавшихся на разных средах, на сорта томатов, отличающиеся по восприимчивости к альтернариозу

Вариант		Объем выборки	Длина стебелька		Длина корешка	
Изолят	Питательная среда и сорт		мм	% к контролю	мм	% к контролю
ВИ-39	КГ Сорт Ранний 83	54	12,6±0,7	74,1	21,9±1,0	66,6
КТ 68-1		56	9,3±0,4	54,7	17,3±0,6	52,6
2/07		56	13,6±0,7	80,0	26,6±1,2	80,9
G 348-28		53	4,0±0,4	23,5	12,8±0,9	38,9
ГЛТ-3		55	5,8±0,3	34,1	16,4±0,8	49,8
ГЛТ-7		55	4,7±0,5	27,6	13,2±1,0	40,1
ГЛТ-8		52	9,5±0,6	55,9	17,9±0,8	54,4
H ₂ O		56	17,0±0,7	-	32,9±1,4	-
ВИ-39	КГ Сорт Дар	56	22,2±1,0	101,4	26,7±1,3	67,9
КТ 68-1		53	16,8±1,0	76,7	17,7±0,8	45,0
2/07		52	23,6±1,0	107,8	35,6±1,3	90,6
G 348-28		51	12,2±0,7	55,7	19,4±1,1	49,4
ГЛТ-3		53	12,0±0,4	54,8	21,0±1,2	53,4
ГЛТ-7		59	13,5±0,6	61,6	21,2±1,0	53,9
ГЛТ-8		58	18,3±0,9	83,6	18,8±0,7	47,8
H ₂ O		57	21,9±0,8	-	39,3±1,6	-
ВИ-39	КМ Сорт Ранний 83	55	15,5±0,5	90,6	29,5±1,1	84,3
КТ 68-1		56	16,6±0,6	97,1	35,2±1,3	100,6
2/07		53	15,8±0,8	92,4	33,8±1,6	96,6
G 348-28		63	16,3±0,9	95,3	31,5±1,4	90,0
ГЛТ-3		57	17,3±0,8	101,2	30,6±1,0	87,4
ГЛТ-7		57	23,5±0,9	137,4	39,1±1,2	111,7
ГЛТ-8		57	15,7±0,9	91,8	28,8±1,4	82,3
H ₂ O		52	17,1±0,7	-	35,0±1,6	-
ВИ-39	КМ Сорт Дар	52	13,9±0,8	86,9	29,1±1,7	79,7
КТ 68-1		54	13,5±0,9	84,4	31,4±1,9	86,0
2/07		54	13,4±0,8	83,8	32,7±1,9	89,6
G 348-28		51	16,1±0,9	100,6	34,7±2,1	95,1
ГЛТ-3		54	16,7±0,7	104,4	33,4±1,7	91,5
ГЛТ-7		60	19,2±1,1	120,0	36,6±1,8	100,3
ГЛТ-8		47	18,2±1,0	113,8	36,1±1,9	98,9
H ₂ O		55	16,0±0,7	-	36,5±1,8	-

Картофельно-морковная среда не только не повышала фитотоксичность, но в ряде случаев даже стимулировала рост стебельков томата.

Во всех случаях на обеих средах и на обоих сортах рост корешков опережал рост стебельков. Об этом свидетельствует величина соотношения длины корешков к длине стебельков проростков.

Таким образом, картофельно-глюкозная среда не только способствовала в большей степени росту альтернэрии, но и благоприятствовала образованию токсина. В связи с этим нами была предпринята попытка выяснить, можно ли обнаружить водорастворимый фитотоксин в мицелии гриба. Опыт был поставлен на сорте Ранний 83 на картофельно-глюкозной среде.

Таблица 3

Водный экстракт высушенного мицелия альтернэрии

Вариант	Объем выборки (к-во семян)	Длина стебелька		Длина корешка	
		мм	% к контролю	мм	% к контролю
ВИ-39	55	22,4±0,9	116,1	45,8±1,8	105,8
КТ 68-1	54	21,6±0,9	111,9	45,3±1,5	104,6
G 348-28	52	19,4±0,9	100,5	46,5±2,0	107,4
ГЛТ -7	53	18,6±0,8	96,4	44,6±1,4	103,0
Контроль (вода)	60	19,3±0,7	-	43,3±1,5	-

При проращивании семян томатов в водных экстрактах воздушно-сухого мицелия было установлено, что водный экстракт из мицелия практически не угнетал прорастание семян, а даже обнаружил некоторую тенденцию к стимуляции роста проростков томата (табл.3). Однако статистически разница в длине корешков и стебельков проростков не была строго достоверной при принятом в опытах уровне вероятности. Микроскопирование колоний альтернэрии, выросших на всех средах, показало, что образование конидий во всех вариантах сред происходило нормально.

Было изучено влияние некоторых сред на накопление биомассы мицелия при выращивании альтернэрии в жидких средах в стационарной культуре. После 20 суток роста мицелий отфильтровывали от культуральной жидкости, высушивали при комнатной температуре и определяли вес мицелия в расчете на 100 мл жидкой среды (табл. 4). На всех 7-и средах все три изолята альтернэрии показали одинаковые тенденции роста. Наиболее благоприятной для роста была картофельно-глюкозная среда и среда Чапека. Однако приоритетной, стимулирующей рост средой была картофельно-глюкозная.

Таблица 4

Воздушно-сухая биомасса гриба *Alternaria* на жидких средах (г/100 мл среды)
(20-суточная культура)

Питательная среда	Изолят альтернэрии		
	G 348-28	ГЛТ -7	A 9-1
Картофельно-глюкозная	0,998	0,937	0,958
Чапека	0,837	0,725	0,838
Картофельно-морковная	0,041	0,045	0,048
Морковная	0,060	0,059	0,065
Капустная	0,066	0,063	0,070
Перечная	0,030	0,047	0,055
Томатная	0,009	0,011	0,012

Среды морковная, капустная, перечная и томатная были взяты из тех соображений, что в них были включены экстракты наиболее часто поражаемых растений-хозяев гриба альтернэрия. Картофельно-морковная среда использовалась потому, что она принята за стандартную для получения спороношения при идентификации видов альтернэрии.

Капустная, перечная и томатная среды менее богаты питанием, но они также способствуют хорошему спороношению гриба. Последнее обстоятельство было принято во внимание потому, что в литературе имеются указания, что токсин образуется в инфекционных каплях при прорастании конидий, где он играет важную роль в процессе заражения растений [10].

В следующем опыте (табл. 5) изучали действие культуральных жидкостей двух сред, обеспечивавших наилучший рост мицелия, – картофельно-глюкозной среды и среды Чапека. Установлено, что на обеих средах в культуральной жидкости трех изолятов альтернании образуется активный токсин. Наибольшей токсигенностью на обеих средах обладал изолят ГЛТ-7. У всех трех изолятов большую токсигенность обеспечивала картофельно-глюкозная среда. Таким образом, токсигенность обуславливается как особенностями изолятов альтернании, так и средой, на которой выращивается изолят. Этот опыт также показывает, что токсин выделяется в культуральную жидкость (табл.5) и практически воднорастворимого токсина в мицелии нет (табл.3), или он почему-то не выделяется из него, или его там очень мало и нам не удастся его обнаружить.

Таблица 5

Сравнительная оценка токсигенного действия культуральных жидкостей изолятов альтернании, выращенных на картофельно-глюкозной среде и среде Чапека

Вариант		Объем выборки (к-во семян)	Длина стебелька		Длина корешка	
Изолят	Питательная среда		мм	% к контролю	мм	% к контролю
G348-28	КГ	45	8,4±0,4	72,4	16,6±0,7	46,8
G348-28	Чапека	45	12,0±0,6	103,4	27,2±1,1	76,6
ГЛТ-7	КГ	45	4,6±0,4	39,7	12,0±0,5	33,8
ГЛТ-7	Чапека	40	6,7±0,4	57,8	13,2	37,2
А 9-1	КГ	47	6,6±0,5	56,9	10,7±0,6	30,1
А 9-1	Чапека	45	7,9±0,4	68,1	15,8±0,8	44,5
Контроль	(вода)	47	11,6±0,7	-	35,5±2,1	-

Следующий опыт преследовал цель проверить, повлияет ли на токсичность присутствие конидий в водном экстракте мицелия. С этой целью чашки Петри, в которых выращивался гриб, с воздушным мицелием и конидиями заливали небольшим количеством воды и с помощью стеклянного шпателя растирали воздушный мицелий и конидии на нем до получения конидиально-мицелиального гомогената. Гомогенат выливали на салфетку из фильтровальной бумаги, поверх которой раскладывали семена томата Ранний 83, давая им возможность прорасти на салфетке в присутствии мицелия и смывых конидий. В опыте использовано 4 изолята альтернании и три разных питательных среды (табл. 6).

Из таблицы 6 видно, что присутствие конидий в жидкости, в которой прорастали семена, не усилило токсичность. Более того, на всех изолятах и на всех питательных средах отмечено выраженное стимулирование скорости развития проростков.

Наиболее сильно стимуляция проявилась у всех изолятов на картофельно-глюкозном агаре. Особенно проявилась стимуляция в развитии стебельков проростков, что отразилось и на соотношении длины корешков к длине стебельков. В варианте с КГА это соотношение было более низким (особенно у изолятов ГЛТ-7, А 9-1 и КТ). К сожалению, мы не пронаблюдали, имело ли место прорастание конидий в жидкости, в которой прорастали семена.

Таблица 6

Влияние конидиально-мицелиальной смеси на развитие проростков томатов сорта Ранний 83

Вариант		Объем выборки (к-во семян)	Длина стебелька		Длина корешка	
Изолят	Питательная среда		мм	% к контролю	мм	% к контролю
G	КГА	45	24,7±1,2	222,5	53,8±1,8	152,4
ГЛТ-7		46	28,7±1,4	258,6	45,9±1,3	130,0
А 9-1		47	28,1±1,5	253,2	44,2±1,4	125,2
КТ		45	29,3±0,8	264,0	50,0±1,5	141,6
G	КМА	46	16,9±0,7	152,2	42,8±1,6	121,2
ГЛТ-7		43	14,8±0,7	133,3	40,8±1,7	115,6
А 9-1		44	18,8±0,6	169,4	41,1±1,5	116,4
КТ		45	15,6±0,9	140,5	36,1±1,6	102,3
G	КАП. А	49	15,4±0,8	138,7	41,1±2,1	116,4
ГЛТ-7		44	20,2±1,0	182,0	43,5±1,6	123,2
А 9-1		46	16,7±0,7	150,4	43,7±1,5	123,8
КТ		46	14,1±0,7	127,0	36,1±1,5	102,3
H ₂ O	Контроль	46	11,1±0,5	-	35,3±1,8	-

Анализируя полученные данные, можно предположить, что токсин выделяется в питательную среду в процессе роста гриба. Вероятно, водорастворимого токсина в мицелии и конидиях не было. Это не исключает, однако, возможности предположить, что его могло быть там мало. Многие авторы, работавшие с фитотоксинами альтернарии, проводили его концентрирование или упариванием без использования органических растворителей [8]), или экстрагированием токсинов органическими растворителями с последующим упариванием (как это имело место во всех работах, в которых проводились опыты с очисткой токсинов и установлением их химической структуры [11,12]).

Можно также предположить, что листья будут реагировать на токсин не так, как проростки семян. Возможно, аналогичные опыты следует провести не на проростках, а на растениях или изолированных листьях.

Таким образом, в результате исследований можно сделать следующие выводы:

1. Выделены местные изоляты гриба *Alternaria* с высокими токсигенными свойствами.
2. Подобраны условия культивирования патогена, наиболее оптимальные для продуцирования водорастворимых токсинов.
3. Подбран наиболее чувствительный к токсину сорт томатов.
4. Показана возможность оценки изолятов альтернарии по токсигенным свойствам на проростках томатов.

Литература:

1. Slavov S. Phytotoxins and in vitro screening for improved disease resistant plants. // AgroBioInstitute, Sofia, Bulgaria Biotechnol&Biotechnol.Eq. 19/2005, 20th Anniversary AgroBioInstitute R&D Special Issue. - 2005, p.48-55.
2. Ганнибал Ф.Б. Токсигенность, аллергенность и таксономия грибов рода *Alternaria* // Успехи медицинской микологии, 2002, том 1, глава 5, с.189-190.
3. Демидов Е.С., Садыкина Е.И., Сайчук А.И. Методы селекции томата на устойчивость к альтернариозу. – Тирасполь, 2006. - 99 с.
4. Gilchrist D.G., Grogan R.G. Production and nature of a host-specific toxin from *Alternaria alternate* f.sp. *lycopersici* // Phytopathology, 1976, vol.66, p.165-171.
5. Ганнибал Ф.Б., Берестецкий А.О. Виды рода *Alternaria* в микобиоте бодяка полевого (*Cirsium arvense*), их токсигенность и патогенность // Микология и фитопатология, 2008, том 42, вып.2, с.110-118.
6. Sakae Arase et. al. Studies on Host-Selective Infection Mechanism of *Piricularia oryzae* Cavara. (2) Production of Susceptibility-Inducing factor(s) from germinating spores and their Phytotoxicity // Ann. Phytopathological Soc. Japan, 1990, vol.56, p.322-330.

7. Левитин М.М., Ганнибал Ф.Б., Гасич Е.Л., Баранова О.А., Орина А.С. Использование закономерностей иммуногенеза при разработке методов оценки устойчивости растений к альтернариозу // Культурные растения для устойчивого сельского хозяйства в XXI веке (иммунитет, селекция, интродукция), 2011, том.4, часть1, с.38-41.
8. Анненков Б.Г. Способ получения токсина микромицета *Alterhariasolani*. / Патент Российской Федерации *Номер* 2066347, *Классы патента* C12N1/14, A01N63/04, C12N1/14, C12R1:645, *Номер заявки:* 5062634/13, *Дата публикации* 10.09.1996.
9. Singh U.P., Singh S.K., Sarma B.K., Time-dependent sporulation. Conidial size and germ tube formation in *Alternaria tenuissima* (Kunze ex Pers.) Wiltshire on different media. // *J. Phytopathology*, 2000, vol.148, p.413-416.
10. Takashi Tsuge, Syoyo Nishimura, Satoshi Omura, Keisuke Kohmoto and Hiroshi Otani. Metabolic regulation of host-specific toxin production in *Alternaria alternata* pathogens (2). Suppression of toxin production from germinating spores by chemical treatments // *Ann. Phytopathol.Soc. Japan*, 1985, vol.51, p.277-284.
11. Chandrasekaran Uma Maheswari and Ambalavanan Sankaralingam. Role of toxin produced by *Alternaria alternata* in leaf blight of watermelon and its degradation by biocontrol agents // *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 2010, vol.43, no1, p.41-50.
12. Komoto K., Scheffer R.P. and Whitside J.O. Host-selective toxin from *Alternaria citri* // *Physiology and Biochemistry*, 1979, vol.69, no 6, p.667-671.

Prezentat la 31.05.2012

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ МЯТ, СИНТЕЗИРУЮЩИХ АЦИКЛИЧЕСКИЕ ТЕРПЕНОИДЫ

Елена ПЕЛЯХ, Василий ЧОБАНУ, Лучия АРХИП

Лаборатория биохимии растений

În lucrare sunt prezentate rezultatele studierii unor forme spontane de mentă, precum și a unor hibrizi de diversă proveniență, care sintetizează și acumulează predominant terpenoizi aciclici – citral, linalool, geraniol, nerol, citronelol și esterii lor – linalilacetat, geranilacetat, cironelilacetat în diferite cantități. Ecotipurile *M. arvensis* L., *M. piperita* L., *M. longifolia* (L.) Huds. au fost aduse din diverse zone geografice – Moldova, Rusia (Extremul Orient, Regiunea Volga), Ucraina, Canada. Datorită compoziției chimice și aromei plăcute a uleiului eteric, aceste mente prezintă un material interesant pentru selecția ulterioară, precum și pentru utilizare în industria cosmetică, în calitate de aromatizanți pentru diverse produse.

In the course of our investigation of genus *Mentha* we have analyzed the essential oil of some wildy growing ecotypes of *M. arvensis* L., *M. piperita* L., *M. longifolia* (L.) Huds. collected in different geographical regions such as Moldova, the Ukraine, Russia (the Far East, Povoljje), and Canada. These different ecotypes possess an unusual smell, and the essential oils showed a distinct chemical composition. The main components of these oils are non-cyclic terpenoids such as citral, linalool, geraniol, nerol, citronellol, linalilacetat, geranilacetat, nerilacetat in different percentage. The chemotypes with flower-like or fruit-like scent are of interest and may be used in perfumery and as a culinary herb.

Растения рода *Mentha* широко распространены в различных географических зонах. Виды мяты произрастают зачастую в одной экологической зоне, легко скрещиваются между собой, в результате чего образуются многочисленные хеморасы [1,2,3,4]. Мята широко известна как источник ментола. Однако виды мяты синтезируют большое количество биологически активных веществ и являются потенциальными их источниками. В основном мяты накапливают в составе эфирного масла циклические монотерпеноиды р-ментанового ряда.

В литературе нередко появляются сообщения о *M. citrata* Ehrh, хотя, вероятно, это сборное название разных видов или хеморас, о чем свидетельствуют и многочисленные синонимы: *M. piperita citrata* (Ehrh.) Briq., *M. aquatica* var. *citrata* (Ehrh.) Benth, *M. odorata*, а также о мяте бергамотовой, лимонной, банановой и прочих [8,9]. Это редкий случай, когда ботаническое название соответствует органолептической оценке, поскольку внимание привлекает именно необычный для мяты аромат.

Нами собраны из естественных популяций и высажены на биологической станции университета формы мяты, которые выделялись своим нетипичным для мят цветочно-цитрусовым ароматом. Одна форма *M. arvensis* L. была завезена с Дальнего Востока, другая – из России (район Верхней Волги), третья – из Канады. Две хеморасы *M. piperita* L. были выделены из промышленной посадки сорта Краснодарская – 2 на Украине, *M. longifolia* (L.) Huds – из естественной небольшой популяции в районе Кишинева. Мята была размножена корневищами, собранными в естественной среде обитания, а в последующие годы – рассадой. Кроме того, исследовались гибриды и сеянцы, которые по своим органолептическим свойствам были близки к изучаемым видам.

Эфирное масло получали из растений, собранных в стадии массового цветения, используя метод гидродистилляции по Гинзбургу. Для общей характеристики эфирного масла определяли физико-химические показатели (оптическую активность, коэффициент рефракции, характер поглощения в УФ-области, количественное содержание терпеновых спиртов, кетонов, сложных эфиров). Компонентный состав эфирного масла определяли методом газо-жидкостной хроматографии на приборе Цвет-152 с пламенно-ионизационным детектором на стальных колонках (3м x 25мм), заполненных 15% карбоваксом, на Хроматоне N-AW-DMCS 0 160-0 200; газ-носитель гелий. Индивидуальные компоненты выделяли методом препаративной хроматографии в тонком слое: на стеклянную пластинку размером 25 x 25 см наносили слой адсорбента толщиной 0,8 - 1 мм. В качестве элюентов использовали гексан, этиленгликоль, ацетон в различных соотношениях для лучшего разделения. Схема выделения индивидуальных компонентов приведена нами ранее [5]. Выделенные индивидуальные

вещества характеризовали по физическим константам, максимумам поглощения в УФ-области, способности удерживания путем введения чистых индивидуальных веществ.

В ходе исследований нами обнаружено значительное разнообразие физико-химических характеристик эфирных масел изучаемых форм мяты (таблица 1). Экотипы *M. arvensis* L., *M. piperita* L. характеризуются низкой эфиромасличностью (0,5-1,3%), только у *M. longifolia* L. она более высокая – 2,1-2,3%. Количественное содержание основных групп терпеновых соединений также варьирует в значительных пределах: спиртов – от 24% до 45%; сложных эфиров – от 18% до 50%; альдегидов (в основном цитраля) – от 28% до 45%.

Таблица 1

Характеристика эфирного масла изучаемых экотипов мяты

Вид	Место произрастания	Выход масла, %	n_D^{20}	α_D^{20}	λ_{max} , нм	Содержание, %		
						Спирты	Сл. эфиры	Карб. соед.
<i>M. arvensis</i>	Дальний Восток	0,85	1,476	-1,35	228,238,260,273	26,4	45,5	6,47
<i>M. arvensis</i>	Поволжье	0,52	1,471	-25,00	238,252	34,5	50,0	5,62
<i>M. arvensis</i>	Канада	1,35	1,467	-10,40	238,260	18,7	31,3	9,63
<i>M. piperita</i>	Украина-1	0,50	1,488	-2,40	238	22,65	18,44	36,44
<i>M. piperita</i>	Украина-2	1,03	1,481	-5,60	238	24,6	23,42	45,0
<i>M. longifolia</i>	Молдова	2,30	1,462	-18,3	-	36,3	48,7	1,75

Несмотря на разнообразие количественных показателей, экотипы объединяет то, что биосинтез у них идет по типу *M. citrata* Ehrh., в результате чего в эфирном масле накапливаются ациклические монотерпеноиды в различных количественных соотношениях (таблица 2).

Таблица 2

Состав компонентов эфирного масла экотипов мяты, синтезирующих ациклические терпеноиды

№ пика	Наименование компонента	Содержание, %					
		<i>M. arvensis</i> Дальний Восток	<i>M. arvensis</i> Поволжье	<i>M. arvensis</i> Канада	<i>M. piperita</i> Украина-1	<i>M. piperita</i> Украина-2	<i>M. longifolia</i> Молдова
1	α - пинен	0,01	0,04	0,1	0,02	0,03	0,02
2	β - пинен	0,03	0,14	0,05	0,09	0,22	0,05
3	лимонен	0,68	0,70	3,30	1,35	1,16	1,34
4	1, 8 -цинеол	1,42	2,05	3,25	4,00	1,58	1,87
5	1, 4-цинеол	1,42	2,91	14,70	0,92	1,25	1,75
12	линалоол	1,17	2,60	4,00	5,30	4,85	19,24
13	линаллилацетат	1,00	14,15	4,18	4,45	8,05	44,50
15	октанол-3	0,23	4,25	2,45	1,21	2,60	0,55
16	ментол	0,94	2,25	10,00	2,16	1,60	No
18	цис-цитраль	4,32	1,53	0,40	10,45	14,65	5,31
19	цитронеллилацетат	0,90	3,58	28,76	6,67	4,85	0,55
20	транс-цитраль	1,49	1,35	3,05	24,15	29,30	3,70
21	цитронеллол	26,90	1,43	2,48	2,00	4,60	5,55
22	геранилацетат	38,30	26,9	2,61	10,15	0,80	5,73
23	нерол	2,74	3,35	4,48	5,45	2,20	7,70
24	гераниол	12,90	23,00	3,90	6,58	8,84	6,80
25	нерилацетат	1,32	2,86	0,95	1,25	0,90	1,30

Небольшое количество ментола в составе эфирного масла цитральных экотипов может свидетельствовать о генетическом родстве с ментольными формами мяты полевой и перечной. В эфирном масле мяты длиннолистной ментол не был обнаружен.

Следует отметить, что хемотипы мяты полевой и перечной неустойчивы к низким температурам, их корневища зимой вымерзают. Линалоольный хемотип мяты длиннолистной – это мощное растений высотой 1,2 – 1,5 м, хорошо перезимовывает с высоким коэффициентом размножения.

Из гибридных потомств от различных комбинаций скрещивания и сеянцев от самоопыления были выделены растения, которые также накапливают ациклические терпеноиды в эфирном масле (таблица 4). От скрещивания *M.incana* x *M. piperita* (карвонный хемотип) получен гибрид №55; от скрещивания *M.incana* x *M.piperita* x *M.spicata* получен гибрид 17-24; из семенного потомства от свободного переопыления *M.arvensis* (Дальневосточный экотип) получен ДОП-6; из семенного потомства от свободного переопыления *M.piperita* (цитральный хемотип) получен сеянец ОН-1К и от переопыления *M.sachalinensis* (*Briq.*)*Kudo* x *M.caucasica* *Gandg.* получен гибрид № 1575 .

Полученные нами гибриды и сеянцы отличаются более мощным развитием, жизнеспособностью и высокой эфиромасличностью (таблица 3). По морфологическим признакам растения ДОП-6 и ОН-1К схожи с материнскими формами; гибрид № 1575 обладает смешанными признаками; остальные гибриды более соответствуют мяте колосовой.

Таблица 3

Характеристика гибридов и сеянцев, накапливающих ациклические терпеноиды

Название гибрида	Выход масла, %	n_D^{20}	α_D^{20}	λ_{max} , нм	Содержание, %		
					спирты	сложн. эфиры	карб. соед.
55	2,7	1,460	+8,4	-	82,0	5,0	1,8
17-24	2,1	1,462	+12,3	-	73,8	6,7	3,6
1575	1,9	1,463	-66,0	252	65,4	10,1	5,5
ДОП-6	1,7	1,475	-2,7	238,260,270	53,3	32,7	10,4
ОН-1К	1,3	1,473	-5,3	238,260,273	19,9	46,6	22,3

Особый интерес представляет гибрид № 1575, который синтезирует практически в равных количествах лимонен (33%), d-линалоол (26%) и ментол (22%) (таблица 4). По современным представлениям синтеза терпеноидов лимонен является исходным продуктом образования многих кислородсодержащих терпеноидов циклического строения, при этом наличие генов L и Lm препятствует превращению линалоола и лимонена, соответственно, в циклические монотерпены [6].

У мяты сахалинской в составе эфирного масла доминировали циклические компоненты (ментол до 80%), у мяты кавказской – ациклические (линалоол до 90%). Таким образом, у гибрида №1575 наблюдается смешение и морфологических и химических признаков обоих родителей как следствие смешения ферментных систем, что приводит к появлению в эфирном масле довольно значительного количества ментола (таблица 4).

Таблица 4

Состав компонентов эфирного масла гибридов

№ пика	Наименование компонента	Содержание, %				
		№ 55	№ 17-24	№ 15-75	ДОП – 6	ОН - 1К
1	α - пинен	0,08	0,01	0,02	0,06	0,01
2	β - пинен	0,02	2,40	1,00	0,02	0,16
3	лимонен	2,49	6,60	33,05	0,20	1,36
4	1, 8 -цинеол	0,84	3,58	5,72	1,30	1,20
5	1, 4-цинеол	2,58	14,11	1,18	1,85	0,93

Таблица 4, продолжение

12	линалоол	76,60	65,55	26,0	2,20	10,10
13	линаллилацетат	2,20	1,61	0,5	2,15	14,06
15	октанол-3	0,80	1,15	0,3	0,45	1,75
16	ментол	No	1,61	22,30	1,05	2,25
18	цис-цитраль	0,62	0,80	0,70	6,80	19,15
19	цитронеллилацетат	1,38	1,15	0,22	1,50	2,87
20	транс-цитраль	1,62	2,78	0,60	3,57	1,86
21	цитронеллол	1,34	2,76	1,32	20,05	1,15
22	геранилацетат	0,05	3,88	1,05	26,23	27,80
23	нерол	1,10	2,62	0,86	5,55	2,05
24	гераниол	0,70	1,30	1,05	16,10	2,70
25	нерилацетат	0,45	1,8	1,30	1,05	1,30

Кислородсодержащие производные 2, 6-диметилпентана – линалоол, гераниол, нерол, цитронеллол и их сложные эфиры (линаллилацетат, нерилацетат, геранилацетат, цитронеллилацетат) являются наиболее распространенными в эфирных маслах некоторых субтропических растений и придают им различные оттенки цветочных и фруктовых запахов. В нашей климатической зоне растения, в частности мяты, с таким составом эфирного масла встречаются крайне редко. Поэтому изученные нами экотипы мяты полевой, перечной и длиннолистной, а также гибриды, могут представлять значительный практический интерес как сырье для парфюмерно-косметической и пищевой промышленности, а также для селекционных работ.

Литература:

1. Shimizu S. Report for TEAK. Japan Toyama University, 2001.
2. Avato P., Sgarra G., Casadoro G. // Sci.Pharm., 63, 1995.
3. Шикимака А., Воробьева Э. // Растительные ресурсы, вып. 4, 1988.
4. Bertolli A., Flammini G., Cioni P. // J.Essent.Oil.Res., 9, 1997.
5. Чобану В., Пелях Е., Писова М. Сравнительное изучение хеморас M.arvensis // Analele Științifice ale USM. Seria “Științe chimico-biologice”. - Chișinău CE USM, 2003, p.124-127.
6. Lincoln D., Marble Ph., Kramer Fr., Murray M. // Theoretical and Applied Genetics., 1971, v.41, no.2.
7. Murray M., Hefendehl F. // Phitochemistry, 1973, v.12, no.6.
8. Caughlin B. Selected Plants of Medicinal Value. University of New Hampshire IROP Program 2008.
9. Lawrence M. Mint – the Genus Mentha // Medicinal and Aromatic Plants – industrial profiles. CRC Press Taylor and Fransis group, 2007. - 556 p.

Prezentat la 08.02.2012

THE COMPARATIVE ANALYSIS OF *IN VITRO* PHASEOLIN PROTEOLYSIS BY PAPAINE AT DIFFERENT pH VALUES

Tatiana STEPURINA, Vitalie I. ROTARI

Laboratory of Plant Biochemistry

Hidroliza fazeolinei native, proteina de rezervă principală din semințele de fasole (*Phaseolus vulgaris* L.), de către papaină la diferite valori ale pH-ului, în diapazonul 4,6-8,0, a fost studiată în condiții *in vitro*. A fost determinat că fazeolina este modificată de către proteoliza limitată la toate pH-urile investigate. Această modificare rezultă în formarea fragmentelor ce corespund aproximativ jumătății de subunitate a fazeolinei native, care rămân asociate în structura cuaternară a moleculei, producând fazeolina-Pap. La pH-uri mai înalte de 6,2 o parte din fazeolina-Pap este complet hidrolizată de către papaină, ceea ce indică la faptul că asocierea fazeolinei în structuri supramoleculare la pH acid îi conferă, probabil, rezistență la proteoliză.

Since the feeding of global population represent a major challenge [1] the production and utilization of plant proteins for foodstuffs is of great importance worldwide. The grain crops have seeds that contain a high level of different groups of storage proteins (SP) – albumins, globulins, and prolamins [2]. In legume seeds they are represented by two major globulins: legumins (or 11S) and vicilins (or 7S) [2,3]. SP from legume seeds in general [3] and from common bean seeds in particular [4] have attracted a special attention in recent years because they have important “functional” (physicochemical) properties.

SP from legume seeds have different nutritive value [5 and references therein]. One of the most important factors that affect their nutritive value is their susceptibility to the action of the proteases of the digestive tract [6]. It has been found that the resistance of the major native legume SP to proteolysis have a negative result of nutritive value for the unheated legume seeds [5]. More than that, stable to proteolysis SP of the cupin superfamily are major allergens in vegetal products [7].

In any protein molecule there are many peptide bonds capable of being cleaved by any individual protease provided that these bonds correspond to protease specificity. The rate of a peptide bond cleavage is influenced not only by amino acid residues that form this bond but also by amino acid residues from neighbourhood. The first stage of proteolysis is represented by cleavage of peptide bonds in the most „sensible” place, located at the molecule surface. This represents non-co-operative (or ‘zipper’) proteolysis [8] that leads to limited modification of the protein. The proteolysis that will follow depends on the influence that has on molecule structure’s the cleavage of first peptide bonds and can follow two pathways. In the case when during limited proteolysis the splitting of one/several peptide bond(s) induces destabilisation or unfolding of the protein structure then the rate of the subsequent hydrolysis dramatically increases that leads to unlimited (extensive) proteolysis and the protein is completely degraded. Unlimited proteolysis can be achieved either by co-operative (or ‘one-by-one’) proteolysis only or by parallel non-co-operative and co-operative (or ‘mixed type’) proteolysis [8]. But if the limited proteolysis does not destabilise the protein’s structure then hydrolysis stops.

The degree and rate of hydrolysis of some representative native legume SP is relatively deep and high [5 and references therein]. The only exception to this rule is phaseolin, the 7S SP from common beans [5, 9 and references therein]. Its hydrolysis by exogenous proteases stops after the cleavage of a small number of peptide bonds that result in limited modification of the molecule [9]. Since phaseolin is mobilised during seed germination it was expected that in seeds during this process are expressed proteinases that can perform a deep hydrolysis of phaseolin. However, the two major cysteine proteinases purified from germinated common bean seeds, CPPh, a papain-like protease [10], and legumain, an Asn-specific proteinase, [11] taken individually perform only a limited hydrolysis of phaseolin. To best of our knowledge, up to now, no profound proteolysis of phaseolin at the action of an individual protease has been achieved. This resistance of phaseolin to the action of individual proteases, both exogenous and endogenous, has been suggested to be due to the peculiarities of its structure that distinguish phaseolin from other legume SP [9, 10, 11]. That is why finding out the exact causes of this unusual property of phaseolin structure represents a theoretical and practical interest.

Native phaseolin, unlike other SP, undergoes a reversible association/dissociation with pH [12]. At acidic pH values from 1.0 to 3.0 it is represented by trimers (referred to as protomer form), while at acidic, but

physiological pH values from 3.8 to 5.4 phaseolin trimers associates into a dodecamer (a tetramer of trimers) [12]. With the increase of pH phaseolin dissociates into trimers at neutral pH values from 6.4 to 10.5, and finally into individual subunits at basic pH values above 11.5. Whether this property of phaseolin molecule to reversibly associate/dissociate has any influence on its susceptibility/resistance to hydrolysis, i.e. protect or render available sites for proteolysis, has not been studied yet.

Phaseolin hydrolysis by different exogenous proteases was performed at their pH optimum either at acidic or at neutral and slightly basic pHs [5, 9], a pH at which phaseolin is in its protomeric form. Phaseolin hydrolysis by endogenous proteases has been performed at their pH optimum at slightly acidic pHs [10, 11], a pH at which phaseolin is predominantly in its dodecameric form. However, no experiments had been performed by using a single protease at different pHs. That is why we decided to investigate the hydrolysis of phaseolin by papain, a cysteine protease that in comparison with other proteases has a distinguishing feature of preserving its activity in a large interval of temperature and pH [13]. It is stable and active in the interval of pH from 4.0 to 10.0 [13], with pH optimum in the region 6.0 – 7.0. The purpose of this work was to compare qualitatively and quantitatively the degradation patterns of native phaseolin at the action of papain in the range of pH from 4.6 to 8.0 at the extremes of which phaseolin is presented in two different forms – dodecamer and protomer. Here we report the results of this investigation that shows that pH influences the susceptibility of phaseolin molecule to papain proteolysis.

Materials and methods

Reagents. Twice crystallized papain suspended in acetate buffer pH 4.5 (Sigma, USA) was used in this work. Phaseolin was isolated from common bean seeds (*P. vulgaris* L. cv. Moldavian) according to the method of Hall et al. [14]. Bz-Phe-Val-Arg-pNA·HCl was from Bachem (Switzerland). All other reagents were of analytical grade.

Buffers. The buffer systems selected were 120 mM phosphate-citrate buffers, pHs 4.6, 5.6, 6.2 and 6.8, and 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0. The buffers contained 500 μ M EDTA and 0.04 % NaN₃ and were adjusted with NaCl to ionic strength 0.5.

Papain activity. The papain activity at different pHs was determined with the synthetic substrate Bz-Phe-Val-Arg-pNA·HCl as described by Vaintraub and Morari [15] with the incubation of the reaction at 30 °C. The assays showed that papain retained its activity in the pH range 4.6 – 8.0 (Fig. 1a) used for performing phaseolin hydrolysis and that the activity is approximately equal at all pHs.

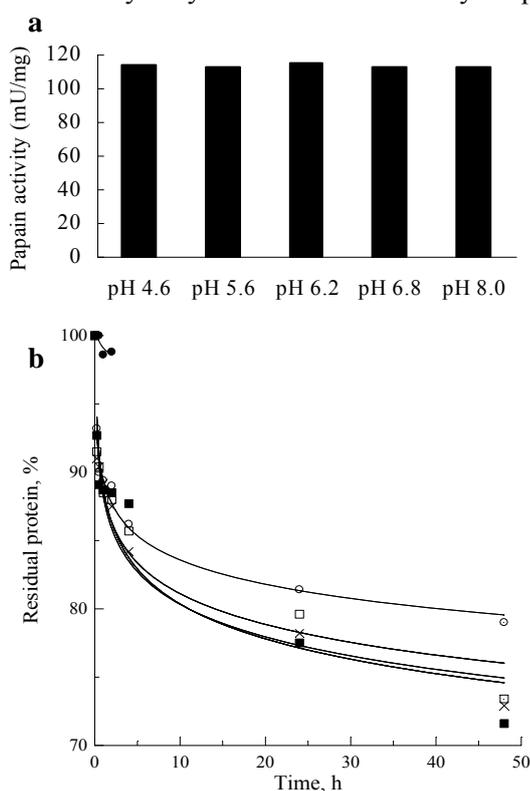


Fig.1. The influence of pH on phaseolin hydrolysis by papain. (a) Papain activity at pHs used for performing phaseolin hydrolysis. Papain (450 μ g/ml) was activated by β -mercaptoethanol (2 μ l/ml) for 30 min at 30 °C and then assayed with Bz-Phe-Val-Arg-pNA·HCl (120 μ M) as substrate. (b) Time dependence of residual protein concentration (percent of the initial protein) during phaseolin hydrolysis by papain at pH 4.6 (●), 5.6 (○), 6.2 (×), 6.8 (□) and 8.0 (■). The initial protein concentration was taken for 100%. (c) Residual protein concentration (in %) in the final papain hydrolysates of phaseolin. ^a See Fig. 1b. ^b See Fig. 3f. ^c Can not be determined by the method used.

Proteolysis. Papain was activated by β -mercaptoethanol (5 μ l/ml) for 30 min at 30 °C. Phaseolin solution (2%) in appropriate buffer, containing β -mercaptoethanol (5 μ l/ml), was mixed with an equal volume of papain solution in the same buffer, and the reaction mixture was incubated at 30 °C. In experiments the enzyme: substrate ratio was 1:50. The duration of hydrolysis was 48 h and samples of hydrolysates were taken periodically.

Proteolysis of phaseolin, in all experiments, was repeated at least twice. Electrophoretic pattern, both SDS and non-denaturing gradient pore, and residual (TCA-insoluble) protein were determined in the samples. In the samples taken for native electrophoresis the reaction was stopped by the addition of 100 μ M sodium iodoacetate, an inhibitor of cysteine proteinases.

Residual protein content was determined by a dye-binding method [16]. Replicates (four or five determinations performed on each sample) agreed to within 0.01 absorbance units.

PAGE. SDS/PAGE was carried out in a vertical flat-bed 12.5% PAGE. The protein samples were treated according to the method of Laemmli [17]. Phosphorylase b (94 kDa), bovine serum albumin (67 kDa), ovalbumin (43 kDa), carboanhydrase (30 kDa), Kunitz soybean trypsin inhibitor (20.1 kDa), and α -lactalbumin (14.4 kDa) (GE Healthcare, UK) were used as standards for determination of molecular mass (M_r). The electrophoregrams were stained with Coomassie brilliant blue G-250.

SDS/PAGE was also carried out at the ratio of acrylamide to methylenebis(acrylamide) of 200:1 [18].

Non-denaturing gradient pore PAGE was carried out in a vertical flat-bed gradient (4-30%) PAGE using Tris-borate buffer system (90 mM, pH 8.4). The duration of electrophoresis was 4500Vh. Phaseolin (140 kDa) and bovine serum albumin (67 kDa) were used as standards. The percent of the residual protein was calculated from the decrease of its M_r . The gels were stained with Coomassie brilliant blue R-250.

Results and discussion

Our results show for the first time that pH influences phaseolin hydrolysis by papain. Assay of total protein content showed that at pH 4.6 phaseolin hydrolysis is low (Fig. 1b) and after 2 h the modified protein starts to fall into precipitate. This differ not only from the action of papain on vetch 7S SP (vicilin) which is completely hydrolysed [not shown] but also from the action of CPPh on phaseolin [10]. That is why we decided to assay the papain action on phaseolin at pH 5.6 (Fig. 1b), a pH at which phaseolin is completely hydrolysed by the consecutive action of legumain and CPPh [11]. At this pH modified phaseolin does not fall into precipitate. However, if CPPh hydrolyses only 10 % of phaseolin at both pHs 4.6 and 5.6 [10, 11], then papain hydrolyses 21% of phaseolin at pH 5.6 (Fig. 1c). Phaseolin is known to be extremely resistant to proteolysis [5, 9, 10, 11] and until now such a high degree of phaseolin hydrolysis has been observed only at the action of trypsin [9]. Since the hydrolysis of phaseolin by trypsin has been carried out at pH 8.0 [9] we decided to investigate the action of papain on phaseolin also at this pH (Fig. 1b). We also assayed the papain action on phaseolin at pHs 6.2 and 6.8 (Fig. 1b) a pH diapason were papain has its maximal activity. The obtained results show that papain performs mainly limited proteolysis of phaseolin at all five pHs (Fig. 2 and 3). However, the degree of hydrolysis increases with the increase of pH and the content of hydrolysed protein reaches a final degree of 1%, 21%, 27%, 27%, and 28% at pHs 4.6, 5.6, 6.2, 6.8, and 8.0, correspondingly (Fig. 1c).

SDS/PAGE showed that the limited proteolysis of native phaseolin by papain results in cleavage of its subunits and concomitant appearance of several bands with M_r approximately half subunit (Fig. 2). These fragments appeared already after the mixing of protein with the enzyme and are evident after 0.25 h of hydrolysis. It seems that their number does not change during the time course of hydrolysis. The slight changes of their M_r , i.e. a small increase in their mobility, seem to occur during the entire time course of hydrolysis till 48 h. The pH does not influence this process. The bands, corresponding to native subunits, disappeared after approximately 24 h of hydrolysis. After 48 h of hydrolysis the pattern of fragments formed is similar at all pHs (Fig. 2). Two types of fragments are formed: an upper large band 1 and a lower thin band 2. The band 1 has a M_r of approximately 25 kDa. Starting with pH 5.6 this band seems to differentiate by having the lower part more intensely stained. The band 2 has a M_r of approximately 21 kDa.

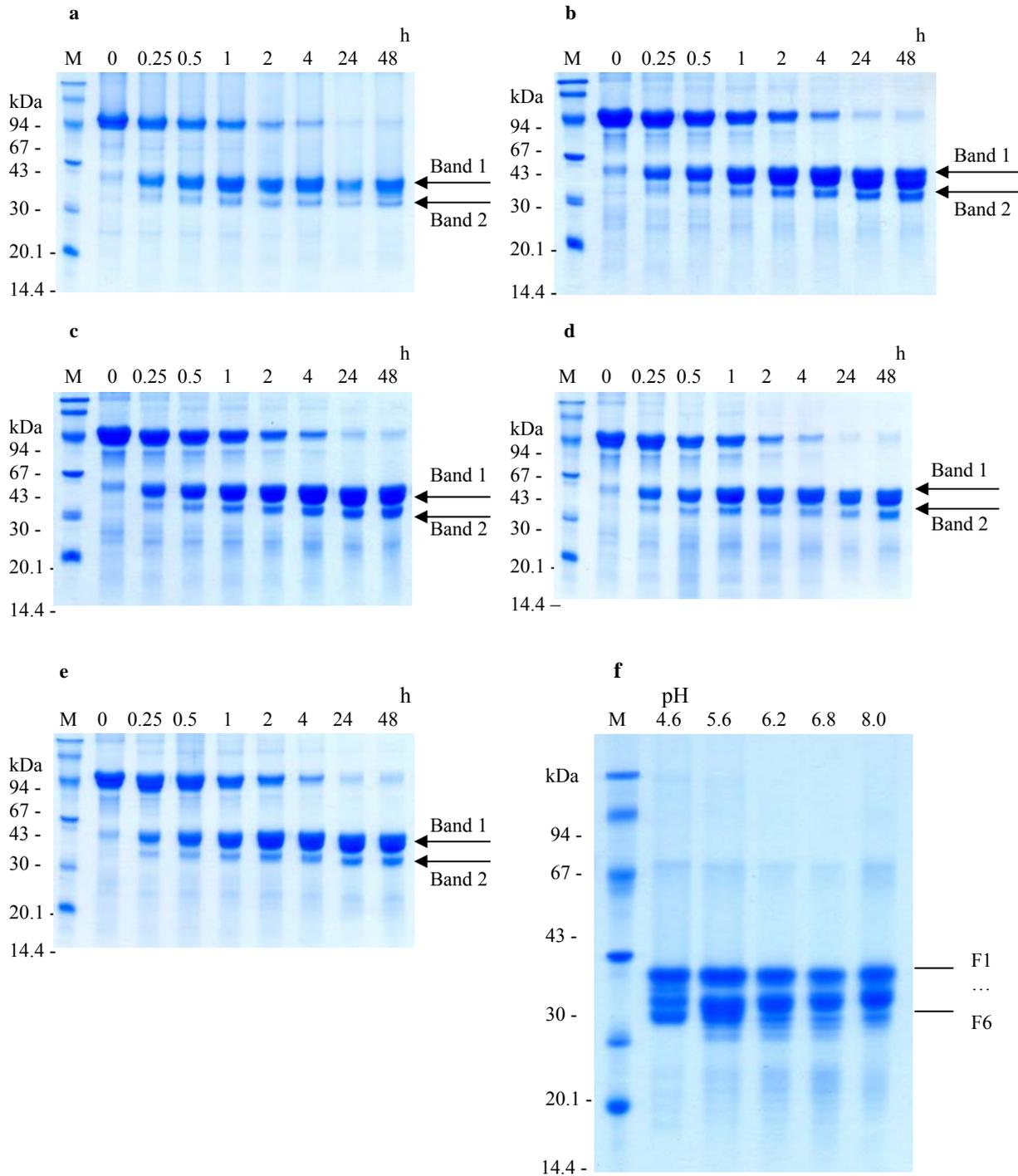


Fig.2. SDS/PAGE electrophoregrams of phaseolin hydrolysed by papain at pHs: 4.6 (a), 5.6 (b), 6.2 (c), 6.8 (d), and 8.0 (e), and phaseolin hydrolysed 48 h at different pHs (f). Proteins samples were taken at the indicated times and were separated on 12.5% SDS/PAGE under reducing conditions (a-e). The conditions of SDS/PAGE were changed to the acrylamide:methylenebis(acrylamide) ratio of 200:1 in f. On the right are indicated the final fragments designed as band 1 and 2 in a-e and as F1-F6 in f. M, M_r markers.

Table 1

The M_r (kDa) of fragments in the final (48 h) phaseolin hydrolysates (see Fig. 2f)

Fragments	pH				
	4.6	5.6	6.2	6.8	8.0
F1	27.0	26.9	27.0	26.9	27.4
F2	25.6	-	24.5	24.3	25.0
F3	23.9	24.2	23.1	23.2	23.6
F4	22.4	22.6	22.0	22.3	22.6
F5	-	21.4	21.3	21.2	21.3
F6	-	20.3	20.6	20.6	-

Phaseolin is a trimer of three types of similar subunits termed: β , α , and α' consisting of 397, 411, and 412 amino acid residues, respectively [19]. Each subunit has two potential glycosylation sites [20] and both singly and doubly glycosylated species are known to exist *in vivo* [21] which cause the appearance of molecular heterogeneity of phaseolin subunits [22]. As a result when phaseolin is subjected to SDS/PAGE it can be separated into four polypeptides, called size class [21], with M_r in the range from 45 to 52 kDa [20,21]. Not all four polypeptides are present in phaseolin prepared from different strains of *Phaseolus*. Three- and two-banded subunit patterns for phaseolin are also known [14]. It was shown by Stockman et al. [18] that these bands can be more easily separated by changing the acrylamide:methylenebis(acrylamide) ratio to 200:1. We decided to use similar electrophoretic conditions (Fig.2f) in order to separate the fragments formed during phaseolin hydrolysis by papain that could not be separated under standard ratio of 37.5:1 acrylamide:methylenebis(acrylamide) (Fig.2a-2e). Under these conditions six fragments are present in phaseolin hydrolysates. These fragments were labelled F1 through F6 according to decreasing of their M_r (Fig.2f and 2g). It is interesting that the papain action on phaseolin at pH 4.6 result in formation of four fragments (Fig.2f) which resemble the CPPh action on phaseolin at pH 4.6 [10]. The M_r of three of these fragments (F2 – F4) have similar M_r to those generated by CPPh while the first fragment (F1) has a higher M_r . With the increase in pH two changes take place in this pattern of fragments. First, F2 seem to undergo a more profound modification and it almost merges with F3 (especially at pH 5.6), and secondly, two more fragments (F5 – F6) with a lower M_r are formed, thus increasing their number to six (Fig.3f). All six fragments are present only at pHs 6.2 and 6.8 (Fig.2f and 2g). Nielsen et al. [5] have found that after 30 min of hydrolysis at pH 6.2 phaseolin is only slightly hydrolysed by papain. Apart from fragments that correspond to half subunits they also detected two other groups of fragments: one with M_r of approximately 35 kDa and another around 14 kDa [5]. Fragments with M_r lower than half subunits have been also found at the action on phaseolin of subtilisin and pronase E at pH 7.5 [5] and of legumain at pH 5.6 [23]. In our experiments we did not detect such fragments (i.e. fragments with the M_r markedly different from half M_r of native subunit) at any point during the time course of hydrolysis at any pHs. Taking into account the size of fragments as well as the absence of intermediary products it is possible to assume that the cleavage of phaseolin by papain take place in the middle of phaseolin subunits with subsequent splitting off of a few peptides from the N- and/or C-terminuses, which is similar to the results obtained at the CPPh action on phaseolin [10].

Non-denaturing gradient pore PAGE showed that the modification of phaseolin by papain seems not to disrupt the molecule's quaternary structure during the hydrolysis at any pH (Fig.3). The final high M_r products of phaseolin hydrolysis by papain will be subsequently referred to as phaseolin-Pap (in order to distinguish it from the final high M_r product formed at the hydrolysis of phaseolin by pepsin and named phaseolin-P [9]). During the time course of proteolysis the M_r of phaseolin-Pap undergoes a gradual decrease at all pHs (Fig.3a-3d). It is interesting to note that this is true even for pH 4.6 (Fig.3b) despite the fact that at this pH phaseolin-Pap start to fall into precipitate after 2 h of hydrolysis. The final (after 48 h of hydrolysis) M_r of phaseolin-Pap (Fig.3f) decreases from 140 kDa to 116, 112, 114, 115, and 116 kDa, at pH 4.6, 5.6, 6.2, 6.8, and 8.0, correspondingly which represents a diminishing of M_r by approximately 17, 20, 19, 18, and 17 %, respectively.

correspondingly (Fig.1c). These results show that the highest degree of modification of phaseolin molecule is attained at pH 5.6 (Fig.3f and 1c). The diminution of phaseolin-Pap M_r show that the papain cleaves off a considerable number of short peptides from the phaseolin molecule at all pHs. In the case of action of both endogenous cysteine proteases, legumain and CPPh, on phaseolin it also has been established that modified phaseolin, phaseolin-LLP [23] and phaseolin-CPPh [10], correspondingly, retain their quaternary structure. However, while the M_r of phaseolin-LLP decreases only by 2 % (to 137 kDa) [23] and that of phaseolin-CPPh decreases by 9 % (to 128 kDa) [10] the M_r of phaseolin-Pap is much lower, decreasing by as much as 20 % (to 112 kDa) at pH 5.6 (Fig.3f and 1c). Up to now such a deep modification of native phaseolin was observed only at the action of trypsin at pH 8.0 [9].

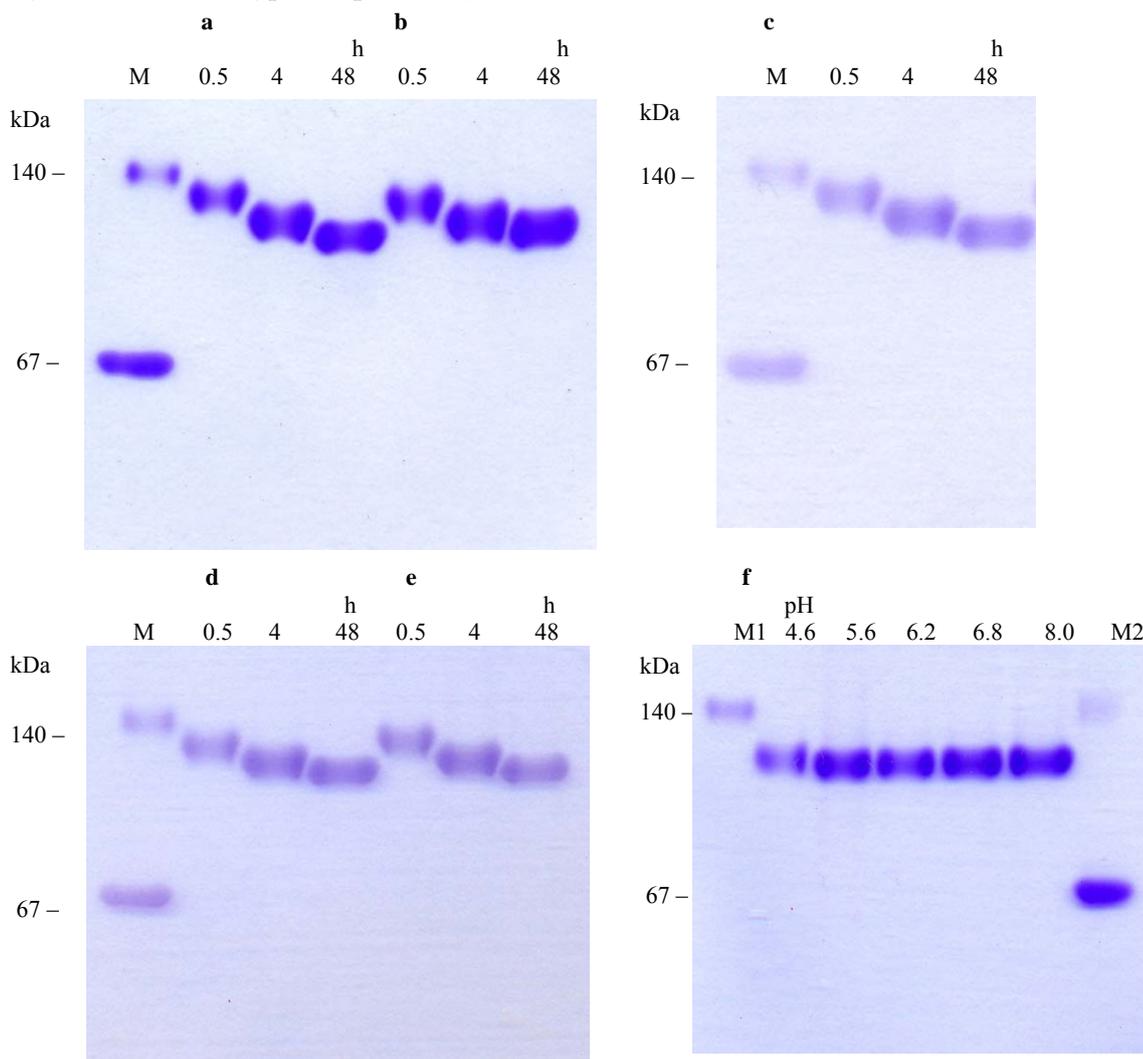


Fig.3. Non-denaturing gradient pore PAGE electrophoregrams of phaseolin hydrolysed by papain at pH: 4.6 (**b**), 5.6 (**a**), 6.2 (**c**), 6.8 (**d**), and 8.0 (**e**), and phaseolin hydrolysed 48 h at different pHs (**f**). The protein samples were taken at the indicated times, and the reaction was stopped by the addition of 100 μ M sodium iodoacetate, an inhibitor of cysteine proteinases. M, M_r markers: native phaseolin (M1 in **f**) and BSA (M2 in **f**).

Proteolysis of SP, by both exogenous [8] and endogenous [24] proteinases, takes place in stages that are distinct by mechanism (see the Introduction). As a result SP are completely hydrolysed to short peptides. The results, presented in this work, show that phaseolin hydrolysis by papain seem to take place in two stages: at the beginning, during the first hour of hydrolysis, the phaseolin is hydrolysed about 11 % at pHs 5.6, 6.2, 6.8, and 8.0, while after that the rate of hydrolysis slows down (Fig.1b). However, the native phaseolin subunits

are not modified completely during the first stage of hydrolysis (Fig.2). Phaseolin-Pap formed during this period changes its M_r afterwards (Fig.3). Moreover, in the end, phaseolin hydrolysis stops after the maximum 28 % of protein breakdown (Fig.1c). Thus the mechanism of phaseolin proteolysis by papain differs from the basic mechanism of SP proteolysis [8,24]. And since the same mechanism of phaseolin proteolysis is observed also at the action of both exogenous [9] and endogenous [10,11] proteases it suggests one more time that it is due to the peculiarities of phaseolin structure. Finding the mechanism by which phaseolin molecule is protected from destabilisation still remains a task to be elucidated.

An explanation for phaseolin resistance to the action of proteases was proposed in the basis of differences between its tertiary structure and that of other 7S SP [9,10]. However, as already has been mentioned (see the Introduction), phaseolin protomer reversibly associate and dissociate at different pHs [12]. Naturally arise the question whether this unusual pH-dependent association/dissociation behaviour of phaseolin might influences its susceptibility to proteolysis and explain its unusual resistance to proteolysis. Our results on the action of papain on phaseolin at different pHs confirm the high resistance of most of the phaseolin molecule to the proteolytic attack and show that the cleavage of phaseolin subunits by papain does not result in the destabilisation of phaseolin quaternary structure. It seems that papain, like legumain and CPPh, does not have direct access to the regions of phaseolin molecule essential for keeping its tertiary and quaternary structure. However, our results also show that with the increase in pH the susceptibility of phaseolin to the action of papain increases (Fig.1b and 1c). Although the patterns of phaseolin hydrolysis are similar at all pHs (Fig.2) the loss of total protein is different (Fig.1b, 3f and 1c). More than that the values of residual protein calculated from the data of native gradient pore PAGE differ from those determined directly (Fig.1c). If the content of residual protein at the action of papain reaches a final degree of hydrolysis of 1%, 21%, 27%, 27%, and 28% at pH 4.6, 5.6, 6.2, 6.8, and 8.0, correspondingly (Fig.1b and 1c) then the M_r of Phaseolin-Pap diminishes by approximately 17, 20, 19, 18, and 17 %. (Fig.3f and 1c). These results show that only at pH 5.6 the protein loss determined by these two methods is about the same (Fig.1c). Thus the quantitative determination of the content of residual protein indicates that with the increase in pH at pH values higher than 6.2 a part (approximately 10 %) of phaseolin is susceptible to further unlimited proteolysis and is slowly hydrolysed completely by papain (Fig.1b, 3f and 1c). This differs from the action on phaseolin of both endogenous, CPPh and legumain [10, 23], and exogenous, trypsin [9], where the protein loss determined by two methods is in good agreement. Since phaseolin trimer retains its structure after hydrolysis by papain at all investigated pHs (Fig.3f) and since starting with pH 6.2 the difference in protein loss determined by these two methods is about 10 % (Fig. 1c) our results would suggest that the dodecamer dissociation into trimers, which occurs with the increase in pH [12], results in that that more sites in phaseolin molecule become accessible (available) to the papain attack which in its turn leads to that that a part of phaseolin modified at these pHs becomes susceptible to further unlimited proteolysis by papain.

Because the problem of deficiency of protein in alimentation of humans is still actual, the interest expressed for the study of vegetal proteins has never ceased [3]. Alimentation ration of humans across the globe contains 70% vegetal proteins from cereal and legume cultivars. Therefore, food legumes are one of the major food sources and are considered as the major source of dietary proteins among plant species. One of the important issues connected with the resistance of phaseolin to proteolysis is the quality of protein source for food. Digestibility and the content of indispensable amino acids are basic parameters in determining the quality of a protein source for food [25]. The presence of less digestible protein fractions in traditional diets lowers considerably their nutritional value [25]. That is why enhanced digestibility represents one of the targets for legume seed protein improvement [3]. It is well known that in contrast to other 7S SP, native phaseolin is highly resistant to *in vitro* proteolysis by digestive proteinases [5,9]. Its digestion *in vivo* also is reduced [6,26,27]. It has been shown that after disruption of phaseolin structure by heating phaseolin hydrolysis is rapid and complete [5]. However, a recent study has shown that not only unheated phaseolin is resistant to *in vitro* proteolysis but that the susceptibility to pepsin of heat-treated phaseolin also varies across common bean varieties [28]. This indicates that susceptibility to proteolysis affects the nutritional value even of heated phaseolin. Consequently, the resistance of phaseolin to proteolysis by digestive proteases is an important factor contributing to its poor nutritive value and thereby its bioavailability. Therefore finding modalities of enhancing phaseolin susceptibility to proteolysis could be one of the possible criterions of choice in breeding programs aimed at improving the nutritional value of common beans.

Conclusions

In summary, this work shows that in the pH range from 4.6 to 8.0 papain action on phaseolin results mainly in limited modification of phaseolin molecule by non-co-operative proteolysis. Our results confirm the high resistance of phaseolin molecule to the proteolytic attack and are consistent with the previous reports [5,9,10,11]. However, they also show, for the first time, that pH influences phaseolin proteolysis by papain. At pH 4.6 only 1% of phaseolin is hydrolyzed while at pH 8.0 - 28%. The comparison of results on residual protein determination by a dye-binding method and native gradient pore PAGE indicates, that at pHs higher than 6.2 a part of modified phaseolin is susceptible to complete proteolysis by papain. Since it is known that phaseolin undergoes reversible oligomerization with pH, it seems that phaseolin dodecamer dissociation at higher pHs makes phaseolin protomer more susceptible to proteolysis by papain. Certainly, more research is needed to be addressed in the future for understanding the relationships between phaseolin property to reversibly associate and dissociate with the changes in pH and the degree of its resistance/susceptibility to proteolysis.

References:

- Godfray H.C.J., Beddington J.R., Crute I.R., Haddad L., Lawrence D., Muir J.F., Pretty J., Robinson S., Thomas S.M., Toulmin C. Food security: The challenge of feeding 9 billion people // *Science*, 2010, vol.327, p.812-818.
- Müntz K. Proteases and proteolytic cleavage of storage proteins in developing and germinating dicotyledonous seeds // *J. Exp. Bot.*, 1996, vol.47, p.605-622.
- Wang T.L., Domoney C., Hedley C.L., Casey R., Grusak M.A. Can we improve the nutritional quality of legume seeds? // *Plant Physiol.*, 2003, vol.131, p.886-891.
- Kimura A., Fukuda T., Zhang M., Motoyama S., Maruyama N. and Utsumi S. Comparison of physicochemical properties of 7S and 11S globulins from pea, fava bean, cowpea, and french bean with those of soybean - french bean 7S globulin exhibits excellent properties // *J. Agric. Food Chem.*, 2008, vol.56, p.10273-10279.
- Nielsen S.S., Deshpande S.S., Hermodson M.A., Scott M.P. Comparative digestibility of legume storage proteins // *J. Agric. Food Chem.*, 1988, vol.36, p.896-902.
- Liener I.E., Thomsen R.M. *In vivo* and *in vitro* studies of the digestibility of the major storage protein of the navy bean (*Phaseolus vulgaris*) // *Qual. Plant. Plant Foods Hum. Nutr.*, 1980, vol.30, p.13-25.
- Mills E.N.C., Jenkins J., Marigheto N., Belton P.S., Gunning A.P. and Morris V.J. Allergens of the cupin superfamily // *Biochem. Soc. Transactions*, 2002, vol.30, p.925-929.
- Vaintraub I.A. Kinetics of co-operative proteolysis // *Nahrung.*, 1998, vol.42, p.59-60.
- Jivotovskaya A., Senyuk V., Rotari V., Horstmann C. and Vaintraub I. Proteolysis of phaseolin in relation to its structure // *J. Agric. Food Chem.*, 1996, vol.44, p.3768-3772.
- Rotari V., Senyuk V., Jivotovskaja A., Horstmann C. and Vaintraub I. Proteinase A-like enzyme from germinated kidney bean seeds. Its action on phaseolin and vicilin // *Physiologia Plantarum*, 1997, vol.100, p.171-177.
- Zakharov A., Carchilan M., Stepurina T., Rotari V., Wilson K. and Vaintraub I. A comparative study of the role of the major proteinases of germinated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) seeds in the degradation of their storage proteins // *J. Exp. Bot.*, 2004, vol.55, p.2241-2249.
- Sun S.M., Mcleester R.C., Bliss F.A. and Hall T.C. Reversible and irreversible dissociation of globulins from *Phaseolus vulgaris* seed // *J. Biol. Chem.*, 1974, vol.249, No7, p.2118-2121.
- Menard R., Storer A.C. Papain // In: Barrett A.J., Rawlings N.D., Woessner J.F., eds. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. - New York: Academic Press, 1999.
- Hall T.C., McLeester R.C. and Bliss F.A. Equal expression of the maternal and paternal alleles for polypeptide subunits of the major storage protein of the bean *Phaseolus vulgaris* // *Plant Physiol.*, 1977, vol.59, p.1122-1124.
- Vaintraub I.A., Morari D. Applying the increase in rate constants of cooperative proteolysis to the determination of transition curves of protein denaturation // *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2003, vol.57, p.191-201.
- Vaintraub, I.A., Yattara, H.B. Proteolysis of Kunitz soybean trypsin inhibitor. Influence on its activity // *J. Agric. Food Chem.*, 1995, vol.43, p.862-868.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*, 1970, vol.227, p.680-685.
- Stockman D.R., Hall T.C. and Ryan D.S. Affinity chromatography of the major seed protein of the bean (*Phaseolus vulgaris* L.) // *Plant Physiol.*, 1976, vol.58, p.272-275.
- Lawrence M.C., Izard T., Beuchat M., Blagrove R.J. and Colman P.M. Structure of phaseolin at 2.2 Å resolution. Implications for a common vicilin/legumin structure and the genetic engineering of seed storage proteins // *J. Mol. Biol.*, 1994, vol.238, p.748-776.

20. Doyle J.J, Schuler M.A., Godette W.D., Zenger V., Beachy R.N. and Slightom J.L. The glycosylated seed storage proteins of *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris*. Structural homologies of genes and proteins // J. Biol. Chem., 1986, vol.261, p.9228-9238.
21. Sturm A., van Kuik J.A., Vliegthart J.F.G., and Chrispeels M.J. Structure, position, and biosynthesis of the high mannose and the complex oligosaccharide side chains of the bean storage protein phaseolin // J. Biol. Chem., 1987, vol.262, p.13392-13403.
22. Lioi L., Bollini R. Contribution of processing events to the molecular heterogeneity of four banding types of phaseolin, the major storage protein of *Phaseolus vulgaris* L. // Plant Mol. Biol., 1984, vol.3, p.345-353.
23. Rotari V.I., Morari D., Stepurina T. Characterization of phaseolin modified by legumain // Studia Universitatis. Seria „Științe ale naturii”, 2007, no7, p.139-146.
24. Shutov A.D. and Vaintraub I.A. Degradation of storage proteins in germinated seeds // Phytochemistry, 1987, vol.26, p.1557-1566.
25. Gilani G.S., Cockell K.A., Sepehr E. Effects of antinutritional factors on protein digestibility and amino acid availability in foods // J. AOAC Int., 2005, vol.88, p.967-987.
26. Begbie R., Ross A.W. Resistance of the kidney bean reserve protein, phaseolin, to proteolysis in the porcine digestive tract // J. Sci. Food Agr., 1993, vol.61, p.301-307.
27. Montoya C.A., Leterme P., Beebe S., Souffrant W.B., Mollé D., Lallès J.-P. Phaseolin type and heat treatment influence the biochemistry of protein digestion in the rat intestine // Brit. J. Nutr., 2008, vol.99, p.531-539.
28. Montoya C.A., Leterme P., Victoria N.F., Toro O., Souffrant W.B., Beebe S., Lallès J.-P. Susceptibility of phaseolin to in vitro proteolysis is highly variable across common bean varieties (*Phaseolus vulgaris*) // J. Agric. Food Chem., 2008, vol.56, p.2183-2191.

Prezentat la 15.05.2012

INFLUENȚA PREPARATULUI *MELONGOZIDA O* ȘI A MICROELEMENTELOR ASUPRA CONȚINUTULUI GLUCIDELOR ÎN FRUNZE, ÎN ALTE ORGANE ALE SISTEMULUI DONOR-ACCEPTOR LA POMII DE MĂR

Gheorghe ȘIȘCANU, Anatol CECAN

Institutul de Genetică și Fiziologie a Plantelor al AȘM

The performed research on the *Florina* sort (brachytic stock –M 26) was found that the dominant centers of attractions of the metabolic substances during fruit maturation, fruit bud formation and differentiation, are the reproductive organs. The carbohydrate content is higher in fruit and the peduncle as in its leaves and petiole of the fruit formations.

Fotosintezei îi revine unul dintre rolurile determinante în formarea productivității plantelor, iar recolta obținută prezintă produsul final al activității acesteia, include un ansamblu de procese metabolice, coordonate de sistemul donor-acceptor. La baza relațiilor acestuia este forța de atracție a organelor și a sistemului consumatoare, precum și a celor de conservare a substanțelor de rezervă, asigurând în așa fel integritatea plantei [1,2].

Unul dintre obiectivele noastre a fost studierea influenței substanțelor biologice active (SBA) asupra metabolismului centrelor de atracție în diferite fenofaze ale ontogenezei plantelor. La începutul perioadei, după înflorire îi revine procesului de reglare a metabolismului în asigurarea creșterii vegetative pentru formarea suprafeței foliare, iar ulterior și în asigurarea condițiilor metabolice necesare creșterii fructelor, formării și diferențierii mugurilor de rod pentru recolta anului următor.

Reglarea proceselor metabolice și, respectiv, creșterii și dezvoltării plantelor, și, ca urmare, reglarea productivității se poate realiza prin tratarea foliară a pomilor cu substanțe bioactive de proveniență vegetală și în combinație cu microelemente [3,4].

Scopul cercetărilor a fost studierea metabolismului glucidelor în frunze, fructe și în alte organe la pomii de măr tratați cu preparatul Melongozida O în amestec cu microelementele Zn și B.

Material și metode

Cercetările au fost efectuate în condițiile casei de vegetație (lizimetre) cu regim hidric controlat. Soiurile luate în studiu – *Florina* și *Golden Delicious*, altoite pe portaltoi pitic M-26 și semipitic MM-106. Schema experienței: 1 – martor (stropire cu apă); 2 – Zn (0,1% sulfat de zinc) + B (0,05% acid boric); 3 – Melongozida O (0,001%) + Zn + B. Tratamentele foliare cu preparatele menționate au fost efectuate în două reprize: prima la 8-10 zile după înflorire, a doua – la 10-12 zile după înflorire .

Au fost evaluați următorii indici: conținutul glucidelor în pețiol și frunze, în fructe, în pedunculul fructului și în muguri [5], lungimea și diametrul lăstarilor, formarea suprafeței frunzei.

Probele de frunze de pe formațiuni fructifere – piteni cu fructe și fără fructe (ultimii se consideră că vor forma muguri de rod), pețiolul frunzelor, fructul și pedunculul fructului au fost colectate conform fazelor fenologice pe parcursul perioadei de vegetație. Au fost colectate și probe de muguri. Datele obținute au fost prelucrate statistic [6].

Rezultate și discuții

Cercetările efectuate în condițiile casei de vegetație la soiul *Florina* altoit pe portaltoi pitic M-26 permit a constata că, comparativ cu martorul, la plantele tratate cu preparatul Melongozida O și cu microelementele Zn și B conținutul glucidelor reducătoare și totale în frunzele pitenilor cu fructe și fără fructe este mai sporit în fenofaza încetinerii creșterii lăstarilor (06.07.2011, Fig.1). Aceeași legitate se afirmă și în fenofaza anterioară de creștere intensivă a lăstarilor (14.06.2011), cu excepția că nivelul cantitativ al glucidelor este aproximativ de 1,2-1,6 ori mai mare în comparație cu rezultatele obținute în perioada premergătoare încetinerii creșterii lăstarilor și declanșării proceselor inducției florale. De asemenea, se constată că la plantele tratate cu preparatele menționate conținutul zaharozei în această perioadă a vegetației este în diminuare în frunzele pitenilor fără fructe. Mai accentuat conținutul de zaharoză s-a manifestat la tratarea foliară a pomilor cu preparatul Melongozida O în combinație cu microelementele Zn și B.

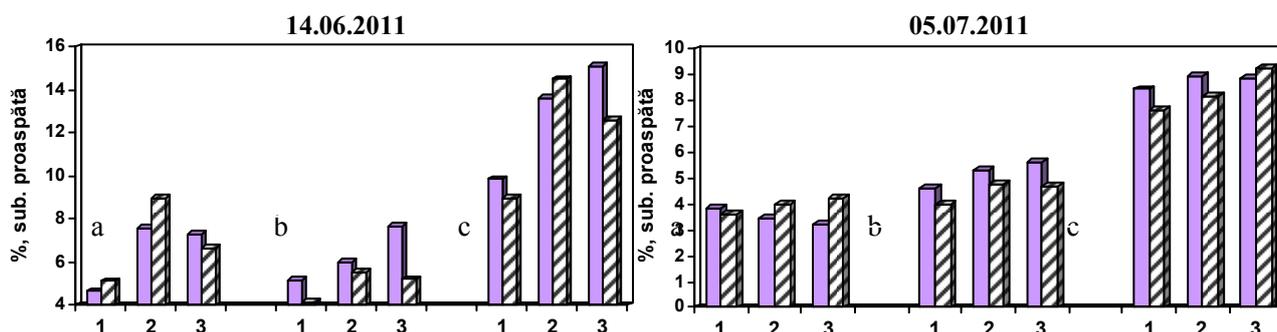


Fig.1. Influența preparatului Melongozida O și a microelementelor Zn și B asupra conținutului glucidelor în frunze la pomii de măr, % substanță proaspătă. Soiul *Florina*, M-26, 2011.

Legenda: 1 – martor; 2 – Zn+B; 3 – Melongozida O+Zn+B; □ – frunzele pintenilor cu fructe; ▨ – frunzele pintenilor fără fructe; a – glucide reducătoare; b – zaharoză; c – glucide totale.

Determinând glucidele în frunze în perioada intrării fructelor în pârgă, maturării lor, formării și diferențierii mugurilor de rod (27.07.2011), am constatat că, în comparație cu plantele netratate, tratamentele aplicate au contribuit la sporirea celor trei forme de glucide – reducătoare, totale și a zaharozei în frunzele pintenilor cu fructe. În frunzele pintenilor fără fructe această legitate se referă numai la nivelul cantitativ al glucidelor reducătoare și totale, iar nivelul zaharozei este în diminuare. În comparație cu martorul, tratamentele (stropirea) foliare aplicate la soiul *Golden Delicious* altoit pe portaltoi semipitic MM-106, conținutul glucidelor în frunzele pintenilor fără fructe în această perioadă a vegetației (27.07.2011) este la un nivel mai scăzut, ceea ce confirmă că procesele formării mugurilor de rod la acest soi în perioada respectivă este în diminuare.

Diminuarea conținutului de zaharoză, ca cel mai preferențial compus de transport al glucidelor spre acceptor în fenofaza încetirii creșterii lăstarilor, intrării fructelor în pârgă și maturării lor are loc datorită faptului că centrul de atracție a substanțelor metabolice sunt formațiunile fructifere în care se desfășoară formarea și diferențierea mugurilor florali. Această legitate se confirmă și la determinarea glucidelor în muguri. Rezultatele obținute arată că conținutul glucidelor și, mai accentuat, al zaharozei este mai mare (1,2-1,3 ori) în mugurii florali decât în cei foliali. Datele obținute atestă că fluxul de substanțe metabolice este orientat mai intens spre organele reproductive, în cazul dat – spre formarea mugurilor de rod. Cercetările efectuate în perioada intrării fructelor în pârgă, maturării lor, formării și diferențierii mugurilor de rod (04.08.2011) denotă că conținutul glucidelor reducătoare, al zaharozei și al glucidelor totale este mai sporit în fructe, urmat de pedunculul fructului (Fig.2). De menționat că nivelul cantitativ al glucidelor totale și al zaharozei este mai scăzut în pețiolul și în frunzele pintenilor decât în pedunculul fructului și în fruct. Aceasta permite a constata că fluxul substanțelor metabolice sintetizate în frunze este direcționat spre organele consumatoare, și anume – către fructe.

Datorită tratamentelor foliare cu preparatul Melongozida O în amestec cu microelementele Zn și B, creșterea lăstarilor și diametrul lor, formarea suprafeței foliare la soiul *Florina* altoit pe portaltoi M-26 au cuprins valori mai mari în fenofaza creșterii intensive a lăstarilor. Investigațiile efectuate demonstrează că tratamentele foliare cu soluții ale preparatului Melongozida O în amestec cu microelementele Zn și B influențează asupra proceselor metabolice și asupra mobilizării fluxului de substanțe din frunze – ca donator, spre centrele de atracție, sau consumatoare, și stimulează creșterea, dezvoltarea și activitatea aparatului fotosintetic. Utilizarea acestor preparate asigură acumularea biomasei și, ca urmare, repartizarea mai rațională a substanțelor metabolice.

Concluzii

Cercetările efectuate în condițiile casei de vegetație (lizimetre) cu regim hidric controlat permit a constata că tratamentele foliare ale pomilor de măr cu preparatul Melongozida O de proveniență vegetală și în combinație cu microelementele Zn și B au contribuit la diminuarea zaharozei, a celui mai important compus de transport al glucidelor spre organele plantei – frunzele pintenilor fără fructe în perioada încetirii creșterii lăstarilor, intrării fructelor în pârgă, maturării lor. Aceasta demonstrează că centrele de atracție a substanțelor metabolice sunt orientate spre organele reproductive, unde se formează mugurii de rod. S-a constatat că conținutul glucidelor este mai sporit în pedunculul fructului și în fructe decât în frunze și în pețiolul ei – ultimele fiind și organe donatoare.

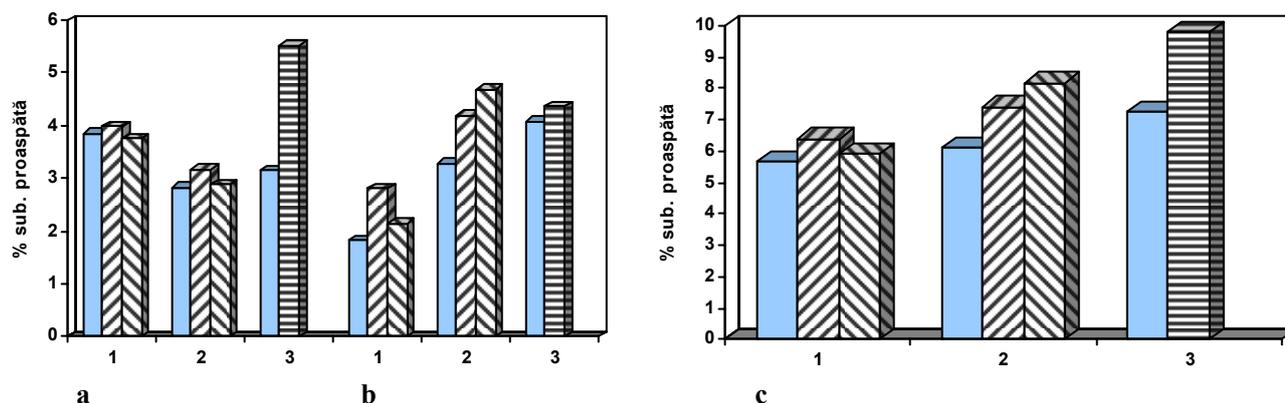


Fig.2. Conținutul glucidelor în diferite organe la pomii de măr, % sub. proaspătă. Soiul *Florina*, M-26, 04.08.2011.

Legenda: 1 – ■ – frunzele lăstarilor anuali; /// – frunzele pintenilor cu fructe; \\\ – frunzele pintenilor fără fructe. 2 – ■ – pețiolul frunzelor lăstarilor anuali; /// – pețiolul frunzelor pintenilor cu fructe; \\\ – pețiolul frunzelor pintenilor fără fructe. 3 – ■ – pedunculul fructului; ≡ – fructul. a – glucide reducătoare; b – zaharoza; c – glucide totale.

Cercetările efectuate au demonstrat că la soiul *Florina* altoit pe portaltoi pitic M-26 fluxul asimilatelor spre organele consumatoare se realizează mai eficient la varianta tratării foliare a pomilor cu preparatul Melongozida O în amestec cu microelementele Zn și B.

Referințe:

1. Курсанов И. Транспорт ассимилятов в растения. - Москва: Наука, 1976.
2. Мокронос А. и др. Фотосинтез, физиолого-экологические и биохимические аспекты. - Москва: Изд-во МГУ, 1992.
3. Șișcanu Gh. și col. Optimizarea activității fotosintetice a plantelor de cais sub acțiunea Melangozidului O. Cercetări în pomicultură. - Chișinău: 2006, vol.5, p.140-145.
4. Cecan A. Influența procedeele de utilizare a microelementelor asupra creșterii și productivității pomilor tineri de măr // Fertilitatea și productivitatea plantelor agricole. - Chișinău, 1994, p.11-20.
5. Ермаков А. и др. Методы биохимического исследования растений. - Москва: Колос, 1987, с.42-120.
6. Юдин Ф. Методика агрохимических исследований. - Москва, Колос, 1975, с.154-173.

Prezentat la 10.03.2012

ROLUL GLUCIDELOR ÎN STABILIZAREA STĂRII MORFOFUNCȚIONALE A SPERMEI DE COCOȘ ÎN PROCESUL DE CRIOCONSERVARE

Ion BALAN

Institutul de Fiziologie și Sanocreatologie al AȘM

Carbohydrates are energy substrate for spermatozoa, which determine the need to include them in composition of the medium, both for hypothermic preservation as well as for super hypothermic of the sperm. The investigations undertaken in this paper had proposed to analyse physicochemical properties of carbohydrates on morphofunctional state of rooster spermatozoa in cryoconservation process of sperm. Experimental data have established that the inclusion of maltose in protective medium for rooster sperm contribute to maintain morphological state of spermatozoa and significantly reduces the concentration of their pathological forms. Stabilization of mobility, longevity and absolute index of rooster sperm survival is possible by using isotonic solutions of carbohydrates in the composition of synthetic medium for rooster sperm. The cryoconservation process of rooster sperm, diluted in cryoprotective medium, supplemented with solutions of nonelectrolyte in optimal concentration generate maintaining at a significant level of the functional indexes of rooster spermatozoa by using maltose and their decrease in case of use of lactose for this purpose.

Introducere

Glucidele reprezintă substratul energetic pentru spermatozoizi, ceea ce determină necesitatea includerii lor în componența mediilor, atât pentru păstrarea hipotermală, cât și superhipotermală a spermilor [1-4]. În plus, glucidele sunt reglatori puternici ai osmozei mediului intra- și extracelular. Un interes deosebit reprezintă capacitatea glucidelor, îndeosebi a dizaharidelor, de a menține activitatea spermatozozilor crioconservați, în lipsa crioprotectorilor stabiliți [5]. Există ipoteze care relevă că glucidele au o influență stabilizatoare asupra membranelor celulare, formând legături hidrogene puternice între grupele hidrofiele ale glucidelor și grupele polare ale fosfolipidelor. Concomitent se consideră că dizaharidele sunt mai eficiente decât monoglucidele în activitatea lor protectoare, datorită influenței asupra compușilor membranei citoplasmatică. Efectul crioprotector al glucidelor asupra spermatozozilor este înregistrat și în cazul mediilor sintetice hipertonică ($450-550 \text{ m}^{\text{Osmol}}$) la viteze mari de răcire ($100-300^{\circ}/\text{min}$) [6].

În contextul celor expuse, prezentele cercetări au vizat studierea proprietăților fizico-chimice ale glucidelor asupra stării morfofuncționale a spermatozozilor de cocoș în procesul de conservare a spermei.

Material și metode

În investigații s-a folosit sperma de cocoș, care a fost recolectată prin metoda de masajare, cu folosirea spermerezervorului din sticlă în corespundere cu cerințele „Instrucțiunii pentru însămânțarea artificială a păsărilor”.

Ejaculatele recolectate au fost apreciate prin folosirea metodelor general acceptate pentru determinarea indicilor morfofuncționali ai spermei. Prin metodele de apreciere a indicilor fiziologici am urmărit scopul să determinăm în materialul seminal numărul de spermatozoizi într-o unitate de volum (indicele concentrației celulelor), numărul spermatozozilor vii cu mișcare rectilinie (indicele mobilității) și durata timpului de supraviețuire a lor la anumită temperatură (indicele longevității). Indicii studiați au fost determinați la temperaturi confortogene potrivit aplicării parametrilor etapelor tehnologice de manipulare a spermei.

Congelarea și decongelarea spermei s-a realizat conform schemelor clasice de crioconservare în formă de pastile la temperatura azotului lichid cu particularitățile specifice pentru sperma de cocoș.

Estimarea formelor patologice în spermă constă în determinarea numărului de spermatozoizi cu aspect anormal în rezultatul examenului morfologic al acestora. Valoarea acestui indice a fost studiată prin metoda microscopiei luminescente.

Analiza statistică a datelor experimentale s-a efectuat cu folosirea criteriilor parametrice după Student. Concluziile sunt bazate pe diferențele statistic autentice între loturi [7]. Rezultatele sunt exprimate ca medie \pm eroare standard. Pragul de semnificație prezentat: $P < 0,05$.

Rezultate și discuții

La crioconservarea spermei animalelor agricole în componența mediilor protectoare se utilizează zaharidele: mono-, di- și trizaharidele [4,8,9]. Folosirea pe larg a zaharidelor în componența mediilor pentru diluarea și congelarea spermei se explică prin faptul că zaharidele în componența mediilor provoacă diminuarea conductibilității spermei, care contribuie la micșorarea aglutinării spermatozoizilor produse de pierderea sarcinii electrostatice. Deplasarea de către zaharide a potențialului de oxidoreducere de asemenea influențează benefic asupra materialului seminal [3,4].

Este cunoscut că toate glucidele au eutectică scăzută, vâscozitate înaltă la temperaturile mai joase de 0°C și influențează asupra formei și dimensiunilor canalelor în apa neînghețată.

În același timp, glucidele asigură în mediul extern și intern presiunea osmotică corespunzătoare spermatozoizilor și, totodată, servesc ca substrat energetic al celulelor, în condițiile aerobe și anaerobe; stabilizează complexe proteolipidice ale membranelor celulare și structura citoscheletului; manifestă activitate protectoare asupra spermatozoizilor, înlocuind complet sau parțial crioprotectorii acceptați [3]. Concomitent, mecanismul de acțiune al unor zaharide, în particular al glucozei, se realizează prin modificările stării componentelor citoplasmatici ai celulei, realizând astfel o sporire a integrității ei după acțiunile temperaturilor joase și ultrajoase [10].

Reieșind din cele expuse, au fost efectuate cercetări ale influenței glucidelor asupra stării morfofuncționale a materialului seminal de cocoș. La etapa inițială a investigațiilor s-a studiat acțiunea hidraților de carbon asupra structurilor morfologice ale spermatozoizilor (*a se vedea* Tabelul).

Tabel

Influența glucidelor asupra gametopatiilor în sperma de cocoș

Nr. ctr.	Componența mediilor sintetice	Spermatozoizi cercetați	Spermatozoizi întregi		Spermatozoizi patologici	
			Bucăți	%	Bucăți	%
1.	Glucoză-glicerină-gălbenuș	300	221	73,7 ± 1,27	79	26,3 ± 1,27
2.	Lactoză-glicerină-gălbenuș	300	170	36,7 ± 1,43*	130	43,3 ± 1,43*
3.	Rafinoză-glicerină-gălbenuș	300	215	71,7 ± 1,69	85	28,3 ± 1,69
4.	Maltoză-glicerină-gălbenuș	300	238	79,8 ± 1,16*	62	22,2 ± 1,16*
	În total (media)	1200	844	70,3 ± 1,32	356	29,7 ± 1,32

*Diferența este autentică în comparație cu media experienței.

Datele prezente în Tabel demonstrează că numărul grupelor glicozidice în molecula hidraților de carbon (glucoza, lactoza, rafinoza, maltoza), spre deosebire de materialul seminal de taur în aceleași condiții [4,9], nu manifestă influență asupra conținutului de forme patologice ale spermatozoizilor.

În acest caz, rata gametopatiilor este, practic, determinată nu de numărul grupelor glicozidice în moleculă, dar de proprietățile fizico-chimice ale glucidului experimentat, întrucât lactoza și maltoza sunt dizaharide. În mediul cu lactoză gametopatiile în materialul seminal de cocoș constituie 43,3±1,43%, iar, în condiții similare, includerea maltozei în componența mediilor contribuie la majorarea semnificativă a spermatozoizilor întregi până la 79,8±1,16%. Una dintre cauzele înregistrării acestor devieri poate fi faptul că monoglucidele se caracterizează în exclusivitate prin legături hidrogeno conform tipului, geometriei și energiei care le formează. Mecanismul acțiunii lor se realizează la stabilizarea apei prin modificarea stării componentelor citoplasmice ale celulei, sporind păstrarea ei după influența factorilor de crioconservare [10]. Într-o măsură mai mică posedă astfel de proprietăți di- și trizaharidele, cum sunt lactoza, maltoza și rafinoza.

Având în vedere că glucidele, paralel cu proteinele și lipidele, sunt componente principale ale biomembranelor, un interes deosebit prezintă informația cu privire la apartenența interacțiunilor structurale ale lor. De exemplu, glucoza face parte din componența glicolipidelor și glicoproteidelor, xiloza – a proteoglicanilor și glicopro-

teidelor, manoză – a glicoproteidelor și galactoza este compus al tuturor trei glicoconjugate [11]. În acest caz, proprietățile membranelor se determină, preponderent, nu de orice interacțiune specifică între componente, dar de proprietățile fizice ale rezistenței structurii bistratate, viscozitatea regiunii glucidice și polaritatea grupelor implicate [12]. Rezistența membranelor biologice depinde în mare măsură de gradul saturării sau nesaturării resturilor acizilor grași ai fosfolipidelor, care condiționează viscozitatea necesară a componentei glucidice în componența stratului bilipidic în cazul influenței temperaturilor hipotermice. Astfel, în baza mecanismelor de crioprotecție poate fi considerată aptitudinea glucozei în stabilirea biocomplexelor de natură glicoproteică și glicolipidă în membrane (sunt obținute unele dintre cele mai bune rezultate la stabilizarea morfologiei spermatozoidelor de cocoș). Glucoza este substanța stabilizatoare a proteinelor; prin urmare, stabilizează structura citoscheletului la acțiunea factorilor deterioratori în procesul crioconservării [3]. Totodată, drept confirmare a acestui fenomen servește stabilizarea biocomplexelor glicoproteice la includerea în componența mediului crioprotector a manozei [4], diminuează calitatea spermei decongelate.

Ameliorarea rezultativității crioconservării spermei este reală în rezultatul perfecționării mediilor crioprotectoare prin utilizarea procedurilor tehnologice eficiente pe baza cercetărilor experimentale, efectuate la diferite niveluri de organizare a obiectelor biologice. Potrivit priorității rolului biocomplexelor în activitatea membranelor plasmatică, în experiențele ulterioare am studiat acțiunea monozaharidelor, componente principale ai derivaților glucidici ale membranelor asupra indicilor fiziologici ai spermei de cocoș.

În particular, în experiențe separate a fost determinată eficacitatea neelectroliților în componența mediilor crioprotectoare pentru diluția și congelarea spermei de cocoș. Pentru aceasta, în calitate de neelectroliți au fost utilizate soluții izotonice de glucoză, zaharoză, maltoză și rafinoză. La prima etapă sperma de cocoș s-a diluat cu soluțiile enumerate și a fost determinată eficacitatea glucidelor după indicii fiziologici ai spermatozoidelor (mobilitatea, longevitatea, indicele absolut al supraviețuirii (IAS)). Rezultatele experimentale sunt prezentate în Figura 1.

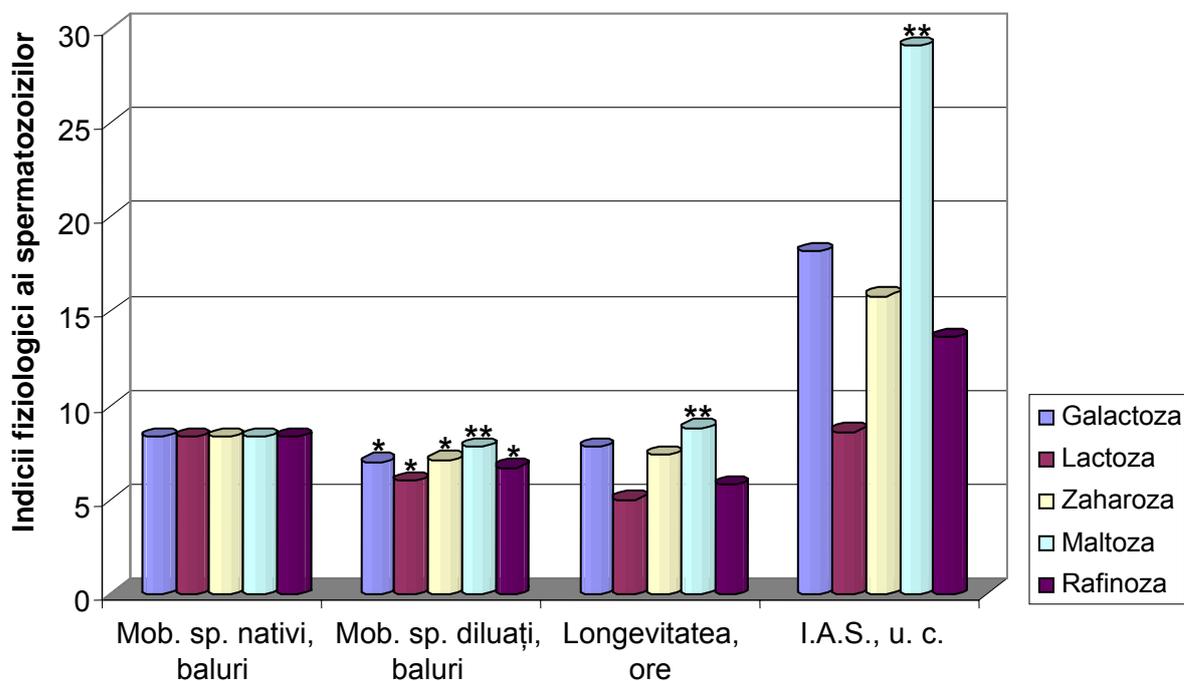


Fig.1. Eficacitatea zaharidelor în componența mediilor sintetice pentru sperma de cocoș.

* Diferențele sunt statistic autentice în comparație cu sperma nativă.

** Diferențele sunt statistic autentice în comparație cu varianta aplicării lactozei.

Datele prezentate în Figura 1 relevă că utilizarea soluțiilor izotonice de hidrați de carbon pentru diluarea spermei de cocoș contribuie la menținerea calității spermei. De exemplu, micșorarea mobilității spermatozoizilor diluați se produce la nivelul la care se asigură viabilitatea înaltă a spermilor. Excepție constituie soluția izotonică de maltoză, care a asigurat cel mai înalt indice al spermatozoizilor diluați. Longevitatea și indicele absolut de supraviețuire a spermatozoizilor sunt cele mai minore în varianta de utilizare a lactozei și cele mai majore la utilizarea maltozei.

Efectul folosirii neelectroliților ca componente ale mediilor pentru diluarea și păstrarea spermei de cocoș poate fi lămurit prin faptul că neelectroliții contribuie la diminuarea electroconductibilității și la stabilizarea presiunii osmotice [4].

În continuare, soluțiile izotonice de neelectroliți au fost utilizate pentru crioconservarea spermei de cocoș. Acțiunea neelectroliților a fost evaluată conform mobilității spermatozoizilor. Rezultatele sunt prezentate în Figura 2.

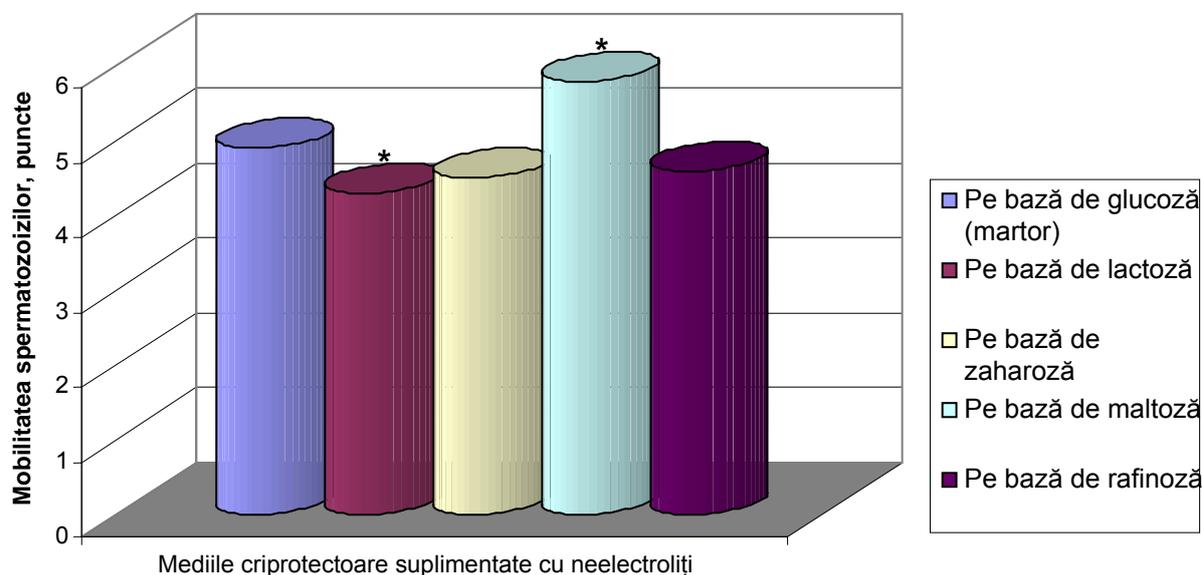


Fig.2. Eficacitatea glucidelor la crioconservarea spermei de cocoș.

*Diferențele sunt statistic autentice în comparație cu lotul martor.

Datele din Figura 2 denotă că folosirea soluțiilor izotonice de neelectroliți pentru crioconservarea spermei de cocoș permite a obține mobilitatea gameților în limitele $4,3 \pm 0,19$ și $5,8 \pm 0,12$ puncte. În cazul utilizării maltozei în componența mediului crioprotector au fost înregistrate cele mai înalte rezultate ($5,8 \pm 0,122$ baluri). Includerea lactozei în componența mediului a dus la diminuarea mobilității spermatozoizilor. La experimentarea celorlalte glucide au fost stabilite rezultate practic identice cu cele din varianta martor.

Influența pozitivă a di- și trizaharidelor poate fi argumentată prin faptul că primele, interacționând cu moleculele de apă, formează legături puternice care contribuie la structurarea apei, iar dizaharidele, prioritar, influențează pozitiv integritatea capului spermatozoizilor în comparație cu monoglucidele [3]. Mai mult, di- și trizaharidele provoacă o mai mare scădere a punctului de cristalizare a apei [13]. Printre ele, cu aceleași proprietăți se întâlnesc și zaharide reduse.

Astfel, prezența glucidelor în componența mediilor crioprotectoare pentru sperma de cocoș inițiază inhibarea procesului de peroxidare a lipidelor din membrane și diminuarea acumulării produselor toxice ale acestui proces. În rezultat, se ameliorează calitatea materialului seminal decongelat și selectiv se stabilizează indicii fiziologici ai spermatozoizilor de cocoș.

Concluzii

1. S-a stabilit că includerea maltozei în componența mediilor protectoare pentru sperma de cocoș contribuie la menținerea stării morfologice a spermatozoizilor și semnificativ micșorează concentrația formelor patologice ale spermatozoizilor.

2. Stabilizarea mobilității, longevității și indicelui absolut de supraviețuire a spermatozoizilor de cocoș este posibilă prin utilizarea soluțiilor izotonice de hidrați de carbon în componența mediilor sintetice pentru sperma de cocoș.

3. Procesul de crioconservare a spermei de cocoș diluate în mediul crioprotector, suplimentat cu soluții de neelectroliți în concentrații optime, provoacă menținerea la un nivel semnificativ a indicilor funcționali ai spermatozoizilor de cocoș la utilizarea maltozei și diminuarea lor, în cazul folosirii în acest scop a lactozei.

Referințe:

1. Wishart G.J. Liquid semen storage: current status and where do we go from here? // Proceedings of the 22nd World's Poultry Congress, Istanbul, Turkey, 2004, p.1801.
2. Курбатов А.Д. Крiоконсервация спермы птиц. Крiоконсервация спермы с-х животных. - Ленинград: Агропромиздат, 1988, с.195-250.
3. Линник Т.П., Мартынюк И.Н. Подходы к созданию крiозащитных сред при крiоконсервации спермы птиц // Проблемы крiобиологии, 2010, Том 20, №1, с.109-122.
4. Наук В.А. Структура и функция спермиев сельскохозяйственных животных при крiоконсервации. - Кишинев: Штиинца, 1991.
5. Sztejn J.M., Noble K., Farley J.S., Mobraaten, L.E. Comparison of permeating and nonpermeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation // Cryobiology, 2001, vol.41, no.1, p.28-39.
6. Woelders H. et al. Animal genetic resources conservation in the Netherlands and Europe: poultry perspective // Poultry Science, 2006, vol.85, p.216-222.
7. Лакин Г.Ф. Биометрия. - Москва: Высшая школа, 1980.
8. Blesbois E. Current status in avian semen cryopreservation // World's Poultry Science Journal, 2007, vol.63, p.213-222.
9. Борончук Г.В., Балан И.В. Структурно-функциональные и биохимические изменения в биологических системах при крiоконсервации. - Chișinău: Tipografia AȘM, 2008.
10. Мельникова О.В., Бондаренко Т.П. Модифицирующее действие глюкозы на чувствительность эритроцитов к температурному и осмотическому стрессу. - În: Физико-химические процессы в крiобиологических системах. - Харьков, 1991, с.68-78.
11. Болдырев А.А. Введение в мембранологию. - Москва: Изд-во МГУ, 1990.
12. Ивков В.Г., Берестовский Г.Н. Липидный бислой биологических мембран. - Москва: Наука, 1982.
13. Пушкаръ Н.С. и др. Крiопротекторы. - Киев: Наукова думка, 1978.

Prezentat la 15.06.2012

ASPECTE MEMBRANO-STRUCTURALE ÎN PĂSTRAREA BIODIVERSITĂȚII PRIN CRIOCONSERVARE

Ion BALAN

Institutul de Fiziologie și Sanocreatologie al AȘM

Preserving organism biodiversity is possible by genepool cryoconservation, which is followed by fundamental researches to elucidate the mechanism of cryodestruction and cryoprotection in different level of organization of biological objects, including in the spermatozoa's membrane structures. First, at lipids level, which are essential and integral components of membrane and perform important functions in the viability of biological objects – energy source, biological active substance.

Our researches focused on determining of lipids in rooster and boar spermatozoa membrane in cryoconservation process.

The results have elucidated lipid spectrum in rooster and boar spermatozoa plasma membrane in cryoconservation process. Experimentally was established a significant decrease of the cholesterol:phospholipids proportion value in the freezing-defrosting process of the rooster sperm. It was ascertained that increase of the cholesterol:phospholipids proportion in the cryoconservation process of boar sperm is predetermined by the cholesterol and phospholipids interactions of the synthetic mediums and structural elements of the plasma membrane.

Introducere

În ultimii ani, impactul antropogen asupra mediului ambiant a dus la diminuarea biodiversității, care poate atrage în lanț dispariția continuă a altor organisme vii. În legătură cu aceasta, capătă o semnificație deosebită păstrarea genofondului tuturor organismelor existente. Actualmente, rata dispariției speciilor este mai avansată față de măsurile întreprinse de protecție a mediului, iar pentru reorientarea acestei tendințe este necesară, paralel cu alte măsuri, păstrarea genofondului prin crioconservare.

În același timp, este remarcabil faptul că metodele criobiologice, din motive instabile și reduse ale proprietăților bioobiectelor la crioconservare, sunt insuficiente pentru soluționarea problemelor abordate. Prin urmare, recomandabile sunt cercetările fundamentale de elucidare a mecanismelor de criodistrucție și crioprotecție a celulelor sexuale. Investigații cu impact sunt necesare la diferite niveluri de organizare a obiectelor biologice, inclusiv în structurile membranare ale spermatozoizilor [1-3].

Unul dintre compușii membranelor sunt lipidele, rolul specific al cărora constă în faptul că ele sunt principalele elemente structurale și funcționale ale membranelor biologice și servesc ca surse energetice pentru spermatozoizi [4]. De asemenea, rolul lipidelor în funcționarea normală a biomembranelor se determină de starea lor fizică, de permeabilitatea selectivă, recepția, interacțiunile intercelulare, transportul biologic, reglarea activității fermenților membranodependenți și de alte procese importante [3,5].

Este cunoscut că lipidele formează nu doar baza structurală a membranelor celulare, determinând gradul de viscozitate, difuzia laterală și asimetria bilaterală, dar sunt și substanțe biologice active, care îndeplinesc funcția compușilor sistemului de transducție a semnalelor, ai modulatorilor activității enzimatică și ai proprietăților de recepție [2,5].

Lipidele sunt printre componentele majore ale membranelor spermatozoizilor, implicate într-o serie de procese [6], în diferite stadii ale reacțiilor de maturizare, capacitație și acrosomale, într-o serie de modificări biochimice și funcționale care se desfășoară în procesul de pregătire sau producere a fecundării [7].

În contextul celor expuse, în prezentul studiu ne-am propus drept scop determinarea conținutului lipidelor din membranele spermatozoizilor în procesul de crioconservare.

Material și metode

În investigații obiectul de cercetare a fost sperma de cocoș și de vier. Ejaculatele recolectate au fost apreciate prin folosirea metodelor general acceptate pentru determinarea indicilor morfofuncționali ai spermei.

Congelarea și decongelarea spermei s-a realizat conform schemelor clasice de crioconservare în formă de pastile la temperatura azotului lichid, cu unele modificări specifice pentru varietățile de spermă.

Extragerea și divizarea lipidelor generale ale membranelor plasmatică s-a petrecut ținându-se cont de proporția 30 mlrd de spermatozoizi în sistemul cloramin:metanol:apă distilată, iar conținutul lor în extract s-a determinat conform metodei lui Bragdon [8].

Identificarea fracțiilor lipidice din spermatozoizi în procesul crioconservării spermei s-a efectuat prin utilizarea metodelor cromatografiei microanalitice.

Analiza statistică a datelor experimentale a fost făcută potrivit criteriilor parametrice după Student. Concluziile sunt bazate pe diferențele statistice autentice între loturi. Rezultatele sunt exprimate ca medie \pm eroare standard. Pragul de semnificație prezentat: $P < 0,05$.

Rezultate și discuții

Lipidele membranelor biologice, particularitățile compoziției lor structurale au un rol deosebit în reacțiile compensatoare la echilibrarea condițiilor mediului, ceea ce permite a influența asupra stării indicilor funcționali ai spermatozoizilor.

Numeroase date demonstrează că la crioconservarea spermei are loc modificarea lipidelor și proteinelor din spermatozoizi, iar criorezistența spermatozoizilor este condiționată în mare măsură de componența membranei plasmatică și de proprietățile ei fizico-chimice [3,9].

Organizarea structurală și activitatea funcțională a biomembranelor se determină în mare parte de particularitățile componentelor structurali, în particular, de caracteristicile structural-funcționale ale lipidelor membranice, participante în funcțiile vitale ale spermatozoizilor. În acest caz, prezintă interes stabilitatea conținutului chimic al membranelor plasmatică și schimbările lui în procesul crioconservării spermei de cocoș.

Reieșind din cele expuse, cercetările noastre au vizat lipidele din membrane, deteriorările spermatozoizilor și posibilele condiții de crioprotecție a lor. Rezultatele determinării conținutului de lipide din biomembranele spermatozoizilor de cocoș în procesul de crioconserare sunt prezentate în Figura 1.

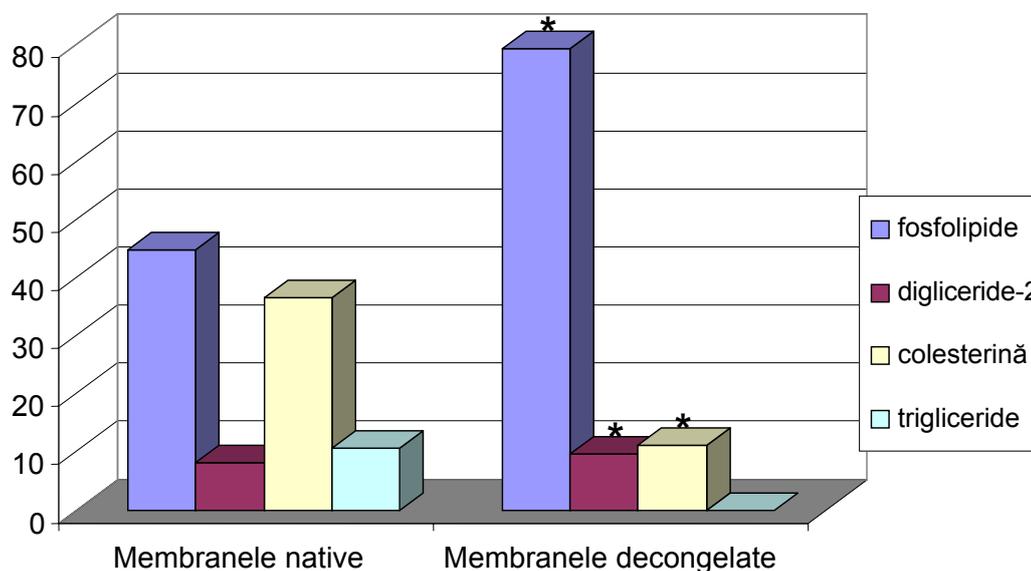


Fig.1. Lipidele membranelor spermatozoizilor de cocoș la crioconservare.

*Diferințele sunt statistic autentice între indicii membranelor native și cele congelate-decongelate.

Datele din Figura 1 ne permit să constatăm că componența lipidică a membranelor spermatozoizilor de cocoș este prezentată în principiu de fosfolipide, gliceride și colesterină, care sunt supuse schimbărilor semnificative sub acțiunea temperaturilor scăzute. De exemplu, este evidențiată diferența autentică între conținutul de fosfolipide în membranele spermatozoizilor nativi și congelați-decongelați. În rezultatul prelucrării tehnologice a spermei de cocoș (diluare, refrigerare, congelare și decongelare), conținutul fosfolipidelor în membranele spermatozoizilor se majorează: de la $44,8 \pm 0,05\%$ în membranele native până la $79,4 \pm 0,26\%$ în cele congelate-decongelate.

Conținutul digliceridei-2 și al trigliceridelor în spermatozoizi în procesul crioconservării spermei de cocoș la fel se supune schimbărilor criogenice. În particular, conținutul digliceridei-2 se majorează autentic în membranele deconserate ale spermatozoizilor – de la $8,04 \pm 0,150$ până la $9,53 \pm 0,173$. Paralel, în procesul de congelare și decongelare a spermei de cocoș are loc scăderea bruscă a conținutului de trigliceride. Din punct de vedere chimic, moleculele trigliceridelor sunt asemănătoare cu cele ale fosfolipidelor, iar deosebirea esențială dintre ele constă în faptul că fosfolipidele nu reprezintă sursă energetică pentru organism, fiind componenți structurali principali ai membranelor celulare [10].

Din conținutul total de lipide, colesterolul constituie $36,5 \pm 0,29\%$ în membranele plasmatiche ale spermatozoizilor nativi, iar prelucrarea criotehnologică a spermei duce la diminuarea concentrației ei până la $11,1 \pm 0,25\%$. Diferențele sunt statistic autentice.

În faza lipidică a membranelor, ca component esențial persistă colesterolul, al cărui metabolism în celule are un caracter integrativ datorită afinității ei majorate [11]. Colesterolul modifică atracțiile dintre lanțurile carbohidrate ale lipidelor [12] și participă în procesul de reorganizare a structurilor membranare [13].

În același timp, este cunoscut că de conținutul colesterolului depinde temperatura de trecere fazică a lipidelor [3,14]. Temperatura de trecere fazică a lipidelor depinde nu doar de conținutul colesterolului, dar și de valoarea raportului colesterol:fosfolipide. În literatura de specialitate datele privind interdependența dintre raportul colesterol: fosfolipide și rezistența spermatozoizilor la șocul termic sunt insuficiente. Ipoteza șocului termic a fost dezvoltată în numeroase cercetări [3,9,15], care au demonstrat că procesul temperatură-dependent, care derulează la nivelul membranelor celulare la congelare, este tranzația fazică a lipidelor, fiind considerată ca etapă inițială în mecanismul șocului termic. Prevederile ipotezei bine concordă cu criodeteriorările determinate de tranzația fazică a lipidelor, însă nu reflectă modificarea altor componente ale sistemelor criobiologice.

Concomitent, coraportul colesterolului cu fosfolipidele în membranele plasmatiche determină, în mare măsură, fluiditatea și sensibilitatea membranelor [16]. Termorezistența membranelor, stabilită anterior, și raportul colesterol:fosfolipide sunt legate reciproc între ele, fapt demonstrat de datele prezentate în figurile 2 și 3.

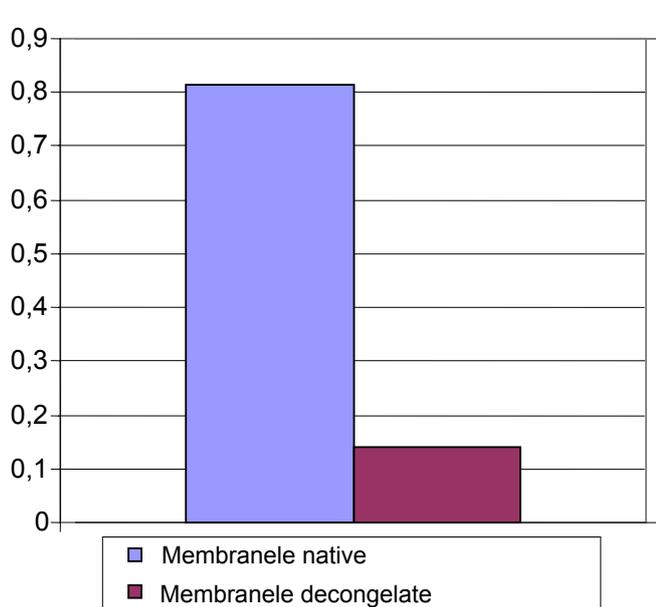


Fig.2. Raportul colesterol:fosfolipide în membranele plasmatiche ale spermatozoizilor de cocoș la crioconservare.

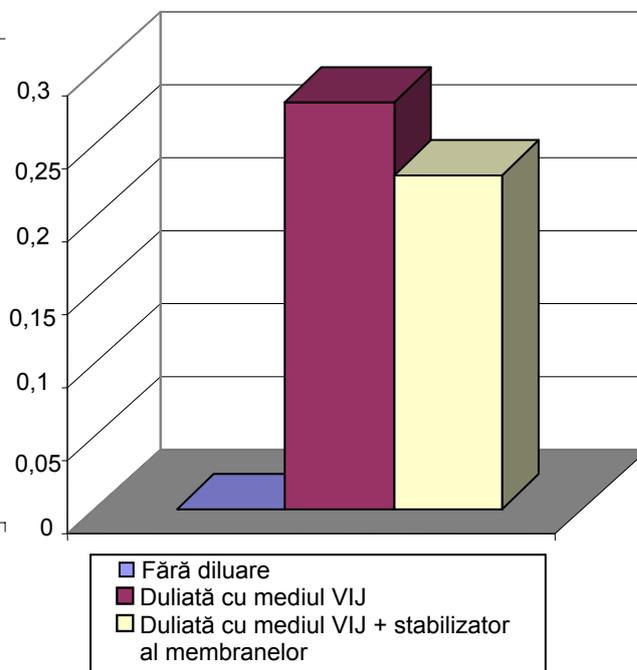


Fig.3. Raportul colesterol:fosfolipide în membranele plasmatiche ale spermatozoizilor de vier la crioconservare

Datele prezentate în figurile 2 și 3 denotă că raportul colesterol:fosfolipide din membranele spermatozoizilor de cocoș sunt supuse transformărilor semnificative sub acțiunea temperaturilor negative. Valoarea acestui

indice scade de la 0,815 până la congelare la 0,139 după decogelarea spermei de cocoș și sporește semnificativ în membranele spermatozoizilor de vier până la 0,279 la diluarea spermei cu mediul sintetic VIJ și până la 0,229 la diluarea spermei cu mediul VIJ la includerea în concentrații optime a stabilizatorului membranelor.

Conform [Blesbois 1], fluiditatea membranelor în materialul seminal proaspăt recoltat s-a dovedit a fi proporțională cu raportul colesterină:fosfolipide și, astfel, scăderea coraportului menționat servește ca un bun indicator anticipat al proprietăților materialului seminal pentru crioconservare, obținut de la diverși masculi din aceeași specie.

Modificarea cantitativă evidentă a raportului colesterină:fosfolipide are și un rol important adaptiv în funcționarea membranelor celulare [17], inclusiv a mecanismelor de adaptare, care modifică componența membranelor la scăderea temperaturii. Având în vedere că conținutul acestor legături se află în corelație directă cu conținutul colesterinei [18], putem menționa că factorii crioconservării influențează mai puternic, comparativ cu lipidele la care pot fi adaptate membranele și, în rezultat, are loc modificarea structurilor membranelor.

În contextul celor expuse, având în vedere criorezistența diferită a spermei de cocoș și de vier, respectiv, ca una dintre cele mai înalte și una dintre cele mai joase, în scop de analiză comparativă, un interes deosebit reprezintă și componența lipidică a membranelor plasmatice ale spermatozoizilor de vier la crioconservare. Rezultatele cercetării spectrului lipidic în sperma de vier și modificarea lui în procesul de crioconservare sub influența factorilor de mediu sunt prezentate în Figura 4.

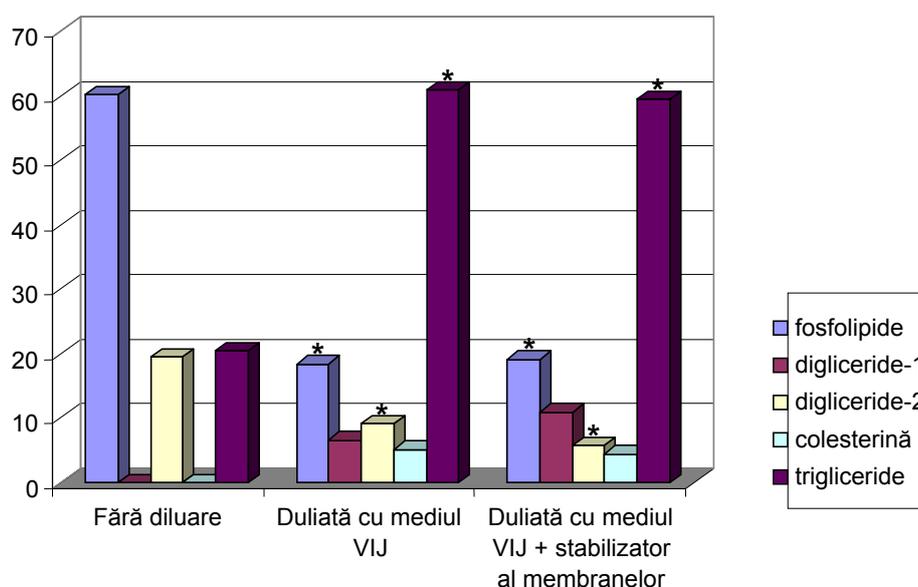


Fig.4. Lipidele membranelor spermatozoizilor de vier la crioconservare.

*Diferințele sunt statistic autentice între indicii variantelor I-II, I-III.

Analiza comparativă a densitogramelor lipidelor din biomembranele spermatozoizilor de cocoș și de vier (figurile 3 și 4) demonstrează, în principiu, proprietățile deosebite ale componenței lipidice. În rezultatul densimetriei fotoplastinelor prelucrate cu componenți lipidici ai spermilor de cocoș sunt stabilite limitele de înaintare a fosfolipidelor, digliceridei-2 și colesterinei, la vier – a fosfolipidelor, digliceridei-2 și a trigliceridelor. Conținutul fosfolipidelor și al digliceridei-2 semnificativ diferă între spermatozoizii speciilor cercetate ($P < 0,001$ și $P < 0,01$, corespunzător). O particularitate caracteristică este absența digliceridei-1 și scăderea semnificativă a conținutului de trigliceride în spermatozoizii de cocoș după congelare și decongelare, iar în spermii de vier, în condiții similare, respectiv – a digliceridei-1 și a colesterinei.

Astfel, datele obținute demonstrează că procesul de crioconservare provoacă modificarea fizico-chimică a componenței lipidice a membranelor. Aceste modificări ale diversității lipidelor în direcția micșorării sau sporirii conținutului lor pentru fiecare în parte pot fi explicate prin interacțiunea colesterinei cu alte componente de natură lipidică sau proteică [5]. În acest caz, sporirea conținutului de fosfolipide poate fi determinată prin formarea complexelor colesterino-fosfolipidice, care coincide și cu rezultatele diminuării colesterinei. Scăderea

conținutului de colesterină în procesul crioconservării spermei de cocoș se demonstrează prin micșorarea numărului legăturilor duble [18], care pot fi deteriorate sub influența factorilor de congelare-decongelare a obiectului studiat.

Concluzii

1. Au fost determinate limitele de înaintare a fosfolipidelor, digliceridei-1 și 2, colesterinei, trigliceridelor și s-a determinat spectrul lipidelor în membranele plasmatiche ale spermatozoizilor de cocoș și de vier în procesul de crioconserare.

2. Experimental este marcată majorarea autentică în membranele spermatozoizilor, după congelarea și decongelarea lor, a conținutului de fosfolipide și scăderea conținutului de digliceridă-2 și de trigliceride în sperma de cocoș.

3. S-a stabilit scăderea semnificativă a valorii raportului colesterină:fosfolipide în procesul congelării și decongelării spermei, influențând la deplasarea trecerilor fazice ale lipidelor membranelor spermatozoizilor, predeterminată și de conținutul înalt al colesterinei în membrane.

4. S-a constatat că sporirea raportului colesterină:fosfolipide în procesul de crioconservare a spermei de vier este predeterminată de interacțiunile dintre colesterina și fosfolipidele mediilor sintetice și elementele structurale ale membranei plasmatiche.

Referințe:

1. Blesbois E. et al. Cryopreservation of avian spermatozoa and predictors of ability to freezing // Les actes du BRG, 2006b, vol.6, p.415-431.
2. Goni F.M. et. al. Molecular and acell Biology of Lipids // Biochim. Biofiz. Acta, 2008, vol.1781, p.11-12.
3. Борончук Г.В., Балан И.В. Структурно-функциональные и биохимические изменения в биологических системах при криоконсервации. - Chișinău: Tipografia AȘM, 2008.
4. Yoneda A., Suzuki K., Mori T. et al. Effects of delipidation and oxygen concentration on *in vitro* development of porcine embryos // Journal of Reproduction and Development, 2004, vol.50, p.287-295.
5. Шишкина Л.Н., Шевченко О.Г. Липиды эритроцитов и их функциональная активность // Успехи современной биологии, 2010, Том 130, № 6, с.587-602.
6. Alvarez J.G. and Storey B.T. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa // Molecular Reproduction and Development, 1995, vol.42, p.334-346.
7. Коуанэги Ф. et. al. Acrosome reaction of cock spermatozoa incubated with the perivitelline layer of the hen's ovum // Poultry Science, 1988, vol.67, p.1770-1774.
8. Скороход В.И., Стефаник М.Б. Методы исследования липидов в органах и тканях животных. - Львов, 1983.
9. Наук В.А. Структура и функция спермиев сельскохозяйственных животных при криоконсервации. - Кишинев: Штиинца, 1991.
10. Скатков С.А. Полиненасыщенный фосфатидилхолин и мужская фертильность // Проблемы репродукции, 2003, №1, с.84-91.
11. Халилов Э.М., Тарховская Т.И., Ипатова О.М. и др. Мембранные белки и фосфолипиды как эффекторы обратного транспорта холестерина // Биомедицинская химия, 2006, № 2, с.113-123.
12. Климов А.Н., Никульчева Н.Г. Липиды, липопротеиды и атеросклероз. - СПб: Питер Пресс, 1995.
13. Карпунин Д.В., Акимов С.А., Фролов В.А. Формирование пор в плоских липидных мембранах, содержащих лизолипиды и холестерин // Биологические мембраны, 2005, Том 22, № 5, с.429-432.
14. Осташко Ф.И. Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей.- Киев: Урожай, 1978.
15. Белоус А.М., Бондаренко В.А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. - Киев: Наукова думка, 1982.
16. Horvath G. & Seidel G.E. Vitrification of bovine oocytes after treatment with cholesterol-loaded methyl-beta-cyclodextrin // Theriogenology, 2006, vol.66, p.1026-1033.
17. Смирнов Л.П., Богдан В.В. Липиды в физиолого-биохимических адаптациях эктотермных организмов к абиотическим факторам среды. - Москва: Наука, 2007.
18. Титов В.Н., Лисицин М.Д. Содержание спиртов холестерина в плазме крови зависит от количества двойных связей жирных кислот в пуле липидов липопротеинов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2006, №11, с.521-524.

Prezentat la 15.06.2012

ИЗМЕНЕНИЯ МЕХАНИЗМОВ БЕЛОК-БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ ПРИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

Ион БАЛАН

Институт физиологии и санокреатологии Академии наук Молдовы

În articol sunt prezentate rezultatele cercetărilor teoretice și practice privind transformările criogenice în interacțiunile proteice intermoleculare din biomembrane. A fost evidențiată derularea proceselor fizico-chimice în membranele plasmactice ale celulei, care depinde de gradul modificărilor matricelui proteic și de schimbările fizico-chimice ale proprietăților proteinelor în membrane la etapele de precongelare. Prin urmare, au fost elucidate mecanismele de criodestrucție, care sunt reacții specifice, condiționate de dereglările interacțiunilor intermoleculare ale proteinelor. S-a stabilit că conținutul sumar al proteinelor spermei de cocoș și de taur la crioconservare nu suportă schimbări esențiale comparativ cu spectrul individual al fracțiilor proteice. La crioconservare în plasma seminală modificarea conținutului α -, β - și γ -globulinelor este specifică pentru cocoș și taur, iar în spermatozoizi dinamica valorii α -, β - și γ -globulinelor manifestă stabilitate cu caracter nespecific pentru speciile studiate.

In this article are presented the results of theoretical and practical research of the cryogenic transformations in intermolecular protein interactions from biomembrane. It was relieved the performance of physicochemical processes in plasma membrane of the cell, which depends on the level of protein matrix modifications and physicochemical changes of the proteins in membrane at the stages of prefreezing. Therefore, has been elucidated the mechanisms of cryodestruction which are specific reactions, conditioned by intermolecular interactions disorders of proteins. It was established that summary content of protein in rooster and ox sperm in cryoconservation does not support significant changes compared with individual spectrum of protein fractions. At cryoconservation, in seminal plasma, modification content of the α -, β - and γ -globulin is specific for rooster and bull, but in spermatozoa the dynamic value of α -, β - and γ -globulins exhibit stability with nonspecific character for the studied species.

Основной проблемой современной криобиологии являются эффективное применение низких температур для сохранения биологических систем и связанные с этим исследования влияния холода на реализацию механизмов, лежащих в основе функционирования данных систем на различных уровнях организации.

В настоящее время ученые проявляют большой интерес к проблеме криоконсервации генома. Один из центральных аспектов этой проблемы – исследование механизмов криоповреждения гамет различных видов животных и разработка эффективных методов их криоконсервации.

Накоплен огромный фактический материал, позволивший высказать различные гипотезы относительно механизмов повреждения биологических объектов и разработать способы криоконсервации семени различных видов животных и человека [1-6]. Однако проблема криоконсервации еще далека от разрешения и в настоящее время, что не позволяет в полной мере использовать генетический потенциал. Это, на наш взгляд, объясняется сложностью механизмов криодеструкций, недооценкой комплексности в изучении влияния низких температур на геном (разобщенностью исследований, осуществляемых физиологами, биохимиками, физиками, медиками, биофизиками и др.), как и недооценкой системного подхода при исследовании крионарушений. Вследствие этого, часто встречаются узкие, лишённые общепризнанного смысла механические трактовки накопленного материала, хотя последний является достаточно ценным и получен при использовании весьма современных методик [7-10].

Одним из экстремальных факторов, воздействующих на геном, является действие низких и сверхнизких температур. Охлаждение любого биологического объекта можно считать мощным стрессорным влиянием, которое, во-первых, вызывает сложный комплекс структурно-функциональных изменений [11] и, во-вторых, ведет к расстройству функций не только организма в целом, но и каждой жизненно важной физиологической системы и органа в отдельности [12, 13]. В клеточных системах при замораживании не успевают развиваться процессы адаптационных перестроек. Охлаждение гамет в зоне гипотермических температур в период эквilibрации хотя и сопровождается резким снижением метаболических процессов, однако не прекращает их полностью. Это обусловлено течением адаптационно-компенсаторных реакций [14].

Учитывая, что вынесенные из организма клетки некоторый временной интервал сохраняют жизнеспособность, можно считать возможным осуществление в них в этот период процессов саморегуляции за счет отрицательной обратной связи, направленной к восстановлению исходного уровня живой системы в целом. [15]. По мнению автора, в ответ на экстремальное воздействие происходит мобилизация потенциальных возможностей, направленная на сохранение гомеостаза клетки.

В случае недостаточной эффективности адаптационно-компенсаторных реакций в клетках имеют место криогенные изменения. Следует отметить, что наиболее лабильными клеточными структурами являются мембраны [16,17].

Из всего многообразия физико-химических процессов, протекающих в клетке, а следовательно – и в плазматической мембране при замораживании и оттаивании [18-20], показано, что решающим из них является возникновение трансмембранных дефектов в плазматической мембране, развитие которых зависит от степени модификации белкового скелета и изменения физико-химических свойств липидов и белков в самой мембране на разных этапах, предшествующих замораживанию.

Специфическая особенность биологического действия холода заключается в том, что первичные повреждения в гаметех локализуются лишь в крайне малых объемах молекулярных размеров. Если повреждения гамет относятся к уникальным структурам клетки (хромосомы, ядро) и затрагивают состав ядерной или клеточной мембраны, эти повреждения вторично могут вызвать большие необратимые нарушения функционального характера [16,21]. Повреждение мембран может существенно нарушить стационарное состояние в гаметех посредством изменения межмолекулярных взаимодействий, их диффузионных параметров, течения ферментативных реакций и других жизненно важных процессов [22-24]. Отсюда следует, что усилия исследователей должны быть направлены на стабилизацию первичных, обратимых изменений, тогда как необратимые регулированию не подлежат.

Повреждения биологических объектов относятся к числу фундаментальных проблем современной криобиологии. Интерес к данной проблеме возрастает по ряду причин, и прежде всего – его стимулируют практические задачи. В настоящее время все больше возникает вопросов о возможности жизни людей, животных и растений в условиях, необычных для нормального функционирования, – при высоких и низких температурах и давлении, повышенной радиации, высоких ускорениях, при недостатке воды, повышенном содержании солей и т. д.

В связи с этим особую значимость приобретает изучение реакции биологических объектов на действие экстремальных по мощности и характеру раздражителей. Велико значение этой проблемы для медицины и сельского хозяйства: альтерация клеточных элементов является одним из звеньев патологического процесса.

Исследование проблемы повреждения привлекает внимание и с теоретической стороны. Это позволит полнее вскрыть механизмы данного процесса. Криоповреждение представляет собой частную форму реакции биологических объектов в ответ на действие температурных факторов среды.

В такой сложной и взаимосвязанной системе, каковой является геном животных, нарушение какой-нибудь одной части, какого-либо элемента или структуры не может оставаться ограниченным, оно, как правило, должно передаваться на другие части и генерализовываться, подчиняясь закономерностям повреждения биологических объектов [19]. Поэтому становится понятным, что при действии повреждающих факторов в процессе криоконсервации изменения свойств гамет обычно должны быть многосторонними и проявляться в разнообразных нарушениях морфологического, физиологического, биохимического и биофизического характера. Вместе с тем, нарушение функциональной активности гамет является наиболее демонстративным и наиболее доступным для исследователя.

Криоповреждения имеют место на всех этапах технологической обработки семени. Однако на температурной шкале существуют критические зоны [25]. Так, исследования температуроиндуцированных структурных переходов на водно-липидной поверхности мембран [26] позволили обнаружить перестройки водно-белковых взаимодействий при температурах 30, 25, 17 и 7 °С. При этом, эти взаимодействия происходят как на внешней поверхности белков, доступной свободному растворителю, так и в полостях биомакромолекул, обусловленных третичной структурой, а также контактами субъединиц в олигомерных ансамблях белков. Аналогичные температурные зоны определены [27] при изучении механизмов стабилизации нативной конформации водорастворимых белков.

Кроме того, существуют силы притяжения, обусловленные гидратацией, причем они гораздо значительнее дисперсионных сил и обладают большей специфичностью. Поверхность мембраны возмущает структуру воды на расстояниях вплоть до нескольких сот пикометров. Для удаления этой воды требуется затратить очень большое количество энергии, что приводит к экспоненциальной зависимости «гидратационных сил» от расстояния между взаимодействующими системами. Специфичность биохимических ассоциаций, например – ассоциаций между белковыми молекулами, зависит не только от взаимодействия между белками, но в значительной мере еще и от взаимодействия поверхности белка с молекулами воды [28].

Анализ, обобщение результатов фундаментальных исследований и проведенных нами экспериментов позволяют выдвинуть положение, согласно которому криповреждения сперматозоидов различных видов животных носят многофакторный характер и имеют место за счет общих (неспецифических) и частных (специфических) реакций. При этом ведущими механизмами криповреждения являются видоспецифические реакции, в основе которых лежат нарушения межмолекулярных взаимодействий, в частности – белок-белковых.

Выявленная зависимость межмолекулярных взаимодействий цитоскелета, в смысле белок-белковых, от уровня их фосфорилирования позволила Сторожку С.А. и др. [29] утверждать о наличии предопределяющего звена регуляции механических характеристик мембран, какими являются их стабильность и деформабильность, опосредованной изменением активности протеинкиназных систем клетки.

Стабильность и лабильность биологических мембран во многом зависят от жесткости цитоскелета, обусловленной межмолекулярными взаимодействиями его компонентов [29].

Снижение температуры приводит к полимеризации белков, сопровождающейся появлением деформации мембран, чему способствуют процессы фосфорилирования, которые активируются в процессе криоконсервации [19].

Так как основными компонентами биомембран являются белки и липиды, исследование их криогенных изменений представляет большой интерес. Анализ спектра собственной флюоресценции периферических и интегральных белков показал, что он обладал одинаковой направленностью и необратимым характером [30]. При этом белки цитоскелета рассматриваются как центральный механизм, обеспечивающий стабильность клеток [19].

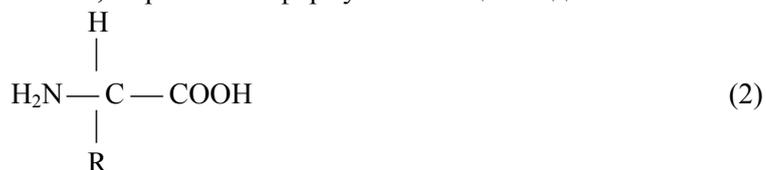
В повреждении биологических структур на этапе низкотемпературного консервирования важное значение имеет нарушение белково-липидных взаимодействий [16, 30]. В связи с этим вызывает интерес как определение степени криповреждений белков в зависимости от их окружения и локализации в липидном бислое, так и выяснение роли мембранных белков в реакции клеточных структур на криовоздействие в целом.

Общую структуру белков можно выразить следующим образом:



где $\text{R}^1 \dots \text{R}^n$ – аминокислоты, соединенные характерной для белков пептидной связью;

α - аминокислоты, из которых строятся белки, выражаются формулой в общем виде



где R - тип боковой группы.

В α -аминокислотах амино- и карбоксильная группы ковалентно связаны с одним атомом углерода, C^α -атомом, в отличие от β , γ и δ -аминокислот, где они разделены несколькими валентными связями.

Порядок расположения остатков в полипептидной цепи представляет собой аминокислотную последовательность (рис.1). Принято считать, что направление полипептидной цепи соответствует направлению от аминного (N-) к карбоксильному (C-) концу. Полипептидная цепь состоит из остова (основная цепь) и боковых радикалов (боковые цепи), которые присоединяются к C^α -атомам.

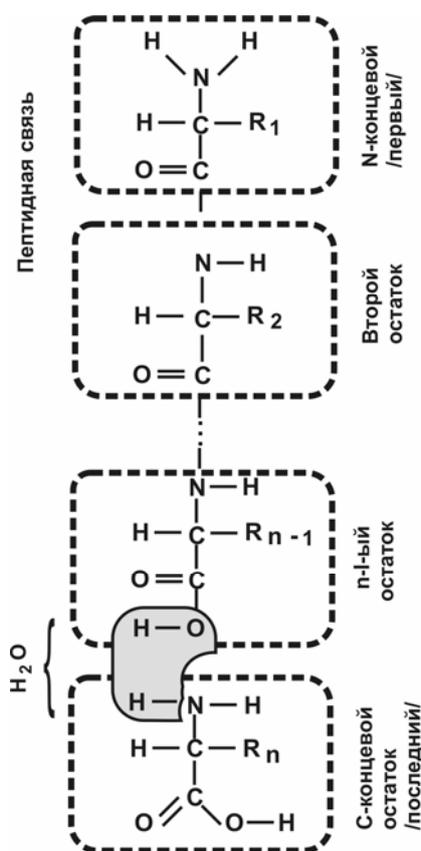


Рис.1. Схема образования полипептидной цепи.

В белках различают ряд структур.

- *Первая структура* (последовательность аминокислот в полипептидных цепях) вместе с другими ковалентными связями (как S-S и диэфирфосфорной кислоты) составляет скелет молекулы.

- *Вторичная структура* образуется геликоидальным закручиванием белков и стабилизируется водородными мостиками между амидными связями (CONH) цепи. Образующаяся конфигурация – плоская. В так называемой α -спиральной конфигурации кератин представляет 3-7 остатков аминокислот для каждого оборота, причем каждый остаток соответствует 1,47 Å передаче вдоль центральной оси.

- *Третичная структура* обязана своим происхождением взаимодействию сил Ван-дер-Ваальса, скоплению гидрофобных боковых цепей ввиду взаимного отталкивания растворителя, некоторых связей S-S между цепями и особым водородным мостиком, существующим между группами OH тирозина или между аминогруппами лизина (другими электроотрицательными группами вдоль цепи). Они обуславливают глобулярную или фибриллярную и другую форму в растворе.

Конкуренция между аминокислотными остатками и молекулами воды за водородные связи и влияние гидрофильных и гидрофобных участков белковой молекулы на структуру воды в ближайшем их окружении делают взаимоотношения между нею и водой важнейшим фактором, определяющим стабильность белковой макромолекулы [31].

В настоящее время полагают, что стабилизация, обеспечиваемая ассоциацией неполярных групп внутри молекулы белка, определяется не столько вандерваальсовыми взаимодействиями, сколько фактом того, что неполярные группы, становясь доступными воде, оказываются причиной неблагоприятной потери энтропии системы, по крайней мере – при низких температурах.

Некоторые типы нековалентных связей, стабилизирующих третичную структуру белка, представлены на рисунке 2.

- *Четвертичная структура* представляет собой объединение нескольких полипептидных субъединиц, обладающих своей определенной структурой, в единую молекулу [32].

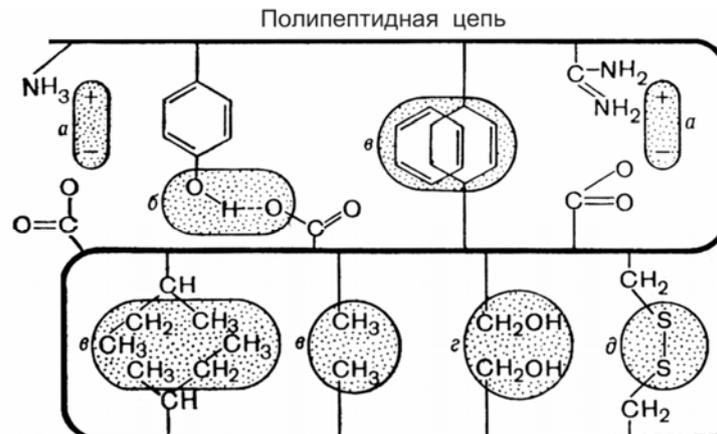


Рис.2. Типы нековалентных связей, стабилизирующих структуры белка.

а – электростатическое взаимодействие; б – водородная связь; в – гидрофобные взаимодействия неполярных групп; г – диполь-дипольные взаимодействия; д – дисульфидная (ковалентная) связь.

При изучении белок-белковых взаимодействий типичны большие значения энтальпии и энтропии. В то время как изменения энтальпии и энтропии характеризуются очень большой зависимостью от температуры, изменение свободной энергии Гиббса в процессах с участием белков остается почти постоянным в широком диапазоне температур. Энтальпийный фактор обычно оказывается преобладающим в реакциях ассоциации при высоких температурах, тогда как при низких температурах более важное значение имеет энтропийный фактор. В некоторых взаимодействиях с участием белков важная роль принадлежит конфигурационной энтропии [28].

Большинство чрезвычайно важных свойств белков обусловлены слабыми невалентными связями, участвующими в межмолекулярных взаимодействиях биополимеров. Энергия этих взаимодействий на один-три порядка меньше энергии ковалентного связывания, однако их многочисленность придает высокую прочность белковым молекулам.

На межбелковые взаимодействия существенное влияние оказывают ионы кальция, которые меняют характер межмолекулярных взаимодействий, направленных на стабилизацию мембранных структур [29, 33-35].

Существенным фактором стабилизации пространственной структуры белков является взаимодействие белковой молекулы с водным окружением [29]. Появление неполярных групп в водной среде приводит к упорядочиванию воды, которая формирует вокруг них регулярные структуры типа квазиполимерной и квазикристаллической льдоподобной решетки, понижая энтропию и увеличивая свободную энергию системы неполярная группа – вода. Таким образом, взаимодействие неполярных групп с водой энергетически менее выгодно, нежели их взаимодействие одна с другой.

Способность неполярных групп ассоциироваться, уменьшая контакты с водой, получила название *гидрофобного эффекта*. Благодаря такому эффекту молекула белка предпочитает сворачиваться в глобулу, на поверхности которой локализованы преимущественно гидрофильные радикалы, а внутри располагается гидрофобное ядро.

Иногда полярные боковые группы белков погружены внутрь глобулы, образуя водородные связи, а отдельные неполярные группы располагаются на поверхности с образованием так называемых “гидрофобных кластеров”, играющих важную роль при взаимодействии с другими белками или липидными участками мембран.

Аминокислотные остатки, входящие в состав белков, по их предрасположенности к локализации внутри или на поверхности глобулы можно разделить на три основных класса: *гидрофобные*, *гидрофильные* и *амбивалентные*. В результате анализа известных пространственных структур белков или сопоставления значений свободной энергии переноса аминокислотного остатка из воды в органический растворитель (например, в этиловый спирт), свойства которого близки к свойствам внешней части белка, можно получить детальную шкалу гидрофобности [36].

Согласно [37], для анализа роли различных взаимодействий между группами атомов в зависимости от их удаленности один от другого по валентной цепи удобно выделить пять классов взаимодействий: *внутриостаточные, локальные, ближние, средние и дальние* (рис.3).

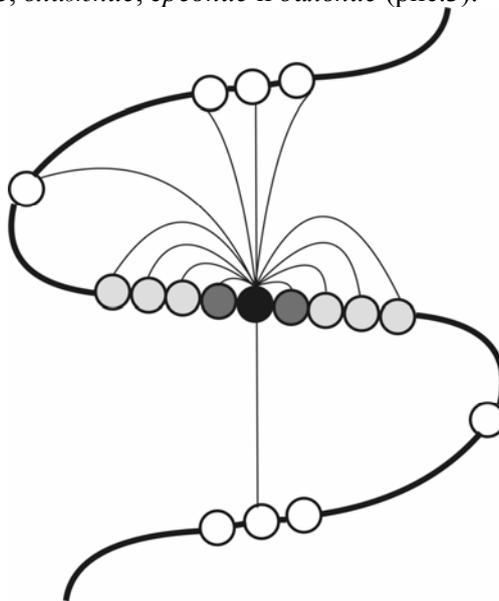


Рис.3. Межмолекулярные взаимодействия в белках.

К *внутриостаточным* относят все взаимодействия между атомами, принадлежащими структурной единице, состоящей из двух смежных пептидных групп и боковой цепи, присоединенной к общему C^{α} -атому.

Взаимодействия атомов данного аминокислотного остатка с ближайшим соседним остатком по валентной цепи со стороны N- или C-конца есть *локальные* взаимодействия. Под *ближними* принято подразумевать взаимодействия остатка с четырьмя предыдущими и четырьмя последующими остатками в аминокислотной последовательности. Взаимодействия между остатками, разделенными по валентной цепи как минимум четырьмя, но не более чем двадцатью остатками, относят к *средним* взаимодействиям. Все заряженные группы молекулы белка взаимодействуют друг с другом на достаточно больших расстояниях в соответствии с обычной обратной зависимостью от расстояния. В случае, когда все заряженные группы расположены на поверхности белковой молекулы, а сама молекула имеет сферическую форму, суммарная электростатическая свободная энергия $F_{\text{элек}}$ может быть весьма приближенно оценена на основе теории Дебая-Хюккеля. Если молекула денатурированного белка отличается по размерам, форме и характеристикам зарядов от молекулы нативного белка, то значения электростатической свободной энергии обоих белков будут различаться между собой и процесс денатурации оказывается связанным с изменением электростатической свободной энергии. При крайних значениях pH, когда молекула белка несет высокий суммарный заряд, указанное изменение электростатической свободной энергии должно благоприятствовать образованию денатурированной формы, так как в этом состоянии заряженные группы будут в среднем разделены большими расстояниями и силы отталкивания будут более слабыми. Эти взаимодействия с другими, более удаленными по цепи аминокислотными остатками считаются *дальними* взаимодействиями [37].

Вполне понятно, что такая классификация не является единственной. Известны и другие классификации [38], (рис.4).

Среди них следует отметить классификацию, которая выделяет взаимодействия между атомами остова, остова и боковых цепей или между атомами, принадлежащими разным боковым цепям. Они так и получили соответствующие названия: взаимодействия *остов-остов*, *остов-боковой радикал*, *боковой радикал-боковой радикал*. Взаимодействия остов-остов определяют общие конформационные возможности полипептидного остова. Взаимодействия остов-боковой радикал – более тонкий механизм регулирования структурной организации, учитывающий взаимное влияние основной и боковой цепи и проявляющийся в дифференциации локальных стерических условий полипептидной

цепи. Взаимодействия боковой радикал-боковой радикал относятся к так называемым специфическим взаимодействиям. Именно благодаря им осуществляется юстировка полной пространственной структуры белковой молекулы.

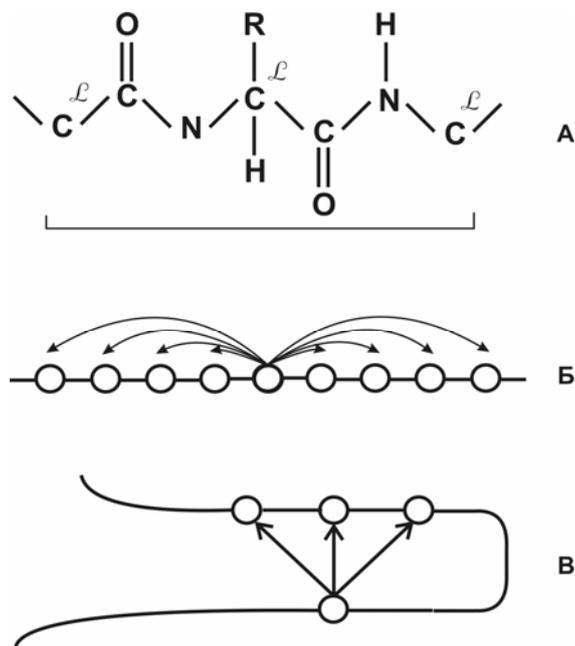


Рис.4. Ближние (А), средние (Б) и дальние (В) взаимодействия в белках.

Внутриостаточные, локальные, ближние, средние и дальние взаимодействия играют различную роль в формировании пространственной структуры белков. Благодаря внутриостаточным взаимодействиям часть конформационного пространства остова, определяемая углами φ и ψ , а также конформационного пространства бокового радикала, задаваемого углами χ , оказывается запрещенной, т.е. эти взаимодействия ограничивают конформационную свободу. Исследование внутриостаточных взаимодействий позволяет отбросить маловероятные конформационные состояния.

Согласно данным Мартин Р. [39], который исследовал взаимодействующие системы, взаимодействия между молекулами одного белка, молекулами различных белков и небольшими ионами характеризуются различными константами скорости. Поскольку измерение скорости диффузии, ультрацентрифугирование и электрофорез требуют для получения желаемой информации сравнительно много времени (порядка нескольких часов), такое взаимодействие в той или иной мере, в зависимости от соотношения различных констант скорости, может сказаться на результатах эксперимента.

Общее уравнение обратимой реакции молекулы белка P с ν молекулами произвольного соединения N (это могут быть молекулы того же белка, какие-либо другие макромолекулы или небольшие ионы или молекулы) имеет вид:



Далее предлагаем рассмотреть отдельно несколько случаев, характеризующихся различными относительными значениями констант скоростей реакций k_1 и k_2 .

1. При $k_1 \ll k_2$ количество образующегося комплекса крайне незначительно или он вовсе не образуется. Система состоит из невзаимодействующих компонентов.

2. При $k_1 \gg k_2$ комплекс образуется в значительных количествах, и система состоит из двух компонентов – комплекса и избыточного количества реагентов. Если избытка исходных соединений нет, в системе присутствует один лишь комплекс и при электрофорезе наблюдается одна-единственная граница, соответствующая этому комплексу.

3. Если значения k_1 и k_2 близки по величине и малы по сравнению со скоростью разделения при электрофорезе, в системе имеются три компонента – оба реагента и комплекс. Необходим внимательный контроль, поскольку система в начальный момент может не находиться в равновесном состоянии.

4. Если k_1 и k_2 велики по величине, равновесие в системе будет восстанавливаться со скоростью, значительно превосходящей скорость разделения.

5. Если скорость реакции и разделения сравнимы между собой (случай, промежуточный между случаями 3 и 4), наблюдаемая электрофореграмма зависит от скорости разделения.

На поверхности раздела между воздухом и водным раствором белка образуется поверхностная пленка, в которой белковые молекулы в значительной степени денатурированы. Их пептидные цепи развернуты и образуют слой толщиной 1 мкм, причем гидрофильные (имеющие сродство к воде) боковые группы ориентированы в сторону водной фазы, а гидрофобные (не взаимодействующие с водой) группы направлены в сторону воздушной фазы. То же самое происходит и на поверхности раздела масло-вода. Понятно, что для глобулярных белков подобное развертывание должно сопровождаться большими изменениями в третичной и четвертичной структурах, ибо при этом все сегменты пептидной цепи должны быть уложены на поверхности раздела в слой толщиной 1 мкм. Отсутствует информация, насколько такая денатурация затрагивает вторичную структуру (иначе говоря, в какой мере изменяется количество альфа-спиралей). Однако там, где гидрофильные и гидрофобные группы чередуются, следует, по-видимому, ожидать полного развертывания цепи. Если же большая часть гидрофильных групп находится с одной стороны альфа-спирали, а большинство гидрофобных групп - с другой, то альфа-спиральная конфигурация должна сохраниться на поверхности раздела. По предположению Д. Хаггиса и др. [40], в целом на поверхности раздела – подобно тому, что имеет место в субъединицах глобулярных белков, часть цепи имеет альфа-спиральную, а часть – какую-то более случайную конфигурацию. Развертывание глобулярного белка, сопровождающееся полным изменением третичной структуры, схематически изображено на рис.5.

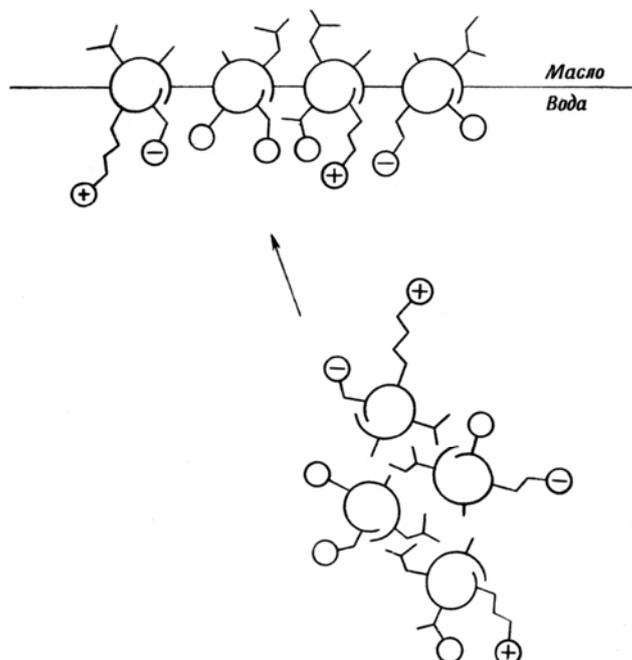


Рис.5. Схема развертывания молекулы белка на поверхности раздела масло-вода и воздух-вода.

Белковая молекула представлена в виде α -спиралей. Схема показывает тип развертывания глобулярной белковой молекулы, который позволяет уложить молекулу в слой толщиной 1 мкм; при этом гидрофобные (углеводородные) группы находятся преимущественно в воздушной или масляной фазе, а гидрофильные ($-O$, $-\oplus$, $-\ominus$) – преимущественно в водной фазе. Пептидные цепи развернутой молекулы изображены в виде α -спиралей; это согласуется с результатами экспериментов Малькольма, выполненных на пептидах со специфическим аминокислотным составом. В какой степени при таком развертывании глобулярного белка сохраняется α -спиральная структура, фактически не известно. На схеме для наглядности все углеводородные боковые группы размещены в масляной фазе или внутри глобулярной молекулы белка, а все полярные группы – в водной фазе. В действительности тенденция к разделению гидрофильных и гидрофобных боковых цепей никогда в полной мере не осуществляется.

На уровне ди- и трипептидов формируются различные типы локальной кривизны полипептидного остова. При этом основными направляющими силами, кроме внутриостаточных взаимодействий, являются локальные взаимодействия, которые формируют потенциальную предрасположенность к появлению определенного типа локальной кривизны. Выбор структуры определенного типа осуществляется преимущественно благодаря ближним взаимодействиям. Но это необязательно, поскольку некоторая часть молекулы может сворачиваться однозначно, в то время как другая часть должна комплементарно к ней пристраиваться благодаря средним и дальним взаимодействиям. Важная роль средних и дальних взаимодействий проявляется при формировании различных элементов супервторичных структур: α -, β -, $\alpha\beta$ - и $\beta\alpha$ -шпилек, $\alpha\alpha$ -углов (включающих α -спирали, β -участки и перетяжки), а также различных типов супервторичных структур.

Локальные и ближние взаимодействия формируют конформационно жесткие фрагменты полипептидной цепи и намечают лабильные участки, вариации которых позволяют комплементарно пристраивать друг к другу разные части молекулы усилиями средних и дальних взаимодействий [37].

Таким образом, в компактных структурах олигопептидов имеет место согласованность между всеми ближними, средними, дальними, внутриостаточными и локальными межмолекулярными взаимодействиями.

Наиболее общий вывод, исходя из специальной литературы, заключается в том, что в фазовых переходах принимают участие как белки, так и липиды с самым различным вкладом этих компонентов для разных мембран и температур, но с обязательным взаимовлиянием липид-белковой или белок-липидной генерализации [41]. Белки не только принимают участие в термических структурных перестройках биологических мембран, но и способны выступать в роли их триггера [6, 17, 19, 42].

Так как в молекуле белков существует большое количество связей и разнообразных взаимодействий [43] (рис.6) и в связи с исключительной их ролью в обеспечении функционирования гамет, особую значимость приобретают исследования этих биополимеров при криоконсервации.

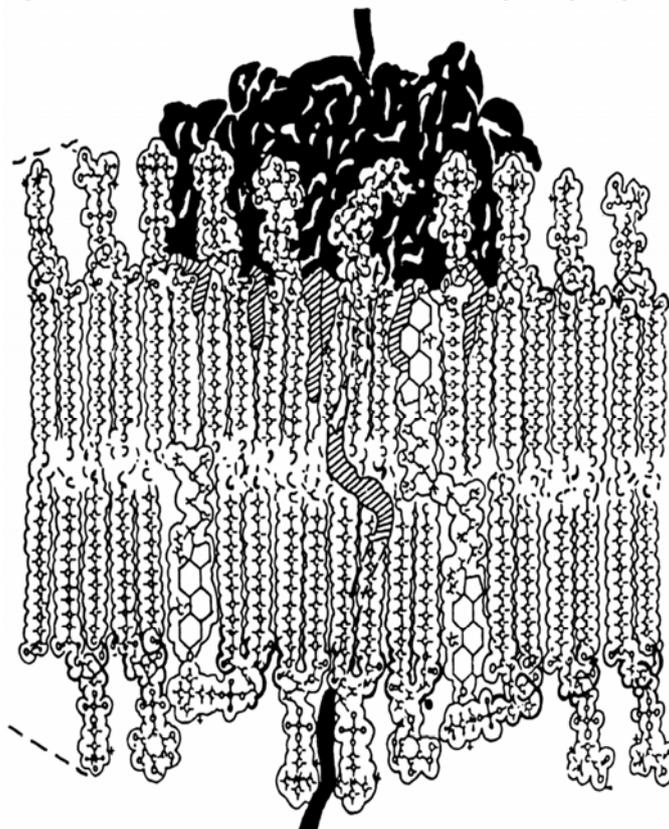


Рис.6. Локализация мембранных компонентов.

Схема-модель предполагаемой локализации белковых субъединиц малого молекулярного веса (черное), осуществляющих полярные и апольярные (косые линии) взаимодействия с липидным монослоем мембраны. Гидрофобный участок (спиралевидный) субъединицы белка (или гликопротеида) прошивает жирнокислотную область липидного бислоя мембраны с выходом рецепторного участка на ее противоположную гидрофильную поверхность.

В процессе замораживания и оттаивания они существенно не меняются, могут иметь место конформационные изменения, количественные и качественные изменения отдельных белковых фракций.

Белковые фракции определяли экспресс-методом по Олл-Маккорду. Принцип метода основан на свойстве фосфатных растворов различной концентрации осаждать белки. Величину оптической плотности растворов определяли на спектрофотометре СФ-46 при длине волны 750 нм. Содержание отдельных фракций определяли в грамм-процентах. Принимая количество общего белка за 100 и зная количество каждой фракции, проводили расчет содержания белковых фракций в процентах (табл. 1-2).

Таблица 1

Белковый спектр нативного и оттаянного семени быка

Наименование	Цельное семя	%	Оттаянное семя	%
	M ± m		M ± m	
Плазма, мг/мл				
Альбумины	3,6 ± 0,26	13,5	13,7 ± 2,84*	35,8
Альфа-глобулины	18,2 ± 1,84	68,7	17,2 ± 0,84	44,9
Бета-глобулины	2,0 ± 0,40	7,6	4,0 ± 1,48	10,5
Гамма-глобулины	2,7 ± 0,18	10,2	3,4 ± 1,48	8,8
Всего	26,5 ± 1,91	100	38,3 ± 3,63	100
Гаметы, г/млрд				
Альбумины	5,1 ± 1,48	14,4	12,8 ± 7,92	49,7
Альфа-глобулины	7,6 ± 4,0	21,6	4,0 ± 1,13	15,6
Бета-глобулины	5,8 ± 1,27	16,4	2,5 ± 1,15	9,7
Гамма-глобулины	16,8 ± 3,27	47,6	6,5 ± 1,73*	25,0
Всего	35,7 ± 5,52	100	25,8 ± 8,27	100
Итого, плазма+гаметы	61,8 ± 5,84		64,1 ± 9,03	

Примечание: *Различия достоверны по сравнению с цельным семенем.

Таблица 2

Белковый спектр нативного и оттаянного семени петуха

Наименование	Цельное семя	%	Оттаянное семя	%
	M ± m		M ± m	
Плазма, мг/мл				
Альбумины	6,0 ± 2,45	47,8	4,8 ± 1,90	46,3
Альфа-глобулины	2,8 ± 0,88	22,1	1,5 ± 0,21	14,5
Бета-глобулины	3,8 ± 1,08	30,1	2,6 ± 0,50	25,0
Гамма-глобулины	0	0	1,5 ± 0,23	14,2
Всего	12,6 ± 2,82	100	10,4 ± 1,99	100
Гаметы, мг/млрд				
Альбумины	11,8 ± 0,47	54,3	2,1 ± 0,91*	9,6
Альфа-глобулины	2,7 ± 1,53	12,4	1,2 ± 0,12	5,5
Бета-глобулины	1,9 ± 1,85	9,0	0,6 ± 0,08	2,8
Гамма-глобулины	5,3 ± 0,70	24,3	17,9 ± 1,08*	82,1
Всего	21,7 ± 1,72	100	21,8 ± 1,42	100
Итого, плазма+гаметы	34,3 ± 3,30		32,2 ± 2,44	

Примечание: *Различия достоверны по сравнению с цельным семенем.

Из данных таблиц 1 и 2 следует, что белковый спектр семени быка и петуха резко отличается. Если в плазме семени быка преобладают альфа-глобулины ($18,2 \pm 1,84$), а в гаметех – гамма-глобулины ($16,8 \pm 3,27$ мг/млрд), то в семени петуха, как в плазме, так и в гаметех, больше всего альбуминов ($6,0 \pm 2,45$ и, соответственно, $11,8 \pm 0,47$ мг/млрд). Отличительной особенностью белкового спектра является и то, что в гаметех петуха содержится намного меньше глобулинов, чем в гаметех быка (у петуха общее содержание альфа, бета и гамма-глобулинов составило $9,9 \pm 1,89$, а у быка - $30,2 \pm 5,32$ мг/млрд).

Изменения белкового спектра при криоконсервации носят специфический для каждого вида характер. И только количество альфа- и бета-глобулинов в гаметех быка и петуха при оттаивании одинаково уменьшается.

Процесс криоконсервации семени петуха, в отличие от такового быка, вызывает снижение количества альбуминов. Это может быть объяснено денатурацией белков, а именно – альбуминов.

Появление фракции гамма-глобулинов в оттаянной плазме семени петуха, резкое снижение содержания альбуминов в оттаянной плазме семени петуха, резкое снижение содержания альбуминов в гаметех позволяет отметить, что низкие температуры могут инициировать транслокацию, агрегацию и дезагрегацию белков. Конкретным проявлением этих нарушений может быть снижение вязкости фосфолипидного бислоя, что приводит к нарушению барьерных свойств плазматических мембран в цикле криоконсервации.

Проведенными исследованиями не были обнаружены криогенные изменения общего количества белков плазмы и сперматозоидов. Это свидетельствует о том, что как латеральные, так и трансмембранные белки (рис.7) обладают высокой криоустойчивостью по сравнению с липидами, независимо от их локализации в биологических мембранах (рис.8).

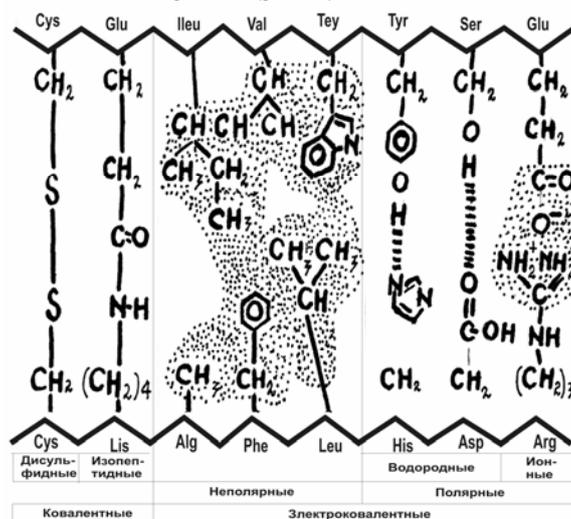


Рис.7. Типы связей и взаимодействий в белках (Леви, 1971).

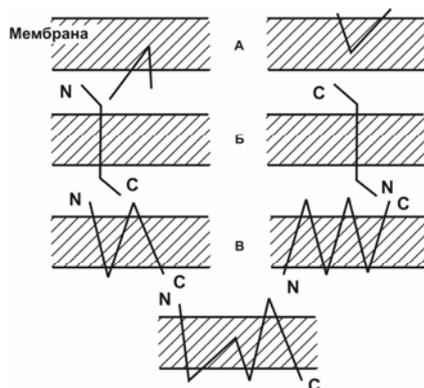


Рис.8. Локализация белков в биологических мембранах.

А – латеральная, Б,В – трансмембранная; А – монотопическая, Б – битопическая, В – политопическая. Указана локализация N- и C-концов.

Таким образом, хотя общее содержание белка семени животных при криоконсервации не изменяется (см. табл. 1-2), его белковый спектр претерпевает достаточно выраженные модификации. В процессе криоконсервации семени в его плазме изменения содержания альфа-, бета- и гамма-глобулинов специфичны для каждого вида животных, в то время как в гаметях динамика альфа-, бета- и гамма-глобулинов носит неспецифический характер [17].

При температурах ниже физиологических пределов возможны структурно-фазовые переходы как внутри биомакромолекул, так и в молекулярных ансамблях. Проведенные исследования на большом количестве белков искусственных и биологических мембран показали, что все переходы, наблюдаемые при температурах выше перехода воды в лед, носят обратимый характер. Переходы, наблюдаемые при более низких температурах, обычно носят необратимый характер [20]. Следовательно, при разработке новых приемов криозащиты биологических объектов необходимо стимулировать обратимые переходы и ограничивать необратимые переходы.

Литература:

1. Adabi S.G. et al. L.carnitine effects on quantity and quality of African black neck ostrich sperm // Journal of Veterinary and Animal Advance, 2008, vol.7, p.51-55.
2. Tamburrino Lara et al. Mechanisms and clinical correlates of sperm DNA damage // Asian Journal of Andrology, 2012, vol.14, p.24-31.
3. Борончук Г.В., Балан И.В. Структурно-функциональные и биохимические изменения в биологических системах при криоконсервации. - Ch.: Tipografia AȘM, 2008. - 633 с.
4. Levis Sheena E.M. Is sperm evaluation useful in predicting human fertility? // Reproduction, 2007, vol.134, no.1, p.31-40.
5. Yamaguchi S. et al. Zinc is an essential trace element for spermatogenesis // Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, vol.106, no.26, p.10859-10864.
6. Линник Т.П. и др. Взаимодействие криопротекторов с липосомами из суммарных липидов спермиев петуха // Проблемы криобиологии, 2010, том 20, № 1, с.34-46.
7. Turner R. M. Moving to the beat: A review of mammalian sperm motility regulation // Reprod Fert Develop., 2006, vol.18, p.25-38.
8. Сынчикова О.П. и др. Динамический анализ морфологических изменений эритроцитов в процессе гипертонического гемолиза // Проблемы криобиологии, 2002, №2, с.62-63.
9. Perdicchi A. et al. Effects of tumour necrosis factor-alpha on human sperm motility and apoptosis. // J Clin Immunol., 2007, vol.27, p.152-162.
10. Leduc F. et al. DNA damage response during chromatin remodeling in elongating spermatids of mice. // Biol Reprod., 2008, vol.78, p.324-32.
11. Фурдуй Ф.И. Физиологические механизмы стресса и адаптации при остром действии стресс-факторов. - Кишинев: Штиинца, 1986. - 240 с.
12. Ciochină V., Furdui V. Dezvoltarea fiziologiei și sanocreatologiei. Rezultate și perspective // Buletinul Academiei de Științe a Moldovei, 2006, nr.1, p.12-18.
13. Фурдуй Ф.И. Проблемы стресса и преждевременной биологической деградации человека. Санокреатология. Современные проблемы физиологии и санокреатологии. Их настоящее и будущее. - Ch.: Tipografia AȘM, 2005, p.16-35.
14. Фурдуй Ф.И., Чокинэ В.К., Фурдуй В.Ф. Понятие здоровье – отправная точка санокреатологии: стресс, адаптация, функциональные нарушения и санокреатология. - Кишинев: Картя Молдовеняскэ, 1999, с.44-51.
15. Юрченко Т.Н. Охлаждение и адаптационные процессы в плотных тканях. // Достижения и перспективы развития криобиологии и криомедицины: Тезисы Междунар. конф. - Харьков, 1988, с.96-97.
16. Наук В.А. Структура и функция спермиев сельскохозяйственных животных при криоконсервации. - Кишинев: Штиинца, 1991. - 200 с.
17. Борончук Г.В., Балан И.В. Криомембранология. - Ch.: Tipografia AȘM, 2003. - 336 с.
18. Гулевский А.К. и др. Барьерные свойства биомембран при низких температурах. - Киев: Наукова думка, 1988. - 208 с.
19. Белоус А.М., Бондаренко В.А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. - Киев: Наукова думка, 1982. - 256 с.
20. Мойсеев В.А. Молекулярные механизмы криповреждения и криозащиты белков и биологических мембран: Автореф. дисс. ... докт. биол. наук. - Харьков, 1984. - 48 с.
21. Новиков А.Н., Пичугин Н.И., Линник Т.П. Влияние криопротекторов и ряда органических добавок на процесс рекристаллизации льда в модельных системах // Проблемы криобиологии, 1992, №2, с.20-21.

22. Катков И.И. Связь между состоянием мембранного аппарата спермиев и их физиологическими показателями после замораживания: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. - Харьков, 1985. - 24 с.
23. Zamfirescu S., Anghel A., Researches regarding the ultrastructural modifications of sperm cells before and after freezing in different media: *Lucrări științifice. Seria Zootehnie*, 2010, vol.53, nr.15, p.67-74.
24. Ortman K., Rodriquez-Martinez H. Membrane damage during dilution, cooling and freezing-thawing of boar spermatozoa packed in plastic bags. // *J. Vet. Med. A.*, 1994, vol.41, no.1, p.37-47.
25. Малиновская В.А. Оптимальные режимы замораживания спермы быков в соломинках // *Современные методы воспроизводства и искусственного осеменения с-х животных*. - М., 1983, с.100-108.
26. Цымбал Л.В. и др. Исследование вода-белок-липидных взаимодействий в эритроцитах пойкилотермного организма // *Проблемы криобиологии*, 1995, №1, с.10-13.
27. Жуковский А.П. и др. Термолабильность структуры белков в нативном состоянии и механизм ее поддержания // *Биофизика*, 1987, том 32, №40, с.583-587.
28. Хобза П., Заградник Р. Межмолекулярные комплексы. - Москва: Мир, 1989. - 375 с.
29. Сторожок С.А. и др. Зависимость стабильности деформальности мембран от межмолекулярных взаимодействий белков цитоскелета // *Научный вестник Тюменского государственного университета*, 2000, том 3, с.35-41.
30. Нардид О.А. и др. Влияние криопротекторов на белок-липидные взаимодействия в мембранах эритроцитов // *Физико-химические процессы в криобиологических системах*. - Харьков, 1991, с.102-106.
31. Александров В.Я. Клетки макромолекулы и температура. - Л.: Наука, 1975. - 330 с.
32. Ленинджер А. Основы биохимии. - Москва: Мир, 1985. Том 1. - 365 с.
33. Shiba K. et al. Ca^{2+} bursts occur around a local minimal concentration of attractant and trigger sperm chemotactic response. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, vol.105, p.19312-19317.
34. Strünker T. et al. The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca^{2+} influx in human sperm. // *Nature*, 2011, vol.471, p.382-386.
35. Lishko P. V. et al. Progesterone activates the principal Ca^{2+} channel of human sperm. // *Nature*, 2011, vol.471, p.387-391.
36. Leo A. et al. Partition Coefficients and Their uses. // *Chemical Reviews*, 1971, vol.71, no.6, p.116-525.
37. Шерман С.А. и др. Конформационный анализ и установление пространственной структуры белковых молекул. - Минск: Наука и техника, 1989. - 239 с.
38. Попов Е.М. Подход к решению проблемы структурно-функциональной организации природных пептидов // *Мол. биол.*, 1985, том 19, вып.4, с.1107-1137.
39. Мартин Р. Введение в биофизическую химию. - М.: Мир, 1986. - 431 с.
40. Хаггис Д. и др. Введение в молекулярную биологию. - Москва: Мир, 1967. - 436 с.
41. Stevanovic J. et al. Some quantitative and qualitative characteristics of serum lipoproteins in bovine seminal plasma // *Acta. Vet.*, 1997, vol. 47, no.4, p.187-193.
42. Graham L.A. et al. Hyperactive antifreeze protein from fish contains multiple ice-binding sites. // *Biochemistry*, 2008, vol.47, no.7, p.2051-2063.
43. Боровягин В.А. Об интерпретации данных методов электронной микроскопии в изучении структурной организации модельных и биологических мембран // *Биофизика. Итоги науки и техники. ВИНТИ*. - М., 1975, том 4, с.226-307.

Prezentat la 15.06.2012

APRECIEREA STĂRII FIZICE A SPORTIVILOR ÎNOTĂTORI (BĂIEȚI ȘI FETE) ÎN BAZA UNOR PARAMETRI FIZIOLOGO-BIOCHIMICI

Inga DELEU

Catedra Fiziologie Umană și Animală

The given article is intended for the studies of physical state of high qualification swimmers (boys and girls) according to some physiologic and biochemical anthropometric parameters in pauses and after some physical efforts. The results of the performed investigations revealed the essential differences both after the anthropometric, physiologic indices and biochemical ones between boys and girls swimmers. The analyses of the obtained results allowed us to draw a conclusion that all parameters of boys – swimmers and girls – swimmers.

Introducere

Înotul poate fi considerat un sport de masă prin influența mare asupra ameliorării sănătății și poate fi practicat la orice vârstă, începând cu primele luni ale vieții și până la bătrânețe, datorită ușurinței cu care se poate grada efortul. Grație numeroaselor modificări pe care le produce în organism și condițiilor igienice în care se practică, înotul reprezintă unul dintre cele mai complete sporturi, favorizând dezvoltarea calităților de rezistență, viteză, îndemânare.

Sportul, în general, și înotul, în particular, prezintă mai multe efecte:

- prin înot se dezvoltă trăsături pozitive de caracter, precum: hotărârea, curajul, perseverența, răbdarea, dorința de a învinge dificultățile;
- latura educațională se dezvoltă în climatul sportivității, al eticii vieții sportive (obișnuirea cu ordinea și disciplina, cu respectul și ajutorul reciproc, se repercutează pozitiv pe plan educativ);
- înotul trebuie studiat ca fenomen social. El poate fi o componentă a timpului liber, care trebuie valorificat la maximum, bine organizat și create condiții pentru dezvoltarea înotului în viața modernă [1].

Influența înotului asupra inimii și a circulației sanguine

Înotul este o activitate de rezistență, care se dobândește prin repetare, prin „arta de a respira în apă”, principalul beneficiar fiind sistemul cardiovascular. Înotul influențează asupra activității aparatului cardiovascular prin accelerarea contracțiilor cardiace, creșterea tensiunii arteriale și a presiunii venoase, precum și prin mărirea volumului cardiac.

Această influență, cumulată cu efectul mișcărilor executate în timpul înotului, duce la dezvoltarea musculaturii inimii, respectiv a auriculelor și a ventriculelor. Fortificarea mușchiului cardiac influențează favorabil activitatea inimii și circulația în general. În repaos, presiunea sistolică scade, iar cea diastolică crește, adică se îmbunătățește tensiunea arterială diferențiată și se mărește elasticitatea vaselor. Sub influența înotului au loc modificări în compoziția morfologică și chimică a sângelui.

Influența înotului asupra respirației

Antrenamentul la înot dezvoltă toate funcțiile fundamentale ale organismului, dar are o influență majoră asupra aparatului respirator. Din acest punct de vedere, înotul poate fi considerat unul dintre cele mai eficiente exerciții respiratorii. El poate fi recomandat, în scopul dezvoltării aparatului respirator, tuturor sportivilor, indiferent de specialitatea lor sportivă, deoarece dezvoltă, în special, mușchii respiratori și musculatura spatelui, având influență asupra respirației și asupra corectitudinii ținutei.

Solicitarea crescută a tuturor grupelor musculare prin efectuarea mișcărilor de înot, împreună cu intensificarea respirației, precum și presiunea exercitată de apă asupra corpului, duc la o dezvoltare substanțială a mușchilor respiratori, mărind capacitatea respiratorie și ventilația pulmonară, realizându-se o apnee voluntară și o dilatație toracică [2].

Poziția orizontală favorizează mișcările de inspirație, iar pentru expirație este solicitată diafragma și musculatura abdominală, care înving presiunea apei. Înotul contribuie la dezvoltarea cutiei toracice, dezvoltare care asigură o capacitate vitală mare în comparație cu alte discipline sportive. Astfel, prin înot se realizează o îmbunătățire substanțială a ritmului respirator.

Începătorului i se pun probleme noi, printre care aceea de a-și putea păstra echilibrul corpului în poziția de înot, în condițiile executării mișcărilor pentru înaintare, coordonarea mișcării membrilor executate în același scop și coordonarea acestor mișcări cu mișcările respiratorii. În ceea ce privește simțul echilibrului și al poziției corpului, un rol important îl are analizatorul vestibular.

Influența înotului asupra atitudinii corpului

Privit din punctul de vedere al adaptării funcționale, faptul că înotul se desfășoară în poziție orizontală (folosită un timp îndelungat, pe parcursul activității sportive) poate produce modificări semnificative asupra sistemului osteoarticular: articulațiile fiind eliberate de greutatea corpului, lucrează lejer, astfel explicându-se creșterile în înălțime, atât de căutate prin practicarea înotului.

Aparatul locomotor se dezvoltă printr-o creștere proporțională a indicilor dezvoltării fizice. Prin înot se favorizează poziția corectă pe apă a capului și a corpului care, asociat cu caracterul simetric și ciclic al mișcărilor, duce la obținerea unei atitudini corecte a corpului.

Eliberarea coloanei vertebrale de greutatea corpului, asociată cu activitatea intensificată a mușchilor respiratori, exercită o influență profilactică și terapeutică în combaterea deformațiilor coloanei vertebrale. Mișcările de înot, procedeele tehnice specifice măresc considerabil mobilitatea coloanei, întărind totodată întreaga musculatură a trunchiului.

Practicând înotul se modifică și forța musculară. Fiind lipsite de încordări mari, mișcările contribuie la dezvoltarea fusiformă a musculaturii. Este poate unicul sport la care toate grupele musculare se folosesc proporțional [3,4].

Înotul contribuie la dezvoltarea și la menținerea proceselor vitale, iar corpul capătă o dezvoltare armonioasă prin antrenarea în înot a întregului sistem muscular. Umerii se lărgesc, toracele cuprinde plămâni bine dezvoltate, mușchii sunt adaptabili în orice fel de activitate, sunt lungi și proporționali, oferind un bun randament în muncă.

În medicina sportivă modernă o atenție deosebită se atrage testării stării fizice a sportivilor-înotători. În timpul determinării stării fizice a sportivilor, este importantă efectuarea corectă a testărilor. De obicei, printre multiplele metode existente (alergarea la tredbang, step test ș.a), se aplică și cele de veloergometru și, de asemenea, diferite cercetări de laborator.

Cu toate acestea, în rezultatul analizei literaturii de specialitate s-a constatat că nu există vreun indice care ar reflecta starea fizică în întreaga gamă a eforturilor individuale disponibile. Aceasta este legat de faptul că în diferite zone ale intensității funcționează și diferite mecanisme energetice [5,6].

Până în prezent nu există o părere unitară referitor la un sistem rațional de cercetare, observare și monitorizare a eficienței exercițiului fizic. Aceasta a stat la baza cercetărilor efectuate.

Controlul asupra eficienței procesului de antrenament a fost efectuat luându-se în considerație întreaga gamă de cercetări, printre care au fost aplicate metodele antropometrice, fiziologice și biochimice (nivelul glucozei și al acidului lactic în sânge) în repaos și după efort pe veloergometru.

Scopul acestei lucrări a fost testarea sportivilor-înotători de înaltă calificare (băieți și fete) după unii parametri antropometrici, fiziologici și biochimici (nivelul glucozei și al acidului lactic în sânge) în repaos și după efort pe veloergometru.

În procesul de colectare și prelucrare a materialelor au fost analizate datele despre anamneza sportivă și parametrii de bază ai sportivilor-înotători, precum și dinamica lor pe parcursul anilor de antrenament.

Măsurările antropometrice au fost realizate până la și după efort fizic. Metoda dată a fost aplicată pentru evaluarea nivelului de dezvoltare fizică și pentru specificarea morfotipului înotătorilor. Programa de cercetare includea: indicele masei corporale (greutatea), înălțimea, volumul cutiei toracice, forța musculară a mâinii stângi și a celei drepte, perimetrul cutiei toracice, excursia.

În timpul analizei rezultatelor de cercetare s-au luat în considerație parametrii statistici. Compararea parametrilor înotătorilor (băieți și fete) a fost efectuată după criteriul T – Student.

La cercetările efectuate au participat 12 sportivi – 6 băieți și 6 fete. Nivelul calificării sportive a înotătorilor cercetați variază de la categoria a III-a până la maestru în sport.

Metode de cercetare: Pentru testarea sportivilor-înotători au fost folosite metodele antropometrice, fiziologice, biochimice, statistico-matematice.

Rezultate și discuții

Analiza rezultatelor experimentale ale cercetărilor antropometrice ne-a permis să ajungem la următoarea concluzie: după parametrii cercetați, înotătorii-băieți predomină asupra fetelor-înotătoare.

Astfel, băieții-înotători sunt caracterizați printr-o înălțime și perimetrul cutiei toracice mai mari, respectiv cu 8% și 10% în comparație cu parametrii fetelor-înotătoare, ceea ce confirmă o dezvoltare fizică mai bună a băieților-înotători. De asemenea, și volumul cutiei toracice, forța musculară a mâinilor (stângă și dreaptă), excursia și alți parametri prezintă la ei valori mai înalte decât parametrii fetelor-înotătoare. Așadar, potrivit cercetărilor efectuate, volumul cutiei toracice la băieții-înotători indică o valoare medie de 97,33 cm, în comparație cu același indice la fetele-înotătoare, a cărui valoare este de 88,17 cm. O diferență mare s-a determinat și la măsurarea forței musculare a mâinii stângi și a celei drepte la băieții-înotători și fetele-înotătoare, respectiv cu 44% și 40%.

Tabel**Indicii antropometrici, fiziologici și biochimici la sportivii-înotători**

Numele, prenumele	Înălțimea (cm)	Volumul cutiei toracice	Excursia (cm)	Forța musculară a mâinii drepte	Forța musculară a mâinii stângi	Nivelul glucozei în repaos și după efort (mmol/l)	Nivelul acidului lactic în repaos și după efort fizic (mmol/l)
Parametrii băieților-înotători							
1.G.,A., msmc	191	93	14	52	50	4,6 / 6,2	4,8 / 4,0
2.P.,T., m/s	183	103	10	60	51	5,7/5,9	4,6/4,2
3.A.,D., m/s	178	101	9	60	51	7,1/5,6	9,6/6,9
4.B.,D., 1 categ.	183	97	11	42	42	8,5/3,5	11,7/5,4
5.V.,D., s m/s	178	95	8	42	38	7,3/7,0	6,4/5,0
6.G.,D., s m/s	188	95	12	58	50	7,7/5,9	8,7/13,7
M ± m	183,5±2,13	97,33±1,58	10,67±0,87	52,33±3,47	47,0±2,27	4,8±0,88/ 3,6±0,87	7,6±1,16/ 6,5±1,49
Parametrii fetelor-înotătoare							
1.D., A., m/s	164	80	10	28	26	5,9/5,0	5,9/5,0
2.B., E., m/s	167	87	6,5	33	28	5,2/4,7	5,2/4,7
3.S.,A., m/s	170	90	4	25	24	5,4/5,0	5,4/5,0
4.M.,O., m/s	172	91	9	29	29	5,8/4,9	5,8/4,9
5.S., I., s m/s	174	88	7	35	35	4,2/3,6	4,2/3,9
6.M.,A., s m/s	170	93	7	28	28	5,3/4,4	5,3/4,4
M±m	169,5±1,45	88,17±1,85	7,25±0,85	29,67±1,5	28,33±0,91	5,3±0,25/ 4,6±0,22	5,3±0,24/ 4,65±0,18

Controlul asupra nivelului stării fizice a sportivilor-înotători s-a efectuat luându-se în considerație și parametrii fiziologo-biochimici. Printre acești parametri o mare importanță practică are cercetarea nivelului de glucoză și a cantității acidului lactic în sânge. Este cunoscut că glucoza în sânge se menține la un nivel constant datorită mecanismelor reglatorii în limitele de la 3,3 mmol/l până la 5,3 mmol/l (80–120 mg). Modificarea conținutului de glucoză în sânge în timpul efortului muscular este individuală și depinde de nivelul de antrenament al organismului, de puterea și durata efortului fizic. Efortul fizic submaximal de scurtă durată provoacă mărirea conținutului de glucoză în sânge, deoarece are loc mobilizarea intensă a glicogenului din ficat.

Activitatea fizică de lungă durată provoacă reducerea conținutului de glucoză în sânge. La persoanele neantrenate acest proces este mai evident decât la cele antrenate.

Conținutul crescut de glucoză în sânge indică la procesul de dezintegrare a glicogenului în ficat sau la folosirea relativ mică a glucozei de către țesuturi. Conținutul mic de glucoză în sânge indică faptul că rezervele de glicogen în ficat au fost epuizate sau că au fost folosite intens de către țesuturile organismului.

După modificarea cantității de glucoză în sânge se determină, de asemenea, și viteza oxidării aerobe în țesuturile organismului în timpul efortului fizic și mobilizarea intensă a glicogenului în ficat. Acest indice (schimbarea cantității de glucoză) rar se utilizează de unul singur în diagnosticarea sportivilor, deoarece nivelul

de glucoză în sânge depinde nu doar de acțiunea exercițiului fizic asupra organismului, dar și de starea psiho-emoțională a organismului, de mecanismele de reglare umorală, alimentație și de alți factori.

În timpul cercetărilor efectuate nivelul de glucoză în sânge la băieții-înotători (în repaos) este egală cu 4,8 mmol/l, iar la fetele-înotătoare este de 5,3 mmol/l (Fig.1).

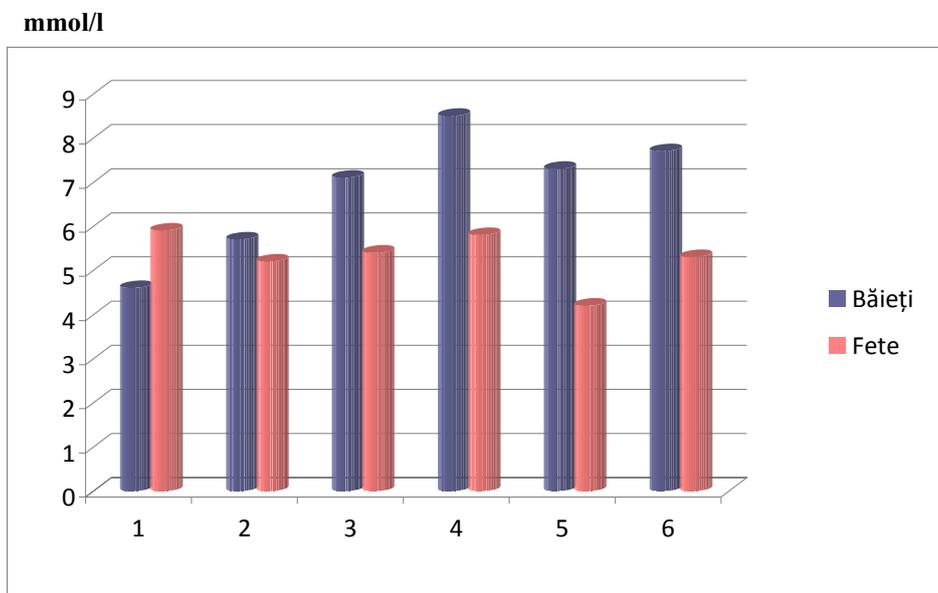


Fig.1. Nivelul glucozei la sportivii-înotători în repaos (mmol/l).

După efort fizic la veloergometru timp de 20 minute (175-200 watt), nivelul de glucoză la băieții-înotători a scăzut până la 3,6 mmol/l, iar la fetele-înotătoare până la 4,6 mmol/l (Fig.2).

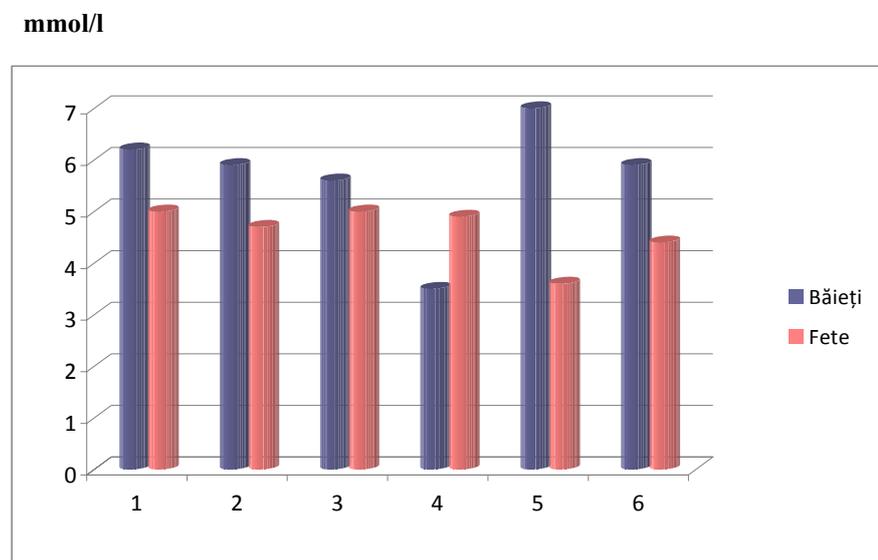


Fig.2. Nivelul glucozei la sportivii-înotători după efort (mmol/l).

Este cunoscut faptul că mecanismul de resinteză glicolitică a ATF-ului în mușchii scheletici se finisează cu formarea acidului lactic, care ulterior ajunge în sânge. Trecerea acidului lactic în sânge, după finisarea efortului fizic, decurge lent, ajungând la maximum în minutul 3-7 – după finisarea exercițiului fizic.

Conținutul acidului lactic în sânge (în normă) în stare de repaos este egal cu 1,0-1,5 mmol/l (15-30 mg%), iar în timpul efortului muscular intens el se mărește semnificativ (Fig.3,4). În acest timp acumularea acidului lactic coincide cu formarea lui intensă în mușchi în timpul efortului muscular și poate ajunge la nivelul de 30 mmol/kg din masa corporală. Scăderea nivelului acidului lactic la unul și același sportiv în timpul efortului

muscular la diferite etape de antrenament sugerează despre un nivel înalt de antrenament, iar creșterea nivelului lui – despre scăderea nivelului de antrenament.

Astfel, modificarea concentrației de acid lactic în sânge după efectuarea efortului fizic este legată de nivelul de antrenament al sportivului. După modificarea conținutului de acid lactic în sânge putem determina posibilitățile anaerobe de glicoliză a organismului, ceea ce este foarte important în procesul de selectare a sportivilor, de dezvoltare a abilităților motrice, de control și monitorizare a procesului de antrenament.

În timpul cercetărilor efectuate pentru determinarea cantității acidului lactic în sânge, la băieții-înotători s-au constatat 7,6 mmol/l (până la efort), în timp ce la fetele-înotătoare – 5,3 mmol/l.

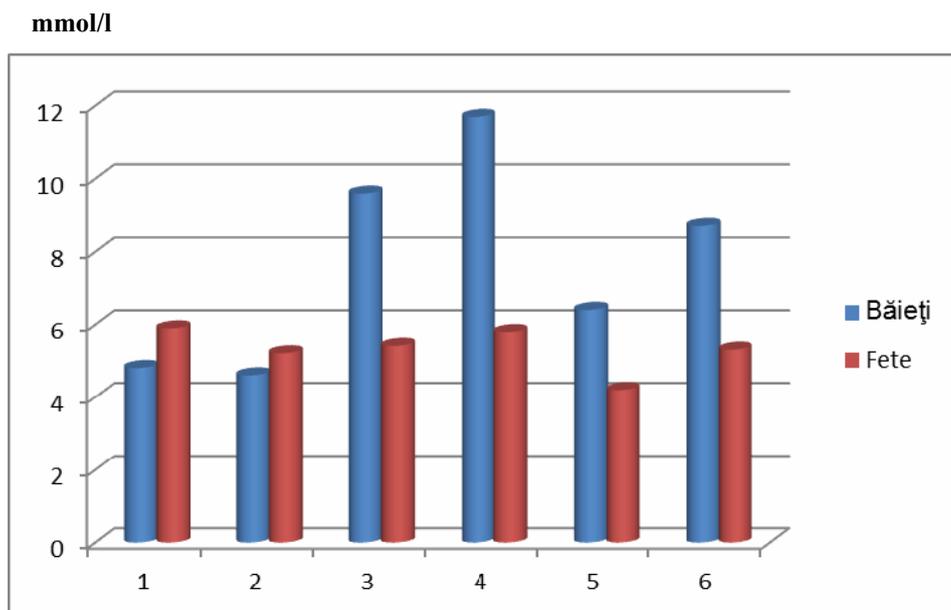


Fig.3. Nivelul acidului lactic la sportivii-înotători în repaos (mmol/l).

După efort fizic la veloergometru, nivelul acidului lactic în sânge la băieții-înotători a scăzut cu 15%, iar la fetele-înotătoare – cu 13%.

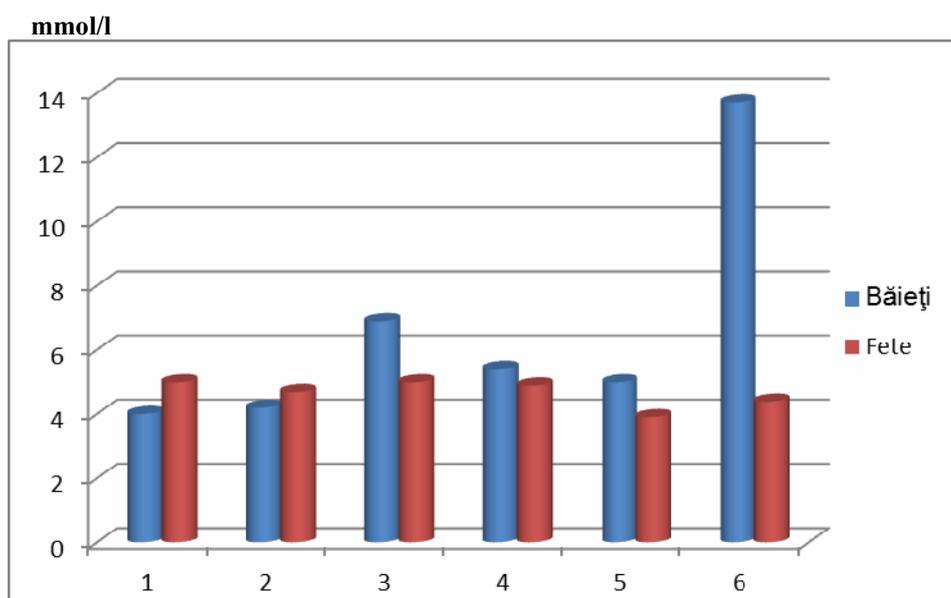


Fig.4. Nivelul acidului lactic la sportivii-înotători după efort (mmol/l).

Deci, după efortul fizic, nivelul acidului lactic s-a micșorat nesemnificativ, atât la băieți cât și la fete, ceea ce denotă o refacere durabilă a sportivilor. După valoarea acestor indici se poate judeca în ce măsură sportivul a folosit posibilitățile sale, cât de departe este el de valorile critice și, deci, la etapa dată de antrenament poate

să prezinte cel mai bun rezultat. Dinamica parametrilor biochimici reflectă, de asemenea, și toate perioadele de refacere a posibilităților funcționale ale organismului.

Concluzie

Rezultatele cercetărilor efectuate au constatat deosebiri esențiale, atât după indicii antropometrici, cât și după cei fiziologici și biochimici între băieții-înotători și fetele-înotătoare. Băieții-înotători depășesc fetele-înotătoare după nivelul dezvoltării fizice, ceea ce și determină rezultate sportive mai avansate decât la fetele-înotătoare.

Referințe:

1. Olaru M. Înot. - București: Sport și Turism, 1982, p.205-207.
2. Vasile L. Înot pentru sănătate. - București: Editura Didactică și Pedagogică, 2007, p.112-117.
3. Горчакова Н.А. и др. Фармакология спорта / Под общей ред. Олейника С.А. и др. - Кишинэу: Олимпийская литература, 2010, с.557-560.
4. Коваленко В.А. Физическая культура. - Москва: Медицина, 2000, с.342-348.
5. Лях В.И. Концепция физического воспитания и оздоровления детей и подростков.- Москва: Физическая культура: воспитание, образование, тренировка, 1996, с.5-10.
6. Мартиросов Э.Г. Методы исследования в спортивной антропологии.- Москва: Физическая культура: воспитание, образование, тренировка, 1982.

Prezentat la 25.01.2012

STAREA FUNCȚIONALĂ A GLANDEI TIROIDE LA ACȚIUNEA STRESULUI COMBINAT (HIPOKINEZIA ȘI INANIȚIA COMPLETĂ)

Liuba PERCIUN

Catedra Biologie Umană și Animală

The work of many researchers has shown that hypokinesia leads to a sequence of disturbances immortal for body functions, including disturbances the cardiovascular system tops.

Hypokinesia, whichever is leading to increased incidence of atherosclerosis, coronary disease, thromboembolism. Hypokinesia is a powerful stimulant to all organs and organ systems in the human body and animals. Its consequences are observed at all stages of operation of the body. Changes observed during the early essential, then other periods - an adaptation.

Prolonged hypokinesia leads to exhaustion hypothalamic system - the pituitary adrenal cortical layer.

For the achievement of the purpose were set the next tasks: the research balance of thyroid hormones (T_3 and T_4) and thyriotropine (TTH) in the plasma of blood of laboratory rats, subjected to action of hyperkinesias of different duration, the determination of level of T_3 and T_4 in the plasma of blood of rats which were in full hunger list, the determination of the concentration of thyroid hormones in the plasma of blood of rats subjected to action of hyperkinesias based on full hunger list of different duration.

Introducere

La etapa actuală există un șir de boli patologice (atacul cerebral, infarctul), care duc la micșorarea activității musculare, ceea ce nu este altceva decât hipokinezia și inaniția completă de diferită durată.

Orice acțiune legată de implicarea omului, dependentă sau independentă de el, duce la dereglarea homeostaziei și, ca rezultat, se răsfrânge asupra întregului organism. Hipokinezia organismului, precum și inaniția completă, duc la modificări ale procesului de schimb, inclusiv ale metabolismului apei și al electroliților, în rezultatul căruia pe fundalul scăderii masei organismului se dezvoltă atrofia spontană a musculaturii, se schimbă bilanțul hormonilor, apar dereglări în circulația sangvină.

Studierea acțiunii hipokineziei asupra organismului, a neactivității musculare în combinație cu inaniția completă pot clarifica patogeneza, etiologia unor dereglări, contribuind la perfecționarea metodelor de tratare.

Există date privitor la acțiunea inaniției complete asupra organismului. De asemenea, există date științifice contradictorii privitor la acțiunea hipokineziei asupra organismului.

Însă, un interes deosebit prezintă acțiunea hipokineziei în combinație cu inaniția completă asupra organismului.

Din cele expuse rezultă că cercetările efectuate în acest domeniu sunt actuale și de o importanță majoră.

Reieșind din importanța problemei, **scopul cercetărilor** a fost de a:

1) examina influența inaniției complete de diferită durată asupra nivelului de hormoni iodați și a tireotropinei adenohipofizare la șobolanii de laborator.

2) studia acțiunea hipokineziei pe fondalul inaniției complete de diferită durată asupra nivelului de hormoni tiroidieni și a tireotropinei adenohipofizare în plasma sangvină la șobolanii de laborator.

Material și metode

Pentru studierea bilanțului de hormoni iodați ai glandei tiroide și a hormonului tireotrop adenohipofizar la acțiunea stresului combinat de diferită durată (hipokinezia și inaniția completă) a fost nevoie de alegerea obiectului biologic, care are o dezvoltare înaltă a sensibilității și termoreglării la schimbarea factorilor mediului extern.

Așa obiect biologic reprezintă șobolanul alb. Masa generală a șobolanilor folosiți în experiență constituie 200-230 gr.

Animalele de laborator au fost grupate în trei loturi (Tab.1):

lotul I – martor, șobolanii se aflau în condiții obișnuite de vivariu, fără limitarea mișcărilor și hranei;

lotul II – șobolanii au fost supuși inaniției complete, timp de 1,2,3 zile;

lotul III – șobolanii au fost supuși acțiunii hipokineziei pe fondalul inaniției complete, timp de 1,2,3 zile.

Hipokinezia s-a creat prin imobilizarea șobolanilor de laborator în cuști speciale. Construcția cuștilor-penal făcea posibilă îngrijirea sistematică a șobolanilor (curățirea cuștilor de urină și mase fecale, asigurarea șobolanilor cu apă).

La începutul cercetărilor șobolanii erau cântăriți și rectal li se măsura temperatura corpului.

În cazul inaniției complete șobolanii au fost lipsiți de hrană, iar apa o primeau în cantități nelimitate. După expirarea termenului de experiență s-au colectat probele de sânge pentru cercetarea hormonilor iodați ai glandei tiroide și a hormonului tireotrop al adenohipofizei.

La toți șobolanii experimentali a fost cercetat bilanțul de hormoni ai glandei tiroide prin metoda imuno-fermentativă.

Tabelul 1

Caracteristica materialului experimental

Nr. lotului	Numărul de șobolani	Loturile experimentale	Durata experienței (zile)
1	5	Martor	1,2,3
2	15	Inaniție completă	1,2,3
3	15	Hipokinezie + inaniție completă	1,2,3

Rezultate și discuții

Concentrația hormonilor tiroidieni și a tireotropinei adenohipofizare în plasma sangvină la șobolanii martori

În lotul animalelor-martori au fost examinați șobolanii care se aflau în condiții obișnuite de vivariu.

Rezultatele obținute în acest lot sunt expuse în Tabelul 2 și în Figura 1. Analizând concentrația hormonilor tiroidieni și a tireotropinei adenohipofizare în plasma sangvină la șobolanii-martori, observăm că nivelul de T_4 , T_3 și TTH corespunde datelor din literatura științifică [1].

Tabelul 2

Conținutul hormonilor tiroidieni (T_3 și T_4 , nmol/l) și a tireotropinei (TTH, nmol/l) la șobolanii-martor

Nr. crt.	T_3 (triiodtironina) (nmol/l)	T_4 (tiroxina) (nmol/l)	TTH (tireotropina) (nmol/l)
1	0,139	7,332	1,031
2	0,129	6,871	0,930
3	0,178	9,038	0,890
4	0,163	8,083	1,442
5	0,143	7,648	1,786
M ± m	0,15 ± 0,01	7,79 ± 0,36	1,22 ± 0,04

Acțiunea inaniției complete asupra nivelului de tireotropină adenohipofizară (TTH) și a hormonilor iodați ai glandei tiroide (T_3 , T_4) la șobolanii de laborator

În lotul II, experimental, s-a cercetat acțiunea inaniției complete asupra stării funcționale a sistemului hipofizo-tiroidian, în baza cercetării nivelului de hormoni iodați ai glandei tiroide și a tireotropinei adenohipofizare, timp de 1,2,3 zile. Rezultatele obținute în acest lot de experiență sunt cuprinse în Tabelul 3 și în Figura 1.

Tabelul 3

Concentrația hormonilor tiroidieni (T_3 , T_4 , nmol/l) și a tireotropinei adenohipofizare (TTH, nmol/l) în plasma sanguină la șobolanii albi de laborator supuși acțiunii inaniției complete de diferită durată

Nr. crt.	1 zi			2 zile			3 zile		
	T_3	T_4	TTH	T_3	T_4	TTH	T_3	T_4	TTH
M ± m	0,18 ± 0,01	10,34 ± 0,54	2,03 ± 0,03	0,25 ± 0,03	11,76 ± 0,20	2,45 ± 0,1	0,30 ± 0,04	13,04 ± 0,1	2,89 ± 0,04
P	<0,1	>0,01	<0,1	<0,05	<0,05	<0,01	<0,05	<0,05	<0,05
Martor M ± m	0,15 ± 0,01	7,79 ± 0,36	1,22 ± 0,04	0,15 ± 0,01	7,79 ± 0,36	1,22 ± 0,04	0,15 ± 0,01	7,79 ± 0,36	1,22 ± 0,04

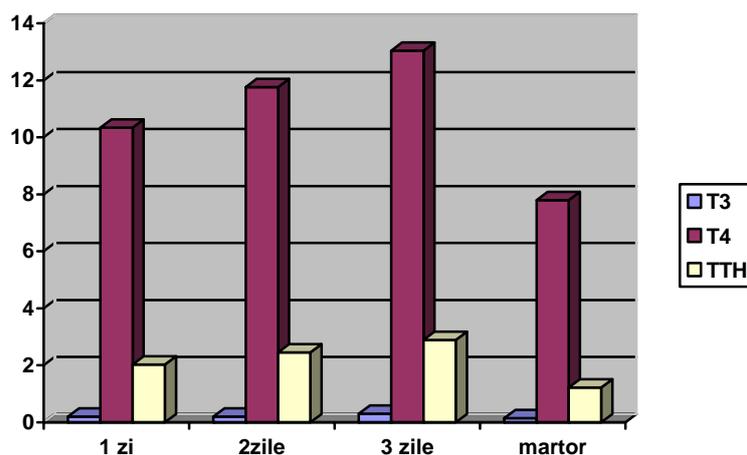


Fig.1. Nivelul de hormoni tiroidieni (T_3 , T_4 , nmol/l) și de tireotropină (TTH, nmol/l) la șobolanii de laborator supuși acțiunii inaniției complete.

După cum reiese din Tabelul 3 și din Figura 1, inaniția completă duce la o activare a sistemului hipofizo-tiroidian, care se manifestă în creșterea nivelului de hormoni cercetați în plasma sanguină. Inaniția completă cu durată de 1 zi duce la mărirea nivelului de triiodtironină de la $0,15 \pm 0,01$ nmol/l la șobolanii-martori până la $0,18 \pm 0,011$ nmol/l; de tiroxină de la $7,79 \pm 0,36$ nmol/l până la $10,34 \pm 0,54$ nmol/l și de tireotropină de la $1,22 \pm 0,04$ nmol/l până la $2,03 \pm 0,03$ nmol/l.

Mărind durată de acțiune a inaniției complete, s-a constatat că pe parcursul acestor 3 zile se manifestă o tendință de creștere atât a nivelului de hormoni iodați, cât și de tireotropină adenohipofizară.

Trebuie de menționat că la șobolanii supuși acțiunii inaniției complete s-a manifestat o agresivitate în comportament, mai ales în primele zile. Acesta și este firesc, deoarece la animale se excită centrul de foame și lipsa hrănilor le creează o stare de stres, la care se activează funcția sistemului hipotalamo-hipofizo-suprarenal.

Se știe că la șobolanii aflați în inaniție completă scade nivelul de glucoză în sânge [2]. Hipoglicemia, la rândul său, stimulează secreția unor hormoni (a hormonului de creștere, a adrenalinei etc.) care poate duce și la activarea sistemului hipofizo-tiroidian. Anume această activare a fost observată în experiențele efectuate.

Acțiunea hipokineziei pe fondalul inaniției complete asupra concentrației de hormoni tiroidieni și de tireotropină adenohipofizară

În lotul III șobolani au fost supuși acțiunii hipokineziei pe fondalul inaniției complete.

Rezultatele obținute în acest lot de experiență sunt indicate în Tabelul 4 și în Figura 2, de unde reiese că hipokinezia de diferită durată (1,2,3 zile) pe fondalul inaniției complete are o acțiune brusc stimulatorie asupra funcției sistemului hipofizo-tiroidian. Pe parcursul întregului experiment asupra acestui lot concentrația hormonilor cercetați în plasma sanguină s-a majorat față de nivelul hormonal la șobolani ce formau loturile I și II.

Tabelul 4

Concentrația hormonilor tiroidieni (T_3 , T_4 , nmol/l) și a tireotropinei adenohipofizare (TTH, nmol/l) în plasma sanguină la șobolani albi de laborator supuși acțiunii stresului combinat (hipokinezie + inaniție completă)

Nr. crt.	1 zi			2 zile			3 zile		
	T_3	T_4	TTH	T_3	T_4	TTH	T_3	T_4	TTH
M ± m	$0,29 \pm 0,45$	$21,01 \pm 1,04$	$2,85 \pm 0,052$	$0,29 \pm 0,38$	$21,90 \pm 0,72$	$3,06 \pm 0,041$	$0,31 \pm 0,44$	$23,4 \pm 0,90$	$4,15 \pm 0,07$
P	<0,05	<0,01	<0,05	<0,05	<0,01	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Martor M ± m	$0,15 \pm 0,01$	$7,79 \pm 0,36$	$1,22 \pm 0,04$	$0,15 \pm 0,01$	$7,79 \pm 0,36$	$1,22 \pm 0,04$	$0,15 \pm 0,01$	$7,79 \pm 0,36$	$1,22 \pm 0,04$

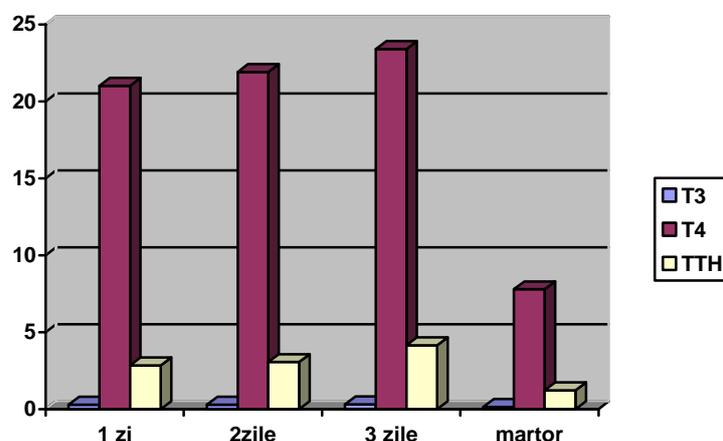


Fig.2. Nivelul hormonilor iodați ai glandei tiroide (nmol/l) și al tireotropinei hipofizare (nmol/l) la acțiunea stresului combinat (hipokinezie și inaniție completă).

Nivelul de T_3 și T_4 în plasma sanguină după 1 zi de acțiune a stresului combinat crește, corespunzător, până la $0,29 \pm 0,45$ nmol/l și $21,01 \pm 1,04$ nmol/l față de $0,15 \pm 0,01$ nmol/l și $7,79 \pm 0,36$ nmol/l la șobolani-martori. Creșterea concentrației de hormoni iodați este cauzată de mărirea nivelului de tireotropină, care în prima zi de experiență a stresului combinat constituie $2,85 \pm 0,05$ nmol/l față de $1,22 \pm 0,04$ nmol/l la șobolani-martori.

Tendința spre o majorare mai pronunțată a hormonilor cercetați se observă și după a 2-a și a 3-a zi de acțiune a stresului combinat (hipokinezie + inaniție completă), când concentrația de T_3 , T_4 , și TTH constituia, corespunzător, $0,29 \pm 0,38$ nmol/l și $0,31 \pm 0,44$ nmol/l (pentru triiodtironină); $21,89 \pm 0,72$ nmol/l și $23,40 \pm 0,90$ nmol/l (pentru tiroxină); $3,06 \pm 0,041$ nmol/l și $4,15 \pm 0,07$ nmol/l (pentru tireotropină).

Astfel, analizând datele obținute la influența hipokineziei pe fondalul inaniției complete s-a observat că acțiunea stresului combinat duce la modificări în concentrația hormonilor cercetați.

Este cunoscut faptul că procesul inaniției se caracterizează prin 3 etape:

etapa I: când organismul refuză hrana

În sânge are loc micșorarea concentrațiilor de substanțe alimentare și apare un semnal în centrul foamei, situat în hipotalamus. Centrul foamei se excită și acționează asupra segmentelor frontale ale encefalului răspunzătoare de alimentație. Această etapă durează 1-4 zile.

etapa II: este perioada de inhibiție

Simțul foamei dispare complet și se includ mecanismele fiziologice de alimentație a organismului, în primul rând se utilizează grăsimile din organism. Durează 40-50 de zile.

etapa III: dacă organismul nu primește hrană, în el se produc schimbări patologice ireversibile și dacă se pierde 40-45% din masa corpului, survine moartea.

Din datele literaturii este cunoscut că hormonii tiroidieni se acumulează în țesutul diferitelor segmente ale encefalului, mai ales al formațiunii reticulare. Mărind tonusul acesteia, hormonii tiroidieni exercită o acțiune stimulatorie și asupra funcției diencefalului, unde sunt localizați centrii superiori ai sistemului nervos vegetativ. Impulsurile transmise de la ei prin nervii vegetativi schimbă activitatea organelor interne.

Între conținutul hormonilor tiroidieni în sânge și secreția hormonului tireotrop există o dependență inversată; deci, între hipofiză și glanda tiroidă există o retroreacție.

Probabil, dependența aceasta între hipotalamus și hipofiză cu glanda tiroidă și duce la mărirea hormonilor iodați.

Concluzii

1. Inaniția completă are o acțiune stimulatorie atât asupra funcției hipofizare, cât și asupra glandei tiroide, care se manifestă în intensificarea secreției de hormoni în fluxul sangvin.

2. Acțiunea stresului combinat (hipokinezie + inaniție completă) duce la o majorare bruscă a tireotropinei adenohipofizare și a hormonilor iodați ai glandei tiroide pe parcursul întregului experiment.

Referințe:

1. Corlăteanu A., Paladi E. Efectuarea experimentului fiziologic. - Chișinău: CEP USM, 2001.
2. Paladi E., Dabija V. Acțiunea stresului combinat asupra sistemului sangvin. Bioetică, filosofie, medicină practică. Probleme de existență și de supraviețuire a omului. Materialele Conferinței a V-a științifice internaționale. - Chișinău, 2002, p.12-14.

Alte surse:

1. Melnic B., Crivoi A. Compediu de lucrări practice la fiziologia omului și animalelor. - Chișinău: Lumina, 1991.
2. Гордиенко В.М. Функциональное состояние щитовидной железы при иммобилизации в эксперименте. - În: Космическая биология и медицина. - Москва: Медицина, 1992, №6, с.71-78.
3. Иванов И.И., Лапшина В.Ф. Актуальные проблемы физиологии и патологии эндокринной системы. - Москва: Медицина, 1997.
4. Коваленко Е.А., Пенков В.А. Изменение функции организма при гиподинамии. - Киев: Наука, 1999.
5. Комисаренко И.В. Нарушение функции надпочечников при эндокринных заболеваниях. - Киев: Наука, 1997.

Prezentat la 01.03.2012

INFLUENȚA HIPOKINEZIEI ASUPRA STĂRII FUNCȚIONALE A GLANDEI TIROIDE

Liuba PERCIUN

Catedra Biologie Umană și Animală

Hypokinesia is a powerful stimulant to all organs and organ systems in the human body and animals. Hypokinesia causes a fundamental change in the physiological state and body fully functioning and longer action, changes in the body may become irreversible. Purpose of work is the research of hyperkinesias action based on full hunger list of different duration (1,2,3,4, days) on the level of thyroid hormones and thyriotropine in the plasma of blood of laboratory rats. For the achievement of the purpose were set the next tasks: the research balance of thyroid hormones (T_3 and T_4) and thyriotropine (TTH) in the plasma of blood of laboratory rats, subjected to action of hyperkinesias of different duration, the determination of level of T_3 and T_4 in the plasma of blood of rats which were in full hunger list, the determination of the concentration of thyroid hormones in the plasma of blood of rats subjected to action of hyperkinesias based on full hunger list of different duration.

Introducere

Hipokinezia prezintă o problemă de știință încă din cele mai vechi timpuri, însă o atenție deosebită i se acordă, în special, în ultimul timp. Revoluția tehnico-științifică, dezvoltarea intensă a industriei agricole au schimbat nu doar caracterul și conținutul muncii, dar și modul de viață, mediul ce înconjoară omul. Dereglarea legăturilor formate dintre organism și mediul înconjurător deseori duce la apariția stării stresorice. Hipokinezia – imobilizarea funcțională, inactivitatea membrilor – provoacă dereglări morfologice și funcționale în organism, organe și în sisteme de organe.

La limitarea activității motorii, schimbări survin în primul rând în **sistemul nervos**. În timpul imobilizării săvârșite experimental s-a demonstrat că la oameni și animale se dereglează funcția sistemului nervos central [1]. Schimbări survin și în activitatea electrolică a creierului [2,3].

Mobilitatea redusă, nemișcare „pe șezute”, în special în timpul experienței, excluderea completă a posibilității de a se mișca înrăutățește și dereglează funcțiile și provoacă schimbări atrofice în aparatul locomotor [4]. La fixarea unei părți a corpului se schimbă starea mușchilor imobilizați, a oaselor, articulațiilor. La o imobilizare completă, dereglări apar în tot aparatul locomotor. Așa, de exemplu, la întreținerea șobolanilor în cuște mici, dereglarea schimbului de Ca^{2+} se detectează nu doar în oasele femurale, ci și în oasele parietale ale animalelor.

Schimbări patologice survin și în **circuitul sangvin** al inimii. Gradul de dereglare depinde de durata stării hipokinezice. În stadiul temporar de hipokinezie capilarele inimii se contractau, apoi se dilatau, se schimba direcția lor, apăreau circumvoluțiuni [5]. Tot în hipokinezie are loc o stopare bruscă a greutateii corporale, deoarece mai puțin se alimentează; de asemenea, se observă o deshidratare puternică a corpului – consumă o cantitate mică de apă, iar cantitatea de urină eliminată este mare. Temperatura corpului considerabil nu se schimbă.

Cercetările efectuate asupra animalelor în hipokinezie au arătat că în aceste condiții animalele se comportă diferit. În primele câteva zile la animale apare o neliniște, scade reflexul alimentar, animalele se alimentează prost, apoi încep să se liniștească, se acomodează la condițiile noi și încep să se miște, le crește pofta de mâncare. De asemenea, le scade și potența sexuală; ca urmare, numărul urmașilor se micșorează [6].

Perioada primară în hipokinezie are loc în baza stresului emoțional, la care lucrul maxim al glandelor endocrine are loc în primele zile, după care urmează perioada adaptării organismului la un nou mod de viață [7].

Glandele endocrine au un mare rol în realizarea diferitelor acțiuni asupra organismului. Ele stimulează activitatea altor sisteme și organe. Hormonii hipofizei, suprarenalelor, glandei tiroide joacă un rol principal în mecanismele de adaptare și de protecție.

În stres, concentrația corticosteroidilor în suprarenale scade [8]. În hipokinezie la șobolani se mărește conținutul corticosteroidilor. Primele 30-35 de zile hipokinezia e urmată de o sinteză bruscă și secreție a corticosteronului. Până la 60 de zile se normalizează funcția stratului cortical al suprarenalelor, ca rezultat al inhibării funcționale.

În hipokinezia experimentală, schimbări pronunțate au loc în primele zile ale săptămânii, apoi se observă o uniformitate a schimbărilor [9]. O hipokinezie îndelungată provoacă dereglări pronunțate în hemodinamică. Cele mai caracteristice sunt: creșterea frecvenței contracției cardiace și scăderea volumului sangvin total. Tot la o hipokinezie îndelungată are loc schimbarea tonusului vascular, inclusiv al arterelor pielii, iar tonusul venelor capului și ale brațului nu se schimbă. Tonusul arterei labei piciorului scade, iar al vaselor mari (aortei, arterei carotide) nu se schimbă. Posibil, reorganizarea tonusului vaselor este unul dintre mecanismele ce favorizează reglarea volumului sângelui circulant la hipokinezie [10].

Un interes deosebit prezintă starea **sistemului endocrin** la hipokinezie. La șobolanii aflați în hipokinezie se observă în creier scăderea adrenalinei cu 19%, a noradrenalinei – cu 20%, în țesutul cardiac adrenalina scade cu 34,2% și noradrenalina cu 18%; acetilcolina liberă și legată scade în creier cu 56-80%, iar în țesutul inimii cu 33% și 76%, corespunzător. Conținutul corticosteronului în sângele periferic în această perioadă crește cu 142% [11].

Cercetările altor savanți au stabilit că cantitatea considerabilă de catecolamine în țesuturi și în diferite organe la a 12-a zi a experienței scadea, de asemenea și cantitatea de noradrenalină în miocard (de 2 ori) și în hipotalamus (de 5 ori) în comparație cu martorul [12].

Imobilizarea șobolanilor pe spinare în decurs de 6 ore duce la majorarea activității sistemului hipofizo-suprarenal. Regimul la pat duce la mărirea cantității de lipide, colesterol și lipoproteide în sânge [13].

S-a studiat influența hipokineziei asupra conținutului catecolaminelor și serotoninei în creier la șobolani. A fost stabilită majorarea cantității de catecolamine și serotonină în creierul șobolanilor supraexcitați prin metoda izolării la a 8-a – a 12-a săptămână, decât la animalele martor [14].

Stresul hipokinetice, care, după toată probabilitatea, facilitează creșterea mare de catecolamine în creier, serotonină – pentru transportul impulsului nervos, repede activează mecanismul de păstrare a impulsului acestor amine la șobolanii cu o activitate emoțională deosebită. Rezultatele experienței demonstrează că în timpul stresului șobolanii se deosebesc după reacția de răspuns, prin comportare, metabolizează aminele biogene în creier cu viteză diferită și, de asemenea, activează în măsură diferită mecanismul de control al stării aminelor în timpul stresului. Cercetările efectuate în acest domeniu sunt destul de actuale și de o importanță mare. Reieșind din importanța problemei, **scopul lucrării** a fost de a cerceta acțiunea hipokineziei de diferită durată (1,2,3,4 zile) asupra stării funcționale a glandei tiroide, determinând nivelul de T_3 , T_4 și TTH.

Material și metode

Ca obiect de studiu au fost șobolanii albi de laborator, dat fiind că ei ușor se înmulțesc și sunt cu mult mai liniștiți ca cei negri. Masa generală a șobolanilor folosiți în experiență constituie 200-230 gr.

Animalele de laborator au fost grupate în două loturi (Tab.1):

lotul I – martor, șobolanii se aflau în condiții obișnuite de vivariu, fără limite în mișcare și hrană;

lotul II – șobolanii au fost supuși acțiunii hipokineziei în decurs de 1,2,3,4 zile.

Hipokinezia s-a creat prin imobilizarea șobolanilor de laborator în cuști speciale, care reduceau mișcările animalelor. Înainte de imobilizare șobolanii erau cântăriți și rectal li se măsura temperatura corpului. La sfârșitul experienței au fost colectate probele de sânge pentru cercetarea hormonilor glandei tiroide și a hormonului tireotrop al adenohipofizei.

La toți șobolanii experimentali a fost cercetat bilanțul de hormoni ai glandei tiroide (T_3 – triiodtironina, T_4 – tiroxina) și al hormonului tireotrop (TTH) al adenohipofizei în plasma sangvină prin metoda imunofermenativă.

Tabelul 1

Caracteristica materialului experimental

Nr. lotului	Numărul de șobolani	Loturile experimentale	Durata experienței (zile)
1	5	Martor	1,2,3,4
2	20	Hipokinezie	1,2,3,4

Rezultate și discuții

Concentrația hormonilor tiroidieni și a tireotropinei adenohipofizare în plasma sanguină la șobolanii-martori

În lotul animalelor-martori au fost examinați 5 șobolani, care se aflau în condiții obișnuite de vivariu.

Rezultatele obținute în acest lot sunt expuse în Tabelul 2 și în Figura 1. Analizând concentrația hormonilor tiroidieni și a tireotropinei adenohipofizare în plasma sanguină la șobolanii-martori, observăm că nivelul de T_4 – tiroxină, T_3 – triiodtironină și de TTH – tireotropină determinat în experiențele noastre corespunde datelor din literatură [7,10].

După cum observăm din Tabelul 2 și din Figura 1, concentrația hormonilor în plasma sanguină este diferită. Concentrația de tiroxină în plasma șobolanilor-martori este mai înaltă ($7,79 \pm 0,36$ nmol/l) decât a triiodtironinei ($0,15 \pm 0,01$ nmol/l) și a tireotropinei adenohipofizare ($1,22 \pm 0,04$ nmol/l), ceea ce e și firesc, deoarece nivelul tiroxinei în organism este mai înalt decât cel al triiodtironinei și tireotropinei.

Tabelul 2

Conținutul hormonilor tiroidieni (T_3 și T_4 , nmol/l) și al tireotropinei (TTH, nmol/l) la șobolanii-martori

Nr. crt.	T_3 (triiodtironină) (nmol/l)	T_4 (tiroxină) (nmol/l)	TTH (tireotropină) (nmol/l)
1	0,139	7,332	1,031
2	0,129	6,871	0,930
3	0,178	9,038	0,890
4	0,163	8,083	1,442
5	0,143	7,648	1,786
M ± m	$0,15 \pm 0,01$	$7,79 \pm 0,36$	$1,22 \pm 0,04$

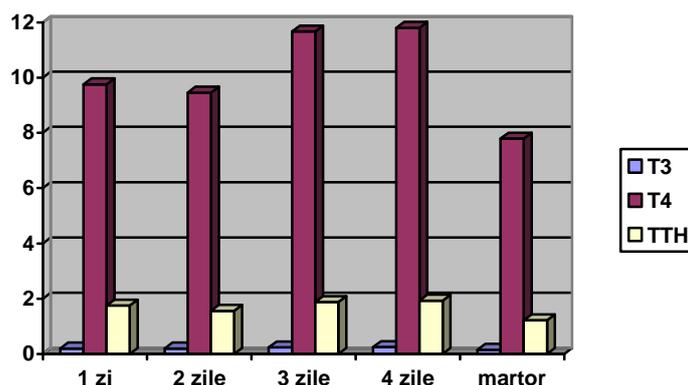


Fig.1. Nivelul hormonilor iodați ai glandei tiroide și al tireotropinei adenohipofizare la acțiunea hipokineziei.

E bine cunoscut faptul că produsul inițial al sintezei biologice a hormonilor iodați sunt aminoacidul, tirozina și iodul anorganic.

Omul și animalele primesc iod anorganic cu hrana sub formă de iodură de Na și de iodură de K. Conținutul iodului în rația alimentară timp de 24 de ore este de 100-200 μg . În organismul omului și al animalelor se conțin până la 30-50 μg de iod, dintre care 15 μg se află în glanda tiroidă [7].

Concentrația hormonilor tiroidieni (T_4 , T_3) și a tireotropinei adenohipofizare (TTH) în plasma sangvină la șobolanii de laborator supuși acțiunii hipokineziei de diferită durată

Lotul experimental II a inclus 20 de șobolani, care au fost supuși acțiunii hipokineziei timp de 1,2,3,4 zile.

După cum reiese din Tabelul 3 și din Figura 1, hipokinezia „curată” duce la unele modificări în nivelul hormonilor iodați ai glandei tiroide și al tireotropinei adenohipofizare. Acțiunea hipokineziei, timp de 1,2,3,4, zile, duce la creșterea nivelului de hormoni cercetați (T_3 , T_4 , TTH) în plasma sangvină în comparație cu concentrația lor la șobolanii-martori și constituie pentru triiodtironină $0,2 \pm 0,02$ nmol/l față de $0,15 \pm 0,01$ nmol/l; pentru tiroxină $9,76 \pm 0,77$ nmol/l față de $7,79 \pm 0,36$ nmol/l; pentru tireotropină $1,75 \pm 0,03$ nmol/l față de $1,22 \pm 0,04$ nmol/l.

Creșterea nivelului de hormoni iodați și de tireotropină în plasma sangvină la șobolanii supuși acțiunii hipokineziei este cauzată, după părerea noastră, de faptul că organismul este supus stresului, și anume: apare prima stadiu a stresului – reacția de alarmă. Organismul trece într-o mobilizare generală a forțelor de apărare, caracteristică fiind eliminarea hormonilor tiroidieni și a tireotropinei în fluxul sangvin.

Deci, putem conchide că la șobolanii supuși acțiunii hipokineziei „curate”, timp de 1,2,3,4 zile, cantitatea de hormoni cercetați în serul sangvin se mărește ca rezultat al reacției stresorice și al activării sistemului hipotalamo-hipofizo-tiroidian.

Tabelul 3

Concentrația hormonilor tiroidieni (T_3 , T_4 , nmol/l) și a tireotropinei adenohipofizare (TTH, nmol/l) în plasma sangvină la șobolanii albi de laborator supuși acțiunii hipokineziei de diferită durată

Nr. crt.	Durata hipokineziei											
	1 zi			2 zile			3 zile			4 zile		
	T_3 nmol/l	T_4 nmol/l	TTH nmol/l	T_3 nmol/l	T_4 nmol/l	TTH nmol/l	T_3 nmol/l	T_4 nmol/l	TTH nmol/l	T_3 nmol/l	T_4 nmol/l	TTH nmol/l
1.	0,17	8,39	1,44	0,19	13,42	1,37	0,20	13,80	1,88	0,22	12,9	1,89
2.	0,16	8,16	1,79	0,19	8,39	1,55	0,25	10,57	1,73	0,24	11,4	2,0
3.	0,25	9,66	1,70	0,20	8,16	1,50	0,25	10,49	1,90	0,26	10,5	1,91
4.	0,19	12,51	1,84	0,19	9,01	1,64	0,28	10,09	1,88	0,27	11,9	1,88
5.	0,23	10,07	1,98	0,20	8,31	1,75	0,21	13,42	1,99	0,24	12,2	1,97
M	0,20	9,76	1,75	0,20	9,46	1,56	0,24	11,67	1,88	0,25	18,8	1,93
±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
m	0,02	0,77	0,03	0,003	0,99	0,06	0,014	0,79	0,003	0,009	0,4	0,16
P	>0,05	>0,05	<0,05	<0,05	<0,1	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,01	<0,05

În literatura de specialitate există date despre activarea sistemului hipotalamo-hipofizo-tiroidian la diverse stări stresorice (traumă, stări emoționale, operații chirurgicale, încordare fizică etc.), însă unii autori [11] au obținut o micșorare atât a funcției hipofizare, cât și a glandei tiroide la aceste stări. S-ar părea că acest fenomen nu are cauză, dar totuși există ipoteze care denotă că în activitatea unor glande cu secreție internă, cum este hipofiza și tiroida, se observă acțiuni antagoniste la un anumit tip de stres.

Acțiunea hipokineziei cu o durată de 3 zile se manifestă în creșterea nivelului de tiroxină (T_4) în serul sangvin, care constituie $11,674 \pm 0,794$ nmol/l față de $7,794 \pm 0,362$ nmol/l la șobolanii-martori.

Aceeași tendință spre creștere a concentrației de hormoni față de nivelul lor la șobolanii-martori am observat și la cercetarea hormonului triiodtironinei ($0,24 \pm 0,014$ nmol/l față de $0,15 \pm 0,01$ nmol/l) și a tireotropinei adenohipofizare ($1,88 \pm 0,003$ nmol/l față de $1,22 \pm 0,04$ nmol/l).

Analizând datele obținute la cercetarea acțiunii hipokineziei „curate”, timp de 1,2,3,4 zile, putem conchide că diminuarea activității musculare a organismului duce la o activare neînsemnată a sistemului hipofizo-tiroidian și la o creștere ne semnificativă a nivelului de hormoni eliminați de aceste glande endocrine.

Mărind durata de acțiune a hipokineziei (4 zile) asupra nivelului de hormoni iodați și de tireotropină adenohipofizară, am observat o tendință de majorare, ca în primele zile, ceea ce, considerăm, poate fi în legătură cu adaptarea treptată a șobolanilor la aceste noi condiții create.

Analizând datele obținute la acțiunea hipokineziei, timp de 4 zile, asupra nivelului de hormoni cercetați, am constatat o majorare nesemnificativă atât a concentrației de tiroxină și triiodtironină, cât și a tireotropinei adenohipofizare.

Astfel, nivelul de tiroxină constituia la șobolanii supuși acțiunii hipokineziei, timp de 4 zile, corespunzător – $11,8 \pm 0,4$ nmol/l, concentrația de triiodtironină – $0,25 \pm 0,009$ nmol/l, iar conținutul de tireotropină adenohipofizară alcătuia în a 4 zi $1,93 \pm 0,16$ nmol/l.

Concluzii

1. Hipokinezia cu o durată de 1,2,3,4 zile duce la activarea funcției sistemului hipofizo-tiroidian, care se manifestă prin creșterea nivelului de hormoni iodați și de tireotropină adenohipofizară.

2. Hipokinezia provoacă o schimbare esențială în starea fiziologică și funcțională a organismului în întregime și, la o acțiune mai îndelungată, schimbările din organism pot deveni ireversibile.

Referințe:

1. Melnic B., Crivoi A. Compendiu de lucrări practice la fiziologia omului și animalelor. - Chișinău: Lumina, 1991.
2. Алешин Б.М. Гипоталамус и щитовидная железа. - Москва: Медицина, 1995.
3. Белкин А.И. Нервно-психические нарушения при заболеваниях щитовидной железы. - Москва: Медицина, 1992.
4. Коваленко Е.А., Пенков В.А. Изменение функции организма при гиподинамии. - Киев: Наука, 1999.
5. Paladi E., Dabija V. Acțiunea stresului combinat asupra sistemului sangvin. - În: Bioetică, filosofie, medicină practică. Probleme de existență și de supraviețuire a omului: Materialele Conferinței a V-a științifice internaționale. - Chișinău, 2002, p.12-14.
6. Виноградов В.И. Расстройства обмена связанные с гипокинезией. - În: Космическая биология и медицина. - Москва: Медицина, 1990, №2, с.75-84.
7. Гордиенко В.М. Функциональное состояние щитовидной железы при иммобилизации в эксперименте. - În: Космическая биология и медицина. - Москва: Медицина, 1992, №6, с.71-78.
8. Комисаренко И.В. Нарушение функции надпочечников при эндокринных заболеваниях. - Киев: Наука, 1997.
9. Белкин А.И. Нервно - психические нарушения при заболеваниях щитовидной железы. - Москва: Медицина, 1992.
10. Corlăteanu A., Paladi E. Efectuarea experimentului fiziologic. - Chișinău: CEP USM, 2001.
11. Алешин Б.М. Гипоталамус и щитовидная железа. - Москва: Медицина, 1995.
12. Ibidem.
13. Paladi E., Dabija V. Acțiunea stresului combinat asupra sistemului sangvin. - În: Bioetică, filosofie, medicină practică. Probleme de existență și de supraviețuire a omului: Materialele Conferinței a V-a științifice internaționale. - Chișinău, 2002, p.12-14.
14. Copulescu M. Neuroendocrinologie clinică. - București: Editura Științifică și Enciclopedică, 1986.

Prezentat la 16.02.2012

К ВОПРОСУ О ФУНКЦИОНАЛЬНОМ СООТНОШЕНИИ АФФЕРЕНТНОГО СИНТЕЗА, МОТОРНОЙ ПАМЯТИ И ЛОКОМОТОРНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ЧЕЛОВЕКА

Петру ПАВАЛЮК, Александр КОРЛЭТЯНУ, Григоре ВАРМАРЬ*

Институт физиологии и санокреатологии АН Молдовы

**Кафедра биологии человека и животных*

În articol este prezentată clasificarea diferitelor tipuri de memorie cu luarea în calcul a modalității, duratei de păstrare a acesteia, a caracterului de manifestare, precum și a particularităților interacțiunii dintre informația aferentă, memoria motorie și activitatea psihică în condițiile locomoțiilor simple și complexe. Se demonstrează că procesele principale ale memoriei motorii se află în raport nemijlocit cu activitatea locomotorie și psihică a organismului, iar pentru formarea și menținerea ei este necesar un antrenament bazat pe o informație aferentă voluminoasă.

In the article classification of various kinds of memory in view of a modality, storage period, character of display, and also feature of interaction aferent information, motor memory and mental activity is resulted in conditions of simple and complex movements. It is shown, that the basic processes of motor memory are directly connected with mental activity of an organism and for its formation and maintenance are required long, based at great volume aferent information of training.

Началом изучения связи между материальной основой, двигательной активностью и психическими процессами, то есть памятью, а также принципов их взаимодействия считаются исследования И.М. Сеченова [1] и И.П. Павлова [2]. Память и психика человека не являются константными, а модифицируются в течение жизни, участвуя в реализации различных физиологических процессов.

Данные литературы [3-6, 7-11] свидетельствуют о тесной функциональной связи двигательной активности, памяти, психики и эмоций. Естественно полагать, что энергетическая роль эмоций проявляется не только в мышечной активности, но и в сфере психических процессов, в том числе в механизмах памяти. Исходя из этого, память определяется и как психофизиологический длительный процесс, выполняющий функции запоминания, сохранения и воспроизведения ощущений при реализации двигательных актов. Результатами афферентного синтеза в процессе восприятия афферентной информации являются ощущения, которые используются в процессе интеграции и выработки команд при реализации двигательной деятельности либо фиксируются в памяти в виде энграмм с последующим их воспроизведением в новых поведенческих ситуациях.

Благодаря созданию за последние десятилетия новых методических приемов [16] для изучения механизмов памяти и психической деятельности и их роли в осуществлении локомоторных функций организма, теоретико-прикладной интерес к исследованию взаимосвязи уровней интеграции физиологических двигательных и психических процессов и их взаимовлияния значительно возрос, становясь проблемой первостепенной важности, чему и посвящена данная статья.

Поведение, включая и двигательную активность организма, всегда обусловлено действием различных раздражителей и зависит от соматического и психического состояния индивидуума. Организм должен адаптироваться к условиям внешней и внутренней среды. Основную роль при этом играют сложные нервные процессы, разворачивающиеся в центральной нервной системе и проявляющиеся различными типами поведения – инстинктивным, пищевым, агрессивным, произвольным и социальным, характеризующимся соотношением «доминанта-зависимость» и функциональным состоянием центральной нервной системы [17].

Материалы и их обсуждение

Двигательная активность организма – один из основных факторов, поддерживающих жизнь и ведущих к формированию и восприятию рецепторными образованиями опорно-двигательного аппарата обильной проприоцептивной, тактильно-болевой и другой афферентной информации, вследствие кодирования ее в виде нервных импульсов. Процесс кодирования в рецепторах различной модальности

происходит в результате деполяризации в условиях действия на них механических стимулов (прикосновение, давление, повреждение, растяжение и др.). Ощущение может быть определено как необходимый элемент первичной обработки влияния внешних и внутренних факторов, то есть афферентного синтеза, и представляет психический процесс, через который предметы и явления среды отражены во множестве их свойств как целостное единство.

В научной литературе [11] различают различные формы памяти. На основе данных научной литературы и собственных исследований, с учетом характеристик сенсорно-перцептивного процесса, нами представлена классификация типов памяти (см. табл.1).

Таблица 1

Классификация различных типов памяти человека с учетом характеристик сенсорно-перцептивного процесса

№	Критерий	Модальность информации, длительность хранения, происхождение	Тип памяти
1	Модальная специфичность афферентаций	Проприоцептивная тактильная, болевая зрительная слуховая вкуссовая обонятельная	Моторная моторная зрительная слуховая вкуссовая обонятельная
2	Пространственно-временная характеристика	Длительность сохранения афферентной информации	Мгновенная (0,1-0,5 с) кратковременная (около 20 с) оперативная долговременная
3	Вид психофизиологического процесса	Афферентация, исходящая от различных образований	Эмоциональная словесно-логическая, образная непроизвольная, произвольная непосредственная, опосредованная
4	Генез	Последовательность периода происхождения	Генетическая иммунологическая нервная

Очевидно, что информация, заложенная в указанных формах памяти, и формирует материальную основу проявления в определенных зонах кортекса и других отделах мозга психических свойств и процессов, реализующихся часто и в поведенческих двигательных актах [11]. К модально-специфическим формам памяти относится моторная память, функции которой, как было показано, тесно связаны с функциями рецепторных образований опорно-двигательного аппарата. На основе информации, полученной при осуществлении этого процесса под влиянием внешних стимулов, на фоне двигательной активности (фиксация, запоминание, сличение) в моторных зонах коры формируется память, составляющая основу всех форм двигательных навыков. Под моторной памятью подразумевается фиксация и сохранение способов пространственного положения и перемещения тела или его частей с последующим воспроизведением при необходимости. Она, естественно, достигается при помощи сложной координации и регуляции степени сокращения разных групп мышц, определяющих ту или иную форму движения или поддержания позы тела.

В ассоциации, регуляции и координации организмом различных видов двигательных актов огромная роль принадлежит сложным нервным механизмам, работающим благодаря информации с периферических рецепторных образований кинетического аппарата. Эти нервные сигналы управляют сокращениями мышц и центробежными сигналами, поступающими от различных сенсорных нервных окончаний [10, 13].

В результате исследования сложных центральных координационных нервных механизмов в научной литературе были пересмотрены классические взгляды на пирамидную и экстрапирамидную системы. В частности, появилась тенденция отрицать специфичность кортикоспинальных влияний по пирамидной системе и сводить их к облегчающим эффектам на сегментарные рефлекторные механизмы. Эти данные стимулировали появление новых сведений относительно деления нисходящих систем на латеральную, контролирующую дистальную мускулатуру конечностей и включающую пирамидный и руброспинальный тракты, и медиальную, связанную с функцией проксимальной и аксиальной мускулатуры, в состав которой входит ретикуло- и вестибулоспинальные системы, обе непосредственно участвующие в формировании сложных двигательных реакций и актов организма [12]. Данные экспериментальных исследований свидетельствуют не только об облегчающих, но и о специализированных нисходящих влияниях на двигательную активность латеральной системы. Несмотря на то, что влияния в пирамидной и руброспинальной системе одинаковы, однако они не совсем идентичны. Обратная афферентация о реализации двигательных актов, несомненно, вносит коррекцию и в их психический компонент.

При передаче различным видам двигательных актов разных свойств (длительности, интенсивности, частоты проявления, эмоциональной окраски) важное значение имеет консолидация функций моторной памяти с функциями других форм памяти, особенно зрительной, слуховой, а у некоторых видов животных – и обонятельной памяти.

При реализации двигательных реакций различные формы памяти взаимодействуют на основе афферентного синтеза и извлечения следов памяти прошлого опыта (табл.2).

Таблица 2

Взаимоотношения различных проявлений двигательных актов в условиях консолидации функций моторной памяти с функциями памяти других специфических модальностей

Виды памяти	Реализация простых и сложных двигательных реакций
Моторная	Реализация двигательных реакций. Различение и восприятие длительности, интенсивности, частоты, эмоциональной окраски и двигательных реакций.
Зрительная	Реализация двигательной активности, ориентировочно-исследовательских, поисковых, оборонительных реакций. Различение и восприятие форм предметов, дальности, размеров, объема, цвета.
Слуховая	Включение двигательных (часто срочных) и защитных реакций. Различение и восприятие тембра, частоты и интенсивности звуковых волн, шумов. Осуществление реакции ожидания, предупреждение опасности при нападении.
Тактильная	Развитие различных типов ответных реакций (включая двигательные). Восприятие прикосновений, давления, повреждения, болевых ощущений при ориентировочно-исследовательских и защитных реакциях. Содействие формированию основ двигательных актов.
Обонятельная*	Участие в реализации защитных и ориентировочно-исследовательских реакций. Различение и восприятие запахов.
Вкусовая*	Участие в реализации защитных реакций при получении пищи. Различение и восприятие вкусов (особенно при оценке качества напитков, пищевых продуктов и др.).

*Виды памяти у человека, не играющей столь важной роли при осуществлении двигательных реакций.

Ощущение, формирующееся на базе возникающей в результате кодирования афферентной импульсации, может быть определено как необходимый элемент первичной обработки влияния внешних и внутренних факторов. Оно представляет собой психический процесс, через который предметы и явления среды, непосредственно влияя на органы чувств, отражаются во множестве их свойств как целостное единство. Сенсорные входы, определяющие пространственно-временные мозговые процессы, координируются и регулируются для полного синтеза разнообразных ощущений.

Двигательная память, посредством ее сложных механизмов, образует основу множества и разнообразия моторных навыков (ходьба, бег, спортивные упражнения, движения и игры, пользование ручкой или карандашом, различные профессиональные навыки в работе на станках и машинах, управление транспортом и т.д.). Двигательные навыки, формирующиеся постепенно и длительное время, при достижении совершенства становятся полуавтоматическими и автоматическими, то есть в них уже частично не привлекаются такие психологические процессы, как внимание и сознание. Двигательные полуавтоматизмы и автоматизмы сохраняются длительное время и, если возникает необходимость, человек возвращается к ним довольно успешно без повторного обучения [15]. Автоматизмы влияют на психический портрет индивидуума, поддерживают психические свойства на саногенном уровне в конкретных условиях. Субъекты с развитой моторной памятью легче воспринимают новые понятия, тексты, дефиниции, теоремы и др. не на слух или путем чтения, а при их написании, и наоборот, если более развита зрительная или слуховая память. К.Д.Ушинский [16] писал, что безошибочная орфография приобретает также упражнением руки.

Моторная память тесно связана и непосредственно зависит от тактильной памяти. Этот вид памяти воспринимает, фиксирует и сохраняет ощущения от воздействия факторов прикосновения, давления, растяжения, повреждения, объема, размеров какого-либо предмета. Тактильная память хорошо развита у скульпторов, у субъектов с функциональными дефектами зрения, слуха и др., в некоторой степени у врачей, специальность которых связана с пальпированием, у массажистов и т.д. Слепые люди при помощи тактильной памяти с большой вероятностью могут на ощупь узнать лицо собеседника, его психическое настроение и состояние.

В обычных жизненных условиях функции этих форм памяти консолидируются, связаны между собой при достижении конкретной двигательной задачи. В чистом изолированном виде практически их невозможно отделить, скажем, чисто зрительную или слуховую от тактильного восприятия, как и у хищных животных моторную от обонятельной, слуховой и зрительной при преследовании жертвы.

Благодаря взаимодействию сложных механизмов обеспечения консолидации функций при реализации двигательной активности, формирование и поддержание моторной памяти в саногенных пределах происходит постепенно, требует длительной физической тренировки. В процессе этой тренировки устраняются лишние движения и компоненты поддержания позы тела и достигается саногенно необходимое выполнение конкретного двигательного акта. Устранение лишних движений наглядно отмечается у детей при первых попытках рисования, вырезания рисунков и при других подобных занятиях, когда у них отмечается ненужное качание головой, высывание языка, дрожание коленей и др., от чего они постепенно избавляются [17]. В общей сложности, комплекс конкретных двигательных актов (или поведенческих реакций) будет поддерживать на саногенном уровне моторную память, которая с другими формами модально-специфической памяти образует основу не только физиологических, но и психических процессов при осуществлении двигательной активности организма [8, 19].

Результаты тренировки различных форм памяти подтверждают факты преимущественного развития тех или иных из них в связи с особенностями профессий, когда в отдельных случаях более развита моторная (у легкоатлетов, прыгунов, туристов, бегунов и др.), зрительная (у учителей, студентов, водителей транспорта, художников и др.), обонятельная (у экспертов-парфюмеров и др.), слуховая (у музыкантов, у людей, изучающих иностранные языки), вкусовая (у ценителей вин, чая, табака) [11].

Тренировка моторной памяти проводится путем повторения двигательных стимулов через определенные интервалы времени [20-24]. Процесс восприятия и фиксации при этом поступающей информации реализуется в виде многократных повторений за один сеанс, а при необходимости – за несколько сеансов, интервал между которыми зависит от того, ставится ли задача запоминать двигательную реакцию и двигательный акт на короткое или длительное время. В этом случае ответ на данный вопрос решает индивидуально каждый субъект с учетом особенностей восприятия и памяти. На основании психологических исследований считается, что сначала следует провести сеанс двигательной активности в полном объеме, чтобы установить его основные узловые элементы. После чего, используя их, переходить к запоминанию двигательной реакции или актов поэтапно, через строго установленные интервалы времени. Длительность повторения сеансов усилит процесс фиксации и сохранения информации в памяти. Быстрое, мгновенное запоминание окажется непрочным. Во время перерывов происходит переработка информации в центрах моторной памяти, сцепление ее с уже

имеющимися здесь полученными ранее навыками. Однако перерывы между сеансами не должны быть чересчур длительными, ибо вместо запоминания и заучивания может наступить процесс забывания, то есть процесс исключения из памяти «образцов» двигательных ответных реакций или начинающих формироваться двигательных актов. Поэтому в начале процесса их формирования перерывы должны быть короткими (несколько часов), а по мере их усвоения перерывы можно удлинять до нескольких дней. При таком подходе процесс запоминания будет усиливаться и достигать более высокого уровня по сравнению с предыдущим [25].

Для поддержания как соматического, так и психического здоровья, субъект лично подбирает и проверяет эффективность приемов запоминания и фиксации или создает наиболее удобные для себя приемы. Здесь ярко выступает принцип индивидуального подхода в санокреатологии [7]. А условие может быть лишь одно – тренировка процессов, связанных с механизмами моторной памяти и полезностью информации для осуществления различных психических процессов. При этом важное значение имеют: концентрация внимания, правильная организация объема двигательных реакций и актов, подлежащих запоминанию, процессов произвольного извлечения из памяти той или иной информации при осуществлении двигательной активности.

Проведенный анализ описанных форм памяти как основы соматических и психических реакций и процессов показывает, что их нельзя разделять. Деление может быть только условным. На самом деле память человека имеет поликомпонентный характер. При осуществлении двигательной активности, формировании конкретных двигательных актов рассмотренные выше формы памяти под влиянием разных типов афферентаций консолидируются, в дальнейшем фиксируются и сохраняются. В случае выполнения различных двигательных программ эта информация сначала поступает во фронтальные и теменные ассоциативные поля, а затем в моторную кору, после чего извлекается из моторной памяти. При этом необходимо также учитывать и положительные эмоциональные компоненты, которые непременно усилят запоминание тех или иных двигательных актов, а в дальнейшем – и их использование. И лишь индивидуально при различной длительности тренировок можно добиться преимущественного генеза той или иной ее формы, за исключением случаев, когда это преимущество связано с врожденными свойствами восприятия ощущений на действие внешних и внутренних стимулов.

Таким образом, изложенные данные убедительно доказывают непосредственную связь различных форм памяти, в том числе моторной, с соматической и психической деятельностью организма, взаимно влияя друг на друга в процессе выработки различных форм динамической и статической активности и сложных форм двигательных актов.

Выводы

1. Информация, заложенная в различных формах памяти (модально-специфической, произвольной или непроизвольной, кратковременной или долговременной, непосредственной или опосредованной, образной, эмоциональной, словесно-логической и др.) и которая при разных видах деятельности может быть извлечена из нее, формирует основу проявления в определенных зонах кортекса механизмов поддержания на саногеннооптимальном уровне соматических и психических свойств и процессов.

2. Моторная память – разновидность модально-специфической памяти, тесно связана с особенностями афферентации в конкретных условиях внутренней и внешней среды как результата функций рецепторных образований опорно-двигательного аппарата, составляющих основу восприятия и образования ощущений, их фиксации, запоминания и воспроизведения в центрах мозга. Требуется сравнительно длительной, основанной на большом объеме афферентной информации тренировки, способствующей устранению лишних движений и компонентов поддержания позы тела, что приводит к усилению связи между моторной памятью и соматической и психической деятельностью человека.

3. Основными процессами моторной памяти, как и других форм памяти, являются запоминание, сохранение (фиксация) и воспроизведение умений и двигательных актов, непосредственно связанных с психической деятельностью.

4. При передаче различным видам двигательных актов разных свойств (частоты, интенсивности, длительности реализации, эмоциональной окраски) для достижения осуществления конкретной двигательной задачи или тренировки важное значение имеет консолидация моторной памяти с другими формами модально-специфической памяти.

5. Координирующий и регулирующий аспект нисходящих влияний (с учетом необходимости воспроизведения заложенной в моторной памяти информации) формируется в результате условно-рефлекторных перестроек на разных уровнях двигательной организации, которые имеют место под прямым воздействием афферентных влияний, вначале весьма специализированных, а также с участием эмоционального и психического действующих компонентов.

Литература:

1. Сеченов И.М. Элементы мысли. Избранные философские и психологические произведения. - Москва: Госполитиздат, 1947. - 449 с.
2. Павлов И.П. Полное собрание сочинений. - М.-Л., 1951, т.3, кн. 2, с.126-137.
3. Леонтьев А.Н. Проблемы развития психики. - Москва: Изд-во Моск. ун-та, 1972. - 189 с.
4. Лурия А.Р. Внимание и память. - Москва: Изд-во МГУ, 1975. - 221 с.
5. Нуллер Ю.Л. О парадигме в психиатрии // Обозрение психиатрии и мед. психологии им. В.М.Бехтерева, 1991, №4, с.5-13.
6. Бачериков Н.Е., Воронцов М.П., Петрюк П.Т., Цыганенко А.Я. Эмоциональный стресс в этиологии и патогенезе психических и психосоматических заболеваний. - Харьков: Основа, 1995. - 276 с.
7. Фурдуй Ф.И., Чокинэ В.К., Фурдуй В.Ф. и др. Понятие здоровье – отправная точка санокреатологии // Стресс, адаптация, функциональные нарушения и санокреатология. - Кишинев, 1999, с.44-51.
8. Фурдуй Ф.И., Чокинэ В.К., Фрунзе Р.И. Современное состояние изученности проблемы психического здоровья // Известия АН Молдовы. Науки о жизни. - Chișinău, 2008, № 3(306), с.4-14.
9. Рубинштейн С.Л. Основы общей психологии. - СПб: Питер, 1999. - 281 с.
10. Jorm A.f. Mental health literacy // British Journal of Psychiatry, 2000, v.177, p.396-401.
11. Громова Е.А. Память и ее резервы. - Москва: Знание. 1983. - 60 с.
12. Зыков М.Б. Использование кодирования функций алгебры логики для исследования зрительной памяти людей // Физиологические механизмы памяти. - Пушино-на-Оке, 1973, с.68-78.
13. Бернштейн Н.А. Очерки по физиологии движений и физиологии активности. - Москва: Медицина, 1966, с.121-170.
14. Kreindler A., Apostol V. Creierul și activitatea mintală. - București: Ed. Științifică și Enciclopedică, 1976. - 364 p.
15. Janet P.L. L'automatisme psychologique, 1989. - 253 p.
16. Ушинский К.Д. Человек как предмет воспитания. Собрание сочинений. - Москва: Изд-во АПН РСФСР, 1950, т.8.
17. Нестерова Н.А. Психологические механизмы интеллектуальной активности и электродермальные параметры человека // Вопросы психогигиены, психофизиологии, социологии труда в угольной промышленности и психоэнергетике. - Москва, 1980, с.216-236.
18. Милнер П. Физиологическая психология. Активность, исследовательские реакции, сенсорное самораздражение и психическое здоровье. - Москва: Мир, 1973, с.442-452.
19. Pavalic P., Leorda A., Garaeva S., Matei L., Varmari G., Mereuța I. Particularitățile dezvoltării consolidării funcțiilor aparatului locomotor cu funcțiile altor sisteme funcționale la realizarea locomoției // Studia Universitatis, nr.1 (41), 2011, p.41-48.
20. Ганнушкин П.Б. Постановка вопроса о границах душевного здоровья. Избранные труды. - Москва: Медицина, 1964, с.97-108.
21. Лезер Ф. Тренировка памяти. - Москва: Мир, 1979. - 179 с.
22. Brown V. Psychiatry – an international perspective // Nord. Psychiatr. Tidsskrift, 1980, v.34, no.2, p.93-110.
23. Давыдов В.В. Проблема развивающего обучения. - Москва: Педагогика, 1986. - 239 с.
24. Зинченко П.И. Непроизвольное запоминание. - Москва-Воронеж, 1996. - 186 с.
25. Роуз С. Устройство памяти, от молекулы к сознанию. - Москва, 1995. - 178 с.

Prezentat la 22.02.2012

EFECTELE UNUI PRODUS AUTOHTON ȘI ALE CATOZALULUI ASUPRA STĂRII FUNCȚIONALE A FICATULUI LA PUII DE GĂINĂ PENTRU CARNE

Victor PUTIN

Universitatea Agrară de Stat din Moldova

Taking in consideration the urgent need of the livestock sector in harmless growth promoters for animals and humans, the specialists of the Moldovan Academy of Science have managed to obtain a product from the microalgae *Spirulina platensis* that has been submitted in this study for testing on broilers. The study was carried out on 5 lots, 40 broilers each. The BioR remedy was studied on 3 lots of broilers with different doses and administration regime.

It has been experimentally proved that this remedy used on broilers beginning with the 7th day of life shows good effects on liver and especially on the proteosynthetic function of this organ also positively influencing the bioproductive indexes in broilers. It has been experimentally shown in production conditions that the optimal dose and the best administration regime of the BioR remedy is 0,3 ml per animal on the 7th day after hatching and 0,5 ml per animal on the 21st day of life of broilers.

Introducere

În ultimii 40-60 de ani avicultura a atins, la nivel național și internațional, performanțe remarcabile atât în plan biologic, cât și economic. Acest lucru a fost posibil grație combinării armonioase a realizărilor științelor biologice, veterinar-zootehnice și ale businessului, având ca scop primar asigurarea populației cu produse alimentare accesibile, calitative și ieftine, cea ce, în ultima instanță, contribuie la realizarea dezideratului principal – ridicarea calității vieții umane [3,8,21,22,23]. De menționat și faptul că majoritatea producătorilor, urmărind în principal sporirea cantității producției avicole, apelează la utilizarea stimulatoarelor de creștere, care nu totdeauna influențează benefic bunăstarea păsărilor și chiar pot prejudicia sănătatea publică.

Totuși, în condițiile actuale relativ bune de creștere și exploatare a păsărilor, cel mai afectat organ este ficatul, fiindcă nici un alt organ nu are de prelucrat o cantitate atât de mare de diverse toxine. Nu în zadar se menționează că acesta este organul central de dezintoxicare, de neutralizare a toxinelor, pregătindu-le pentru eliminarea din organism [29].

Prin urmare, este important a evidenția efectele produselor bănuite cu impact asupra funcției ficatului și, în mod deosebit, asupra metabolismului celular, funcției proteosintetice a acestui organ, capacităților hepato-protectorii, parametrilor care reflectă starea de sănătate, schimbările survenite în organismul animal în urma intervenției factorilor stresogeni, care se reflectă atât asupra stării de sănătate, cât și asupra indicilor bioproductivi [1,18,20,27].

Luând în considerație varietatea factorilor negativi care influențează organismul păsărilor în ansamblu și ficatul în special, un rol deosebit revine măsurilor și procedeele moderne, care au menirea de a regenera cea mai mare glandă din organismul animal și de a o proteja de diverse toxine [29]. Din gama relativ mică de preparate ecologic pure cu proprietăți hepatoprotectorii un loc aparte revine produsului autohton BioR, obținut în condițiile Republicii Moldova din *Spirulina platensis* [7,9,20]. De menționat că remediul BioR a fost studiat de noi pe puii de carne în diferite doze și regimuri de administrare elaborate în studii anterioare [16], precum și comparativ cu produsul Catozal. Însă, influența lor asupra ficatului nu a fost elucidată. Acest preparat conține un complex de substanțe bioactive, cum ar fi: aminoacizi, în special imunoactivi, ficobiliproteine (C-ficocianina), oligopeptide, microelemente ș.a.

Reieșind din cele relatate, am încercat să verificăm și să examinăm unele mecanisme prin care se realizează efectele regenerative – protectorii ale remediului BioR, administrat în diferite doze și regimuri puilor pentru carne, în confruntare cu Catozalul, prin aplicarea acestuia unui alt lot de pui.

Material și metode

Studiul a fost realizat pe 5 loturi a câte 40 pui-broiler în condițiile fabricii avicole „Avicola Șaver”, subdiviziunea Mereni, R. Moldova. Principiul de organizare a experienței cu utilizarea remediului BioR și a Catozalului este redat în Tabelul 1.

Tabelul 1

Schema administrării remediei BioR și a Catozalului puilor-broiler la a 7-a și a 21-a zi de viață

Loturile de pui	Nr. de pui	Doza și regimul de administrare, ml/cap		Calea de administrare
		pentru prima oară – la a 7-a zi de viață	a doua oară – la a 21-a zi de viață	
Martor	40	0,4 ml sol. 0,9% NaCl	0,8 ml sol. 0,9% NaCl	Intra-muscular
Experimental 1	40	0,3 ml BioR	0,5 ml BioR	
Experimental 2	40	0,4 ml BioR	-	
Experimental 3	40	-	0,8 ml BioR	
Experimental 4	40	0,2 ml Catozal	0,4 ml Catozal	

Remediul BioR, testat de noi cu scopul de a evidenția doza optimă, a fost administrat în doze diferite. Păsările antrenate în studiu au fost monitorizate: periodic s-a determinat temperatura corporală, mișcările respiratorii și masa corporală. Păsările au fost cazate în același adăpost, hrana a fost administrată la discreție, iar apa a fost asigurată prin adăpători automate. Pentru efectuarea examenului biochimic s-a recoltat sânge de la câte 5 pui din fiecare lot luat în studiu: la a 7-a zi de viață până la administrarea atât a remediei BioR, cât și a Catozalului și ulterior de 2 ori consecutiv – la a 28-a zi de viață și prealabil sacrificării, la a 42-a zi de viață.

Activitatea și nivelul parametrilor investigați (activitatea alaninaminotransferazei [ALT], pseudocolinesterazei [PCE], fosfatazei alcaline și nivelul colesterolului) au fost determinate în serul sangvin la analizatorul biochimic FP-900 (firma „Labsystems Finlonda”), prin metoda cinetică și fotometrică cu utilizarea seturilor de reagenți ai firmei „Elitech” (Franța) conform instrucțiunilor anexate.

Rezultate și discuții

Rezultatele cercetărilor întreprinse denotă că preparatul propus pentru testare pe pui pentru carne pe o perioadă de 35 zile, în condiții de producție, nu a provocat reacții adverse sau alte abateri în sănătatea și dezvoltarea tineretului avicol. Cele menționate mai sus sunt valabile totalmente și pentru produsul Catozal studiat de noi.

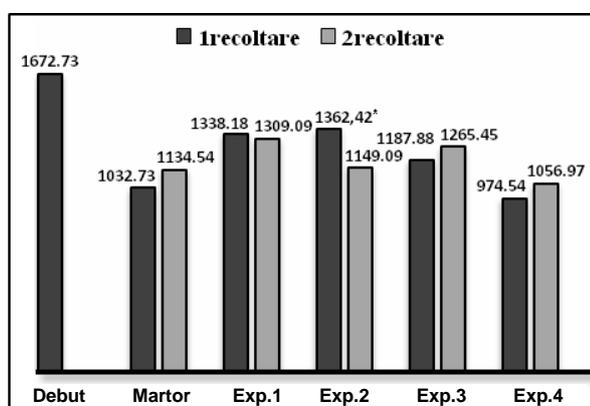


Fig.1. Activitatea pseudocolinesterazei (PCE) la puii pentru carne tratați cu remediu BioR, u/l

*P<0,05

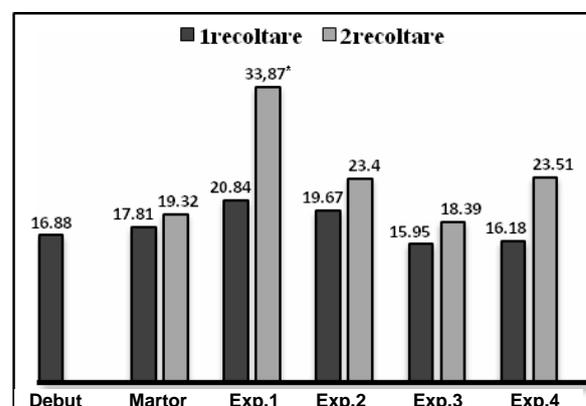


Fig.2. Activitatea alaninaminotransferazei (ALT) la puii pentru carne tratați cu remediu BioR, u/l

*P<0,05

Actualmente este acceptată ideea că un loc aparte printre indicii metabolismului celular al ficatului revine pseudocolinesterazei (PCE), enzimă hepatică, care constituie un test de apreciere a funcției proteosintetice a acestui organ. Valorile comparative ale acestui indice sunt redate în Figura 1. Pe parcursul studiului s-a constatat că cea mai înaltă valoare a PCE se înregistrează la debutul cercetărilor, aceasta constituind în medie 1672,73 u/l, indice care cu vârsta atât la prima, cât și la a doua recoltare diminuează la toate loturile de păsări antrenate în experiment. Tendințe similare de manifestare a dinamicii PCE cu vârsta la puii pentru carne au fost semnalate de noi anterior [14], precum și de alți autori la tineretul porcîn [9,10]. Pe parcursul studiului, atât la prima recoltare, cât și la a doua recoltare, nivelul funcțional al PCE este înalt la loturile tratate cu BioR, în raport cu doza și termenul sau regimul administrării, existând și diferențe semnificative.

Astfel, la a doua recoltare valori mai superioare ale acestui parametru au fost semnalate în lotul experimental 1 (cu 15,4%) și, respectiv, cu 11,5% în lotul experimental 3 comparativ cu lotul martor. O acțiune similară a remediei BioR asupra nivelului funcțional al PCE a fost constatată și la porcii tineri [9]. Mai mult ca atât, rezultatele analizate în această lucrare coincid cu cele publicate de noi anterior, care de asemenea atestă că nivelul funcțional al PCE în serul sangvin la puii-broiler este mai mare la cei care au fost tratați cu BioR în doze mai mici [13,14]. Prin urmare, rezultatele obținute denotă că remediu BioR a contribuit esențial la ameliorarea funcției proteosintetice a ficatului la puii pentru carne. Rezultate similare despre proprietățile proteosintetice ale acestui produs sunt semnalate și de alți autori, care au constatat că preparatul BioR contribuie esențial la ameliorarea funcției proteosintetice a ficatului la tineretul porcîn, alimentat cu rații carentate [11]. Totodată, nivelul PCE în lotul experimental 4, tratat cu Catozal, practic s-a menținut la nivelul lotului martor.

Este unanim acceptată opinia despre rolul și locul transaminazelor (ALT și AST) în aprecierea stării funcționale a ficatului, îndeosebi sub influența stimulatorilor de creștere [17,29]. Din datele expuse în Figura 2 constatăm că nivelul alaninaminotransaminazei (ALT) la puii din lotul martor la prima recoltare și la a doua recoltare puțin diferă de valoarea acestui indice la debutul studiului. Totodată, nivelul acestei enzime în unele loturi tratate cu remediu BioR s-a majorat la a 28-a zi la prima și, respectiv, la a 42-a zi la a doua recoltare cu 10,4-17,0% și cu 21,1- 75,3% față de lotul martor, existând și o diferență semnificativă la a doua recoltare în lotul experimental 1 față de martor ($p < 0,05$). O tendință similară s-a constatat și în lotul experimental 4, tratat cu Catozal la a doua recoltare, la finele studiului. Rezultatele obținute privind evoluția transaminazei ALT pot fi considerate benefice, dat fiind că mai mulți savanți susțin că valori puțin crescute ale transaminazelor serice și, în special, ale ALT denotă intensificarea proceselor metabolice în ficat [15, 32].

Despre acțiunea benefică și, totodată, inofensivă a produsului testat indică și analiza nivelului funcțional al AST, care cu vârsta manifestă o tendință de creștere la puii pentru carne la toate loturile antrenate în experiment (Fig.3). La primul termen de examinare investigațiile efectuate atestă că valoarea AST la puii tratați cu BioR este mai mică cu 5,4-8,7% față de lotul martor. Această tendință de diminuare a AST în serul sangvin este mai accentuată cu 27,5% la puii tratați cu produsul Catozal.

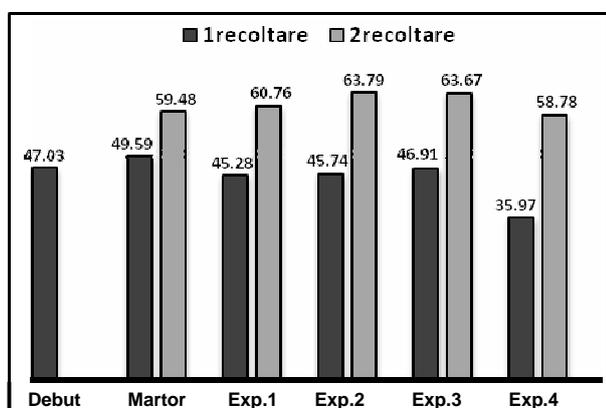


Fig.3. Activitatea asparataminotransferazei (AST) la puii pentru carne tratați cu remediu BioR, u/l.

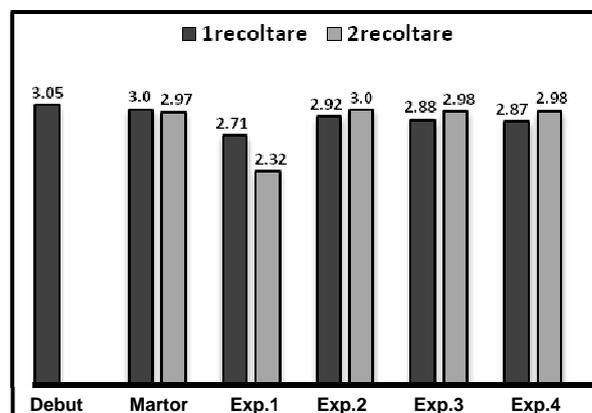


Fig.4. Concentrația colesterolului la puii pentru carne tratați cu remediu BioR, mmol/l.

De menționat că rezultate similare în manifestarea transaminazei AST au fost semnalate și de alți autori, care au testat acest produs pe puii pentru carne [30]. Dimpotrivă, la a doua recoltare, prealabil sacrificării, nivelul seric al AST în toate loturile tratate cu BioR manifestă o slabă tendință de creștere (2,1-7,2%) față de lotul martor, fapt ce confirmă inofensivitatea produsului testat, mai mult ca atât – proprietățile lui stimulatorii. Datele obținute vin în concordanță cu rezultatele altor cercetători, care au studiat efectele stimulatorii ale unor preparate de origine vegetală ecologic pure. Astfel, savanții ruși, în urma administrării la tineretul avicol a unui preparat fitobiotic din ierburi și extracte din plante, au semnalat o creștere în serul sangvin a transaminazei ALT cu 7,1% [32]. În acest context, unii cercetători au obținut valori mai mari ale activității transaminazelor AST și ALT în serul sangvin ($p < 0,01$) la cai de sânge pur, rasa Trachen, comparativ cu cabalinele care nu sunt de rasă [26].

În ultimii ani se depun eforturi spre diminuarea nivelului de colesterol în produsele alimentare și, în special, în ouă și în carnea de pasăre [5,6]. Un rol important în aprecierea efectelor metabolice pozitive ale produsului testat îl poate avea elucidarea influenței lui asupra nivelului de colesterol (Ch) în serul sangvin, valori redată în Figura 4. S-a stabilit că nivelul Ch la puii din lotul martor practic nu s-a modificat, acesta menținându-se la un nivel constant, fapt ce vorbește despre condițiile optimale de exploatare și alimentare a păsărilor antrenate în acest studiu. Rezultate similare privind nivelul Ch în sânge la pui au obținut și alți cercetători [25,33]. Studiul efectuat demonstrează că remediul testat a contribuit la menținerea Ch practic la același nivel, fapt ce atestă inofensivitatea acestui produs asupra proceselor metabolice derulate în ficat. Totodată, s-a constatat că utilizarea remediului BioR a contribuit la diminuarea nivelului de Ch, mai ales la puii din lotul experimental 1, tratați cu produsul testat de două ori consecutiv, în doze și regimuri optimale. Concentrația acestuia s-a redus cu 9,7% la prima recoltare și, respectiv, cu 21,9% la a doua recoltare față de lotul martor. Rezultatele discutate coincid cu cele publicate de noi anterior, care de asemenea atestă că remediul BioR contribuie la diminuarea Ch în sânge la puii-broiler [12]. Tendințe similare de reducere a nivelului Ch au fost înregistrate și la tineretul porcine, de asemenea tratat cu BioR [9]. În ultimii ani, o tot mai mare atenție se acordă preparatelor cu acțiune similară și la păsări. Astfel, savanții Л.Н. Бакаева și Г.М. Топурня, în urma administrării la găini a unui produs cu selen (Sel-Plex), au semnalat o diminuare veridică a colesterolului în ouă – cu 11,2% [24]. Alți autori au obținut rezultate similare în urma administrării puilor tineri a unui produs biologic activ – Gumival; nivelul Ch s-a diminuat cu 4,4% față de lotul martor [25].

Nivelul fosfatazei alcaline (FA) în serul sangvin este un test funcțional hepatic, care indică starea funcțională a acestui organ ca atare, precum și în cazul utilizării sau testării remediilor bănuite cu proprietăți biostimulatorii și antistresorii [2,4,9,30].

Rezultatele cercetărilor noastre, redată în Figura 5, relevă că nivelul funcțional al FA la puii de 7 zile, până la administrarea produsului testat, constituie 186,27 u/l, semnalându-se ulterior o tendință fiziologică de diminuare, fapt semnalat și la tineretul porcine [9], precum și la om [31].

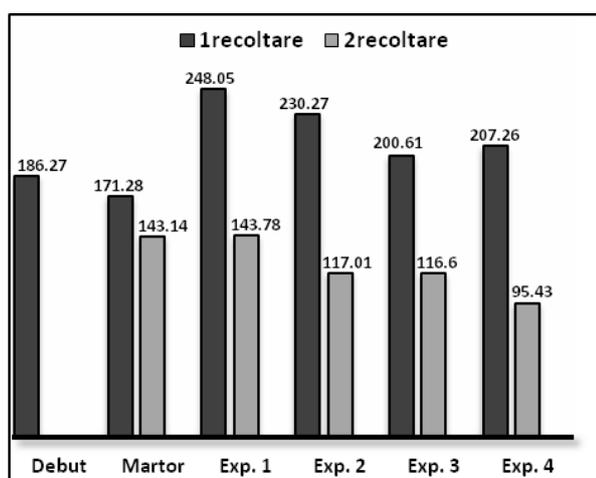


Fig.5. Activitatea fosfatazei alcaline totale la puii pentru carne tratați cu remediul BioR, u/l.

Analizând nivelul acestei enzime la prima recoltare (vârsta 28 zile), s-a confirmat influența benefică a produsului BioR privind ameliorarea proceselor metabolice derulate în ficat, exprimată prin valori mai mari ale enzimei FA (de 1,2-1,4 ori) față de lotul martor. Fapt ce denotă că mecanismul de acțiune a acestui preparat este de lungă durată și, în special, în perioade când se impune o necesitate fiziologică în această enzimă. Aceeași tendință de majorare a acestei enzime se înregistrează și la puii tratați cu Catozal. Acest fapt s-a realizat în perioada optimă de creștere și dezvoltare a puilor-broiler, în special a țesutului osos, extrem de necesar pentru organismul tânăr în perioade de dezvoltare și creștere maximă. La finele studiului (vârsta 42 zile) s-a confirmat ipoteza înaintată mai sus prin diminuarea acestei enzime la toate loturile tratate cu BioR, precum și la cel tratat cu Catozal, fapt ce denotă că produsul BioR se implică în situații de mari necesități fiziologice, astfel evidențiindu-se proprietățile lui adaptogene.

Rezultatele cercetărilor efectuate [28] relevă că preparatul BioR administrat succesiv la puii de carne în perioadele critice de imunodeficiență și în stări fiziologice de mari solicitări metabolice manifestă proprietăți moderate antistresorii, de diminuare a colesterolului, hepatoprotectorii și proteosintetice de lungă durată.

De remarcat că la testarea remediilor bănuite cu proprietăți antistresorii, adaptative un rol important revine și parametrilor bioproductivi. În acest context, specificăm faptul că masa medie a puilor la 42 zile, în lotul martor, a fost de 2205,0 g, pe când în cele experimentale, tratate cu BioR, aceasta a fost mai mare cu 135,0-233,0 g. De specificat ca indicele zootehnic sus-menționat la puii din lotul tratat cu Catozal a constituit 2325,3 g, cu 120,3 g mai mult decât în lotul martor.

Mai amplu, indicii bioproductivi la puii pentru carne se reflectă în sporul mediu zilnic, redat în Figura 6. Mai mult ca atât, parametrul analizat la puii tratați cu BioR a fost mai înalt cu 6,6-11,3% față de lotul de referință. O influență pozitivă a fost semnalată și în cazul lotului tratat cu Catozal, la care sporul mediu zilnic a fost mai mare cu 5,8% față de lotul martor. Un argument suplimentar privind standardele înalte de creștere, alimentație și igienă este și viabilitatea în studiu, indice care a constituit 100% la toate loturile incluse în experiment.

Astfel, rezultatele obținute oferă dovezi suplimentare privind posibilitățile de stimulare a productivității la puii pentru carne în condiții industriale, de stres, precum și posibilitățile de corecție și ameliorare a proceselor derulate în organismul puilor și, în special, la nivel de ficat, prin administrarea preparatului autohton BioR, rezultate confirmate și prin analiza unor indici bioproductivi.

Concluzii

1. Preparatul BioR, obținut prin tehnologii moderne din *Spirulina platensis*, administrat puilor de carne, are o toleranță locală și generală bună.

2. În condiții de fabrică avicolă s-a dovedit, experimental, că remediu BioR fiind aplicat puilor de carne de la a 7-a zi de viață manifestă efecte benefice asupra ficatului și, în special, asupra funcției proteosintetice a acestui organ.

3. S-a stabilit, experimental, în condiții de fabrică avicolă, că preparatul BioR administrat puilor de carne influențează pozitiv indicii bioproductivi, ceea ce se manifestă prin creșterea sporului mediu zilnic, comparat cu lotul de referință.

4. Prin intermediul studiului realizat s-a demonstrat experimental, în condiții de producție, că cea mai optimă doză și regim de utilizare a remediu BioR este de 0,3 ml/cap la a 7-a zi după ecloziunea puilor și de 0,5 ml/cap, respectiv, la a 21-a zi de viață a puilor.

Referințe:

1. Baci E. Aspecte metabolice ale proceselor reparative în ficat la regresia cirozei hepatice experimentale și efectele administrării trifluoracetatului de zinc cu γ - picolină: Autoreferat al tezei de doctor în științe biologice. - Chișinău, 2001.
2. Braun J.P. Methodes biochimiques de l'exploration hepaticque chez le mouton. II- Tests des fonctions hepaticques // Revue Med. Vet., 1998, vol.149, no 4, p.289-300.
3. Chilimar S. Sectorul zootehnic: realizări și perspective. - În: Realități și perspective în zootehnie, biotehnologii și medicină veterinară: Materialele simpozionului științific cu participare internațională, 6-8 octombrie, Maximovca, 2011, p.62-78.
4. Dunca I. Cercetări privind tehnologia de creștere a puilor de găină pentru carne: rezumat al tezei de doctor. - Cluj-Napoca, 2010.
5. Elkin R.G. Reducing shell egg cholesterol content. I. Overview, genetic approaches, and nutritional strategies // World's poultry science journal, 2006, vol.62, no4, p.665-687.
6. Elkin R.G. Reducing shell egg cholesterol content // World'S poultry science journal, 2007, vol.63, no1, p.5-32.

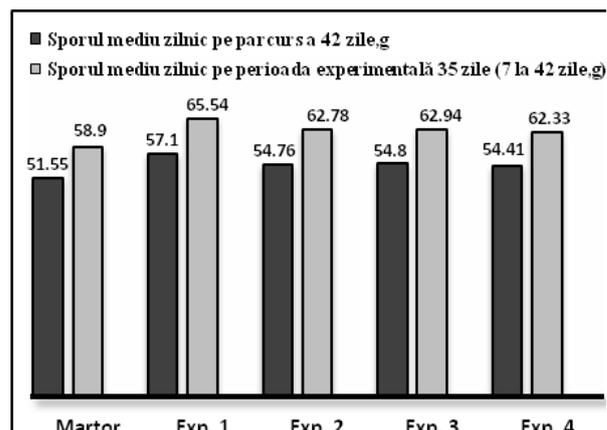


Fig.6. Efectele remediuului BioR asupra sporului mediu zilnic la puii pentru carne.

7. Grosu T., Macari V., Gudumac V., Rudic V. Procédé de stimulation de la productivité des porcins. In: EURECA '96: 45 Salon Mondial de L'invention, de la recherche et l'innovation industrielle. - Bruxelles, 1996, p.267.
8. Hodges J. Emerging boundaries for poultry production: challenges, dangers and opportunities // World's poultry science journal, 2009, vol.65, no1, p.5-21.
9. Macari V. Aspecte fiziologice-metabolice ale acțiunii preparatului BioR de origine algală asupra organismului animal: Autoreferat al tezei de doctor habilitat în biologie. - Chișinău, 2003.
10. Macari V., Rudic V., Gudumac V. Influența remediei BioR-S1 asupra nivelului funcțional al pseudocolinesterazei în serul sangvin la tineretul porcine // Anale Științifice ale Universității de Stat din Moldova. Seria „Științe chimico-biologice”. - Chișinău, 2000, p.48-49.
11. Macari V., Gudumac V., Donica A. Influența remediei BioR asupra pseudocolinesterazei în serul sangvin la tineretul porcine alimentat cu rații carentate // Lucrări științifice, USAMV „Ion Ionescu de la Brad”. - Iași, 2008, vol.51(10): Medicină Veterinară, part. I, p.87-89.
12. Macari V., Putin V., Gudumac V. Efectul remediei BioR asupra stării funcționale a ficatului la puii-broiler. - În: Simpozionul științific internațional „35 ani de învățământ superior medical veterinar din RM”. Chișinău, 15-16 octombrie 2009, p.19-23.
13. Macari V., Putin V., Gudumac V. Activitatea pseudocolinesterazei și nivelul seric al glucozei și ureei la puii-broiler tratați cu BioR // Lucrări științifice, USAMV „Ion Ionescu de la Brad”. - Iași, 2009, vol.52, partea II, p.1070-1074.
14. Macari V., Rudic V., Gudumac V., Putin V. Activitatea pseudocolinesterazei în serul sangvin la puii de carne tratați cu remediu BioR din a 2-a zi de viață. - În: Diversitatea, valorificarea rațională și protecția lumii animale: Materialele simpozionului internațional. - Chișinău: Știința, 2009, p.1074-1077.
15. Macari V., Iacob N., Mațencu D., Macari A., Pavlicenco N. Effects of The Remedy BioR on Certain Hepatic Indexes In Young Rabbits // Lucrări științifice, USAMV „Ion Ionescu de la Brad”. - Iași, 2010, vol.53(12): Medicină Veterinară, partea III, p.425- 429.
16. Macari V., Rudic V., Putin V., Macari A. Procedeu de stimulare a productivității puilor broiler: Brevet MD nr. 4101. Data depunerii: 2010. 06.01.
17. Pârvu Gh. Supravegherea nutrițională a animalelor. - București: Ceres, 1992.
18. Pârvu Gh., Costea H., Costea M. Nutriția, răspunsul imun și sănătatea animalelor. - București: Ceres, 1996.
19. Rudic V., Gudumac V. Preparat medicamentos. Brevet de invenție nr.545 // BOPI, 1996, nr.5.
20. Rudic V., Cojocari A., Cepoi L., Chiriac T., Rudi I., Gudumac V., Macari V., Codreanu S. ș.a. Ficobiotehologie - cercetări fundamentale și realizări practice. - Chișinău: Tipografia „Elena V.I.” SRL, 2007.
21. Șumanschi A., Bîzgu I., Modvala S. Studiul dezvoltării sectorului avicol la nivel național și internațional // Lucrări științifice ale Universității Agrare de Stat din Moldova. 2010, vol. 26: Zootehnie și biotehologii, p.122-126.
22. Șumanschi A., Bîzgu I., Harea V. Starea actuală și perspectivele de dezvoltare a sectorului zootehnic în Republica Moldova. - În: Realizări și perspective în zootehnie, biotehologii și medicina veterinară: Materialele simpozionului științific cu participare internațională, 6-8 octombrie, Maximovca, 2011, p.5-22.
23. Zoltan P., Voinițchi E., Bețivu Iu., Bălănescu S. Situația actuală și tendințele dezvoltării sectorului avicol din R. Moldova și la nivel internațional. - Chișinău, 2011.
24. Бакаева Л.Н., Топурия Г.М. Влияние препарата Сел-Плекс на организм кур несушек. - В: Материалы V-го Международного ветеринарного конгресса по птицеводству, 21-24 апреля 2009. - Москва, 2009, с.166-168.
25. Бузлама В.С., Долгополов Д.В. и др. Влияние бентонитола на интенсивность свободнорадикальных процессов в организме цыплят мясного кросса. - В: Материалы V-го Международного ветеринарного конгресса по птицеводству, 21-24 апреля 2009 г. - Москва, 2009, с.193-195.
26. Головаха В.И., Лумянник С.В. Функциональное состояние печени у жеребцов. Исследования молодых ученых в решении проблем животноводства / Сборник статей: Международная научно-практическая конференция, 22-23 мая 2001. - Витебск: ВГАВМ, 2001, с.44-45.
27. Капитонова Е.А. и др. Рекомендации по применению экологически чистых препаратов в промышленном птицеводстве. - Витебск: ВГАВМ, 2010. ISBN 978-985-512-374-4.
28. Карпуть И., Бабина М. Профилактика иммунных дефицитов и желудочно-кишечных болезней у цыплят-бройлеров // Птицефабрика, 2005, №4, с.66- 67.
29. Кольберг Н.А., Садовников Н.В. Роль печени в обмене веществ птиц. Морфологические изменения в печени птицы при использовании антигемотоксической терапии. - В: Материалы V-го Международного ветеринарного конгресса по птицеводству, 21-24 апреля 2009 г. - Москва, 2009, с.14-20.
30. Мещеряков Н.П. Использование Катозала для улучшения здоровья животных // Ветеринария, 2003, №11, с.8-11.
31. Назаренко Г.И., Кишкун А.А. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. - Москва: Медицина, 2000, ISBN 5-225-04579-0.
32. Савченко С., Савченко В. Спайс-мастер для молодняка // Птицеводство, 2007, №3, с.14-15. ISSN 0033-3239.
33. Сандул П.А. Эффективность применения бройлерам концентрата витаминов Е и F из рапсового масла // Ученые записки Витебской Гос. Академии ветеринарной медицины, 2007, том 43, выпуск 1, с.210-212.

Prezentat la 31.05.2012

REDUCEREA EMISIILOR NOCIVE ALE MOTOARELOR CU ARDERE INTERNĂ PRIN UTILIZAREA OZONULUI ÎN FORMAREA AMESTECULUI DE ARDERE

Alexandru CRACIUN, Vladimir ENE, Vasile PLĂMĂDEALĂ**, Ilie BEIU***

Universitatea de Stat din Moldova

**Academia de Transporturi, Informatică și Comunicații*

***Universitatea Tehnică a Moldovei*

The paper studies the influence of ozone enriched air, obtained through electro-synthesis, on the reduction of harmful emissions in the exhaust gases generated from burning of working mixtures in an engine with internal combustion.

Introducere

Pe parcursul ultimilor douăzeci de ani domeniile de utilizare a ozonului au devenit tot mai vaste datorită implementării noilor elaborări, care poartă un caracter continuu. Dezvoltarea pe larg a tehnologiilor cu utilizarea ozonului este determinată de puritatea ecologică a acestuia. În reacțiile chimice ozonul se descompune în oxigen molecular și în oxigen atomic – produși care nu poluează mediul și nu contribuie la formarea substanțelor cancerigene, spre deosebire de oxidarea cu clor sau cu fluor.

Una dintre metodele de diminuare a emisiilor nocive cu gazele de eșapament ale motoarelor cu ardere internă (MAI) se bazează pe utilizarea aerului îmbogățit cu ozon pentru crearea amestecului aer-benzină în motorul cu benzină și a încărcăturii aeriene în motorul Diesel, precum și pe introducerea unui astfel de amestec în canalul de evacuare pentru oxidarea parțială a componentelor nocive din gazele de eșapament (GE).

La obținerea ozonului o parte din oxigenul atomic, care nu a interacționat cu oxigenul molecular, la fel va contribui la plenitudinea arderii carburanților pentru motoare.

Motorul cu ardere internă este un generator ecologic de energie mecanică doar în cazul funcționării lui în regim de putere maximă (nominală), când se respectă cu strictețe raportul stoechiometric între cantitățile de aer și combustibil la formarea amestecului combustibil-aer.

Pentru diminuarea emisiilor nocive (CO și C_nH_m) este necesar de a spori eficiența (plenitudinea) arderii amestecului benzină-aer în motorul cu benzină și a amestecului aer-motorină în motorul Diesel, ceea ce se poate realiza prin menținerea coeficientului necesar de exces de aer sau prin sporirea conținutului de oxidanți efectivi în aerul alimentat în galeria de admisie a MAI. Oxidanți eficienți sunt ozonul, hidrogenul atomic și oxigenul, peroxidul de hidrogen, radicalii HO_2 și hidroxilul OH .

Ozonul poate spori substanțial plenitudinea arderii amestecului aer-benzină, ceea ce va duce la diminuarea cantității de emisii nocive, cum ar fi CO , C_nH_m și NO_x , contribuind esențial la diminuarea cantității de emisii nocive ce revin conversiei în neutralizatorul catalitic, sporind durata de exploatare a acestuia și reducând cantitatea de emisii nocive în atmosferă. Plus la aceasta, o parte din ozonul format poate fi introdus în galeria de eșapament a gazelor, după neutralizatorul catalitic, iar cantitatea de emisii nocive se va reduce și mai mult.

Influența aerului îmbogățit cu ozon asupra diminuării emisiilor nocive ale MAI am demonstrat-o în [1]. Ozonul se formează din oxigen, inclusiv din oxigenul aerului. Sinteza acestuia poate fi realizată prin diferite metode, cea mai eficientă fiind sinteză electrică cu utilizarea descărcării de tip corona [2].

Partea experimentală

Pentru obținerea aerului îmbogățit cu ozon, utilizat la arderea amestecurilor aer-carburant în MAI, mai acceptabilă este descărcarea prin efectul corona de barieră, care permite realizarea mai compactă a ozonizorului, pentru amplasarea lui sub capota automobilului (compartimentul motorului), precum și o construcție mai simplă a acestuia. În acest caz este de dorit ca și sursa de tensiune înaltă să fie de dimensiuni mici, pentru a putea fi amplasată în compartimentul motorului. Noi am elaborat și am confecționat două modificări ale ozonizoarelor cu utilizarea descărcării prin efect corona al stratului de baraj (Fig.1,2) și sursă de curent de înaltă tensiune și de înaltă frecvență.

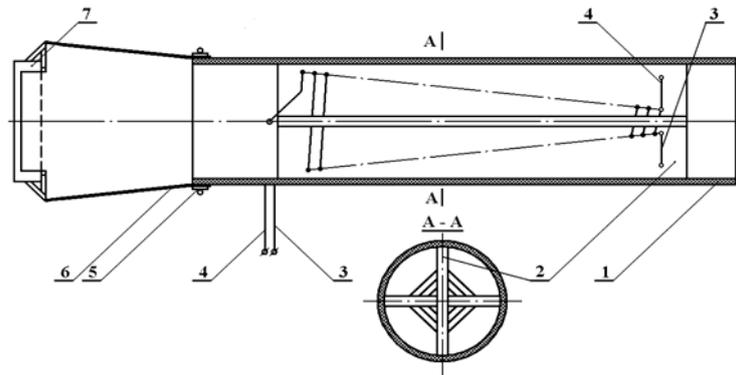


Fig.1. Ozonizorul (modificarea-1):

1 – tub; 2 – suport în formă de cruce; 3 și 4 – electrozi din fire;
5 – brățară; 6 – confuzor; 7 – ventilator.

Ozonizorul (modificarea-1) este prezentat în Figura 1 în secțiune longitudinală și reprezintă o construcție în formă de tub (1) din material dielectric, în interiorul căruia se află o cruce piramidală (2), din material electroizolant, pe care sunt înfășurați electrozii din sârmă (3) și (4). La ieșire electrozii se cuplează la sursa de tensiune. Pe tubul (1), cu ajutorul unei bride (brățări, scoabe) (5), se fixează confuzorul (6), prin care cu ajutorul ventilatorului (7), alimentat de la o sursă de curent continuu de 12 V, aerul intră prin tubul (1) și trece printr-un câmp electric, creat la descărcarea prin efect corona cu ajutorul electrozilor (3) și (4), alimentați cu tensiune înaltă, aerul devenind saturat cu ozon. La ieșire din ozonizor, aerul, îmbogățit cu ozon, intră în galeria de admisie a MAI. O parte din acest aer poate fi adusă la sistemul de evacuare a GE, pentru a intensifica oxidarea componentelor nocivi ai acestora. Ozonizorul propus este cu echicurent.

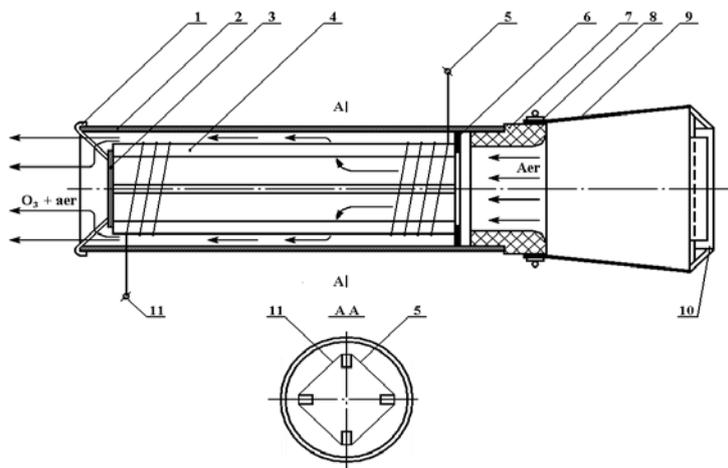


Fig.2. Ozonizorul (modificarea-2):

1 – suport din fire; 2 – țevă; 3 – capac (orb); 4 – tijă; 5 – borna firului electric; 6 – șaiță;
7 – îndrumar pentru aer; 8 – brățară; 9 – confuzor; 10 – ventilator; 11 – borna firului electric.

Modificarea a doua a ozonizorului (secțiunea lui longitudinală) este prezentată în Figura 2 în formă de tub și este executată prin analogie cu modificarea-1.

Ozonizorul (modificarea-2, Fig.2) prezintă următoarea construcție: țeava (2) din material dielectric care conține în interiorul său o carcasă unică, care constă din capacul (3), patru tije (4) și o șaiță (6) cu orificiu pentru trecerea aerului. Carcasa unică este fixată de țeava (2) cu ajutorul unui suport din fire (1). Exterior carcasa, pe tijele (4), este înfășurată cu două fire de tensiune înaltă și joasă unite la bornele (5) și (11). Curentul

de aer, format de ventilatorul (10), trece prin confuzorul (9), prin conducta (7) și prin orificiul din șaiba (6) în zona de acțiune a descărcării prin efect corona, unde are loc formarea ozonului.

Spre deosebire de modificarea-1, în ozonizorul modificarea-2 curentul de aer se îmbogățește cu ozon, în timpul trecerii forțate prin zona descărcării cu efect corona, creat de doi electrozi de sârmă, înfășurați pe tijele (4), datorată capacului (3), care împiedică cursa directă a aerului.

Ozonizorul modificarea-2 este alimentat de o sursă de curent alternativ de tensiune înaltă, alimentată, la rândul ei, de o sursă de bord de curent continuu cu tensiunea de 12 V.

Pentru intensificarea procesului de obținere a ozonului la descărcare prin efect corona cea mai eficientă este utilizarea tensiunii alternative de înaltă frecvență.

În acest context, noi am elaborat și am executat o sursă de curent de înaltă frecvență de tensiune alternativă, care permite a avea o tensiune la ieșire de cca 3 kV, iar intensitatea curentului, consumat în rețeaua de bord, constituie 2 A, puterea consumată fiind de 24 W.

Au fost măsurăți parametrii electrici ai ozonizorului. Schema măsurării curentului și a tensiunii ozonizorului este prezentată în Figura 3. Tensiunea înaltă se măsoară cu ajutorul redresorului de vârf de înaltă tensiune (diodă de înaltă tensiune Д1 tip 2CL72, condensatorul C1 și rezistorul de încărcare R₁ tip КЭВ-0,5); curentul ozonizorului se măsoară cu ajutorul punții de joasă tensiune pe diode КД 521 și rezistorul de încărcare R2 tip MJT-O.

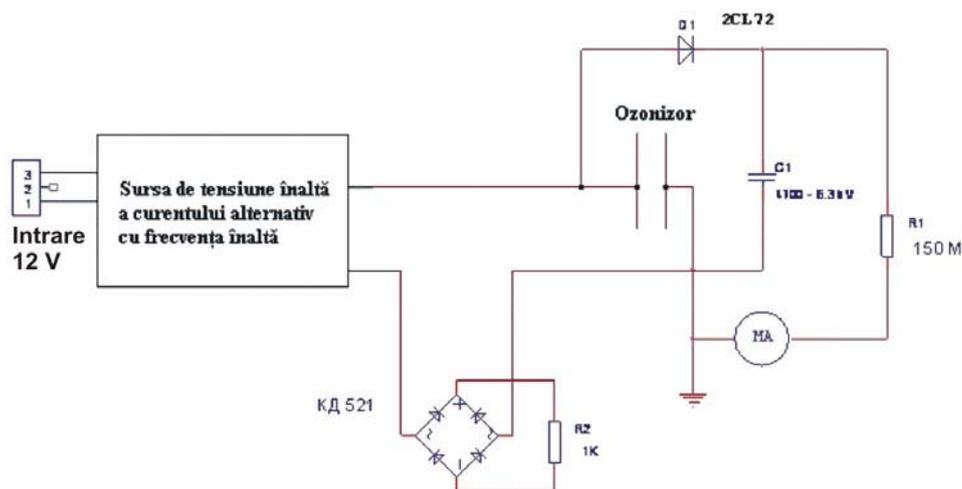


Fig.3. Schema măsurării tensiunii și a curentului ozonizorului.

Pentru a determina valorile de lucru ale tensiunii și curentului, este necesar a lua în considerare forma impulsurilor acestora, durata și perioada lor. Oscilograma tensiunii pe rezistorul de încărcare R₂, care corespunde curentului ozonizorului, este prezentată în Figura 4.

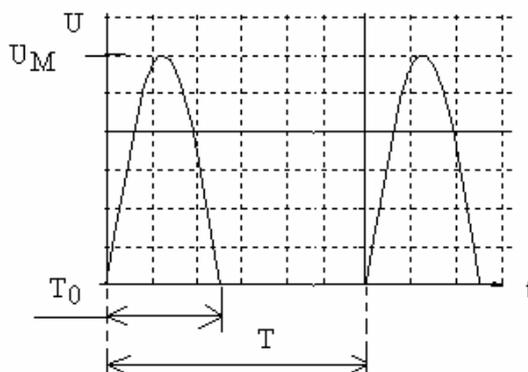


Fig.4. Oscilograma tensiunii.

Durata impulsului $T_0 = 0,2 \mu s$, perioada $T = 0,6 \mu s$. Amplitudinea tensiunii $U_M = 10 V$, ceea ce pentru R2 corespunde amplitudinii curentului $10 \mu A$.

Valoarea de lucru a curentului se determină cu relația:

$$I = I_M \sqrt{\frac{T_0}{2T}} = \frac{I_M}{2,45} = 4 \mu A.$$

Intensitatea curentului prin rezistorul R1 este de $44 \mu A$, ceea ce corespunde amplitudinii de înaltă tensiune:

$$U_i = 44 \cdot 150 = 6,6 kV.$$

În acest caz, valoarea de lucru a tensiunii se determină în mod similar:

$$U = U_i / 2,45 = 2,74 kV.$$

Obținerea ozonului a fost realizată prin electrosinteză cu utilizarea descărcărilor prin efect corona la ozonizoarele de o construcție originală (Fig.1,2), alimentată de o sursă de înaltă tensiune (de ordinul $3,0 kV$) de înaltă frecvență ($3000 \dots 4000 Hz$).

Ozonizoarele au fost instalate direct pe carburator, fără folosirea ventilatoarelor.

Încercările ozonizoarelor au avut loc pe motorul cu carburator cu patru cilindri pentru automobilul BA3 21011 în conformitate cu prevederile GOST-ului 17.2.2.03-8 „Concentrația limită admisibilă a substanțelor toxice în gazele de eșapament”, folosind standul de încercări pentru motoarele de automobile.

Pregătirea motorului și regimul lui de încercare au fost determinate de metoda încercărilor pe stand, aplicată în laboratorul Catedrei „Transportul auto”, UTM, la regimul mersului în gol al motorului, la două valori ale turațiilor arborelui cotit: $n_{\min} = 900 \text{ rot/min}$ și $n_{\max} = 4500 \text{ rot/min}$ ($0,8 n_e$).

Controlul emisiilor nocive (CO și C_nH_m) în țeava de eșapament a fost realizat cu ajutorul analizorului de gaze ABTOTECT-01.03M în absența ozonului și în prezența acestuia în canalul de admisie a motorului.

Rezultatele testărilor sunt prezentate în Tabel.

Tabel

Emisiile nocive ale motorului

Frecvența de rotație a arborelui de cotit, rot/min.	Oxid de carbon – CO, vol. %	Hydrocarburi – C_nH_m , mln^{-1} (ppm)
În absența ozonului		
$n_{\min} = 900$	3,6 (3,5)	1300 (1200)
$n_{\max} = 4500$	1,8 (2,0)	700 (600)
În prezența ozonului (modificarea-1)		
$n_{\min} = 900$	3,1 (3,5)	1100 (1200)
$n_{\max} = 4500$	1,6 (2,0)	600 (600)
În prezența ozonului (modificarea-2)		
$n_{\min} = 900$	2,0 (3,5)	1000 (600)
$n_{\max} = 4500$	1,3 (2,0)	500 (600)

Notă: în paranteze sunt indicate cantitățile admisibile (GOST 17.2.2.03-8) pentru un motor cu patru cilindri.

Concluzii

1. Testarea motorului alimentat cu aer îmbogățit cu ozon a indicat că concentrația CO în gazele de eșapament se reduce de 1,12-1,18 ori, iar cea a C_nH_m – de 1,16-1,4 ori.

2. Reducerea concentrației emisiilor nocive în GE permite a spori durabilitatea straturilor catalitice ale neutralizatorului GE.

3. Până la atingerea temperaturii de lucru în straturile catalitice ale neutralizatorului, motorul va produce o cantitate mai mică de emisii nocive, prin alimentarea lui cu aer îmbogățit cu ozon.

Referințe:

1. Craciun Al., Ene V., Plămădeală V., Beiu I. Cercetări cu privire la utilizarea ozonului în motoarele cu ardere internă în scopul reducerii emisiilor nocive // Studia Universitatis, 2010, nr.6(36), p.143-146.
2. http://www.waterline.ru/content_217. ООО «Триотехника» - инженерно-технический центр 2008.

Prezentat la 09.02.2012

ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССОВ АНАЭРОБНОГО ПОЛУЧЕНИЯ БИОВОДОРОДА**В.В КОВАЛЕВ, О.В КОВАЛЕВА, В.А. БОБЕЙКА, В.Э. НЕННО, Г.Г. ДУКА***Научно-исследовательский центр прикладной и экологической химии*

A fost studiată influența substanțelor biologice active asupra cineticii de degajare în procesele de fermentare anaerobă a borhotului din producerea alcoolului. S-a stabilit rolul biohidrogenului în procesele de metanogeneză. Au fost determinate condițiile de stimulare a proceselor de obținere a hidrogenului molecular, condițiile de inhibare a stadiului metanogen pentru dezvoltarea tehnologiei de biohidrogen.

The influence of natural bioactive substances on the kinetics of gas evolving has been studied during the anaerobic fermentation of the distillery grains, the role of biohydrogen in the methanogenesis process was revealed, the conditions were determined for stimulation of the molecular hydrogen obtaining under the conditions of the methanogenic stage inhibition, in view of the development of the biohydrogen technology.

Введение

В связи с сокращением запасов на Земле сырьевых источников природного углеводородного топлива, в последние годы во всем мире предпринимаются усилия по поиску новых альтернативных, нетрадиционных источников энергии. Отходы сельскохозяйственного и перерабатывающих производств могут составить основу биологических процессов получения биогаза как эффективного источника энергии. Так, в Молдове действуют 32 спиртовых производства, на которых при получении 1 л спирта ректификата образуется 10-13 л барды. Ежегодно в окружающую среду сбрасываются десятки тысяч тонн токсичной барды, тогда как из этих отходов можно генерировать свыше 42 млн. м³/год биогаза.

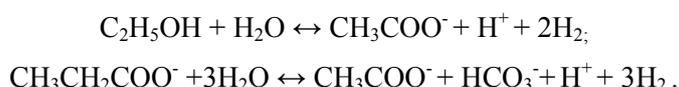
В последнее время особое внимание уделяется водородной энергетике, являющейся наиболее экологически чистой [1]. Водород считается многообещающим источником топлива с высоким энергетическим выходом (122 кДж/г). Как правило, сырьевым источником получения водорода является вода, которая практически полностью возвращается в природную среду после получения энергии в энергетических системах при сгорании водорода до конечного продукта воды [2]. Изыскиваются различные способы удешевления процессов электролиза воды [3]. Среди них – одна из наших разработок, включающая новые процессы и установки с использованием специальных объемно-пористых электродов с низким перенапряжением выделения водорода [4]. Достоинством этой разработки, в частности, является возможность получения чистого водорода и более низкие энергетические затраты. Более дешевым является биохимический путь получения водорода и метана, где сырьем является вода и разлагаемые органические отходы, а источником энергии служат газы, вырабатываемые микроорганизмами в процессе их жизнедеятельности.

В общем виде, микробиологический процесс, влияющий на состав биогаза, образующегося в результате брожения органического субстрата, можно представить исходя из условий [5], что продукты расщепления органического субстрата служат одновременно и донорами, и акцепторами водорода. В этих условиях клетка микроорганизмов избавляется от окисленного углерода, выделяя CO₂. Отдельные этапы окисления представляют собой процессы дегидрирования, при которых водород переносится на никотинамид аденин динуклеотид (NAD). При сбраживании углеводов и ряда других органических веществ образуются (по отдельности или в смеси) такие продукты, как этанол, лактат, пропионат, формиат, бутират, сукцинат, капронат, ацетат, *n*-бутанол, 2,3-бутандиол, ацетон, 2-пропанол, CO₂ и H₂. В этом случае акцепторами водорода, содержащегося в составе NADH₂, служат промежуточные продукты расщепления субстрата. При регенерации NAD последние восстанавливаются, а продукты восстановления выводятся из клетки.

Первые исследования анаэробных процессов, проведенные в начале XX века В.Л. Омелянским [6], выявили, что брожение биомассы не всегда начиналось с выделения метана, а задерживалось на стадии образования промежуточных соединений, при этом вместо метана образовывался водород, поэтому он назвал это брожение *водородным*. Он показал, что метановое брожение можно затормозить

и перевести его на выделение водорода. Так, в результате нагревания или под влиянием других факторов происходят изменения условий и снижение ферментативной активности возбудителей процесса метанового брожения, при этом микроорганизмы продолжают существовать за счет неполного разложения органических веществ. Метанобразующие бактерии при этом не погибают, а лишь частично или временно утрачивают свою ферментативную активность. В дальнейшем, когда процесс становится интенсивным, водородное брожение затухает и происходит выделение метана.

Описание особенностей этих процессов, в зависимости от многих факторов и механизмов их протекания, нашло отражение во многих исследованиях. Отмечается [7,8], что водород является сопутствующим элементом во многих биохимических реакциях. В метаногенной технологии он выделяется на ацетогенной стадии брожения. Ацетогенные бактерии, которые составляют относительно небольшую группу, среди которых можно отметить *Methanobacillus omelianskii*, в процессе метаногенеза расщепляют спирты и жирные кислоты с образованием уксусной кислоты, водорода и углекислого газа:



Вместе с тем, было отмечено [9], что накопление водорода в составе биогаза, превышающее 1 %, ингибирует метаногенное брожение и выделение метана. Результатом быстрого аккумуляирования H_2 в биогазе объясняют, в частности, технологические сложности увеличения содержания в нем метана более чем на 70% [10,11]. Этим же объясняется относительно низкое содержание водорода в составе биогаза.

Однако преимущества биохимической водородной технологии делают необходимыми поиски новых путей преодоления трудностей, возникающих при получении водорода.

Стимулирующим фактором для развития этой технологии является дешевизна биохимических процессов по отношению к другим, наличие недорогого возобновляемого растительного сырья и производственных отходов и снижение зависимости от ископаемых видов топлива, а также получение энергоносителя с суммарным нулевым выбросом парниковых газов. Развитие биохимической водородной технологии связано также с необходимостью решения других смежных проблем, таких как необходимость увеличения содержания водорода в составе биогаза, интенсификации процесса выделения водорода и определения путей управления этим процессом, оптимизации конструкций биореакторов, создания эффективных и недорогих систем очистки биоводорода, безопасных систем его хранения и распределения, а также совершенствования топливных элементов. Имеется ряд сообщений об успехах в этой области [9], однако, несмотря на высокую перспективность этой технологии, в настоящее время производство биоводорода не вышло за пределы опытных (пилотных) установок, а технология требует дальнейшего развития и совершенствования [12].

Наши предыдущие исследования по влиянию природных биологически активных веществ на процессы биогазовой технологии при анаэробном сбраживании биомассы [13] выявили новый подход к решению этих проблем. Так, некоторые из исследованных нами соединений изопреноидной природы (сквален, бетулинол и другие) позволили увеличить в 2-3 раза производительность процессов анаэробного сбраживания и содержание метана до 90 % и более в составе биогаза, что является существенным. В то же время некоторые соединения этого класса, в зависимости от их молекулярного строения и функциональных групп, наоборот, ингибировали метаногенный процесс, направляя его в сторону водородного брожения и выделения биоводорода [14]. Перспективность этого направления предопределила постановку специальных исследований.

Материалы и методы исследований

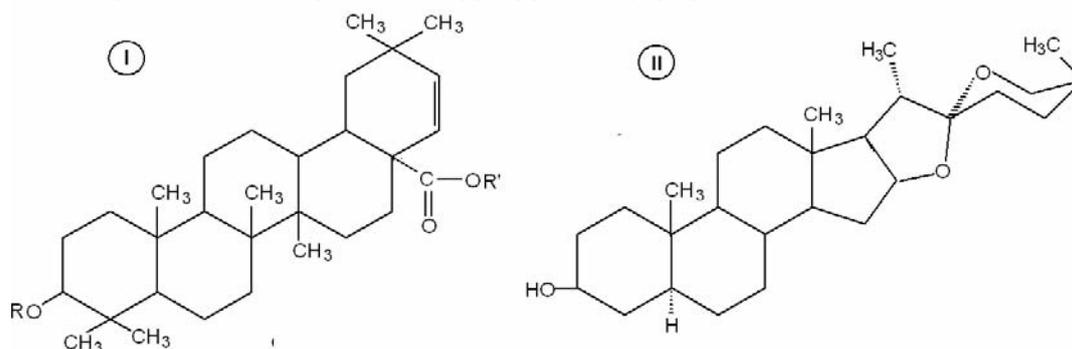
Изучение влияния биологически активных веществ на процесс метаногенеза проводили на специально разработанной установке, описанной нами в [13]. Для исследований была взята послеспиртовая барда от переработки некондиционного зерна следующего химического состава [14], в %:

Растительные вещества	0,51 ÷ 0,53
Фурфурол и оксиметилфурфурол	0,0645 ÷ 0,067
Органические кислоты, включая левулиновую кислоту	0,932 ÷ 1,071
Абсолютно сухие вещества	1,46 ÷ 1,49

Моносахариды, арабиноза, ксилоза	0,856±0,071
Альдегиды	0,3 ÷ 0,5
ХПК (химическое потребление кислорода), мг/дм ³	22333 ÷ 23040
БПК (биологическое потребление кислорода), мг/дм ³	18300 ÷ 19233

Влияние биологически активных веществ (БАВ) на биохимический процесс оценивалось по изменению скорости выделения биогаза и содержанию в нем водорода. Исследовалось их влияние на стимулирование микробиологической активности для ускорения биохимических процессов и повышения выхода биогаза, а также их селективное действие для управления процессом выделения биогаза. БАВ выбирали из числа природных соединений растительного происхождения, с учетом их биологической активности, простоты экстракционного выделения и доступности сырья. В качестве *стимулирующих микродобавок* из класса биологически активных растительных веществ использовали соединения изопреноидной структуры. Их достоинством является возможность ввода микроколичеств в пределах $10^{-3} \dots 10^{-5}$ масс.% в состав обрабатываемой биомассы. При этом, процесс селективного получения молекулярного водорода проводили при pH = 7,2 -7,5 в мезофильных условиях при 33 ± 2 °C, при перемешивании биомассы и непрерывном отводе водорода из биореактора.

Для исследования были взяты природные соединения [15]: гипсогенин (или гликозиды гипсогенина, где R и R' – H, или углеводные функциональные группы) (I), и сапонин неотигогенина – стероид C₂₇-спиростанового ряда (II) со следующими структурными формулами, соответственно:



Гипсогенин является белым и слабо-жёлтым порошкообразным веществом, состоящим из смеси тритерпеновых гликозидов корней растений (ботанических видов) рода *Gypsophila*. Обладает многими физиологическими свойствами и применяется в медицине. Сапонин содержится во многих видах растений рода *Jussiaea*, имеющих ареал распространения в субтропических и тропических зонах и культивируемых во всех частях земли, к примеру – в томатах, и извлекается экстракцией. Из растительного сырья гипсозид выделяется экстракцией водно-спиртовой смесью.

Состав образующегося биогаза определяли газохроматографическим методом на анализаторе марки «Газохром-3101» в аналитической лаборатории Экологического Агентства Минэкологии Молдовы*.

Результаты исследований и их обсуждение

Кинетика начальных стадий процесса анаэробного сбраживания барды. Исследование процесса анаэробного брожения исходной барды в отсутствие биологически активных веществ (БАВ) свидетельствует о достаточно сложном сочетании различных биохимических редокс-процессов.

Как свидетельствуют данные (рис.1), полученные на основе газохроматографических исследований количественного состава выделяющегося биогаза, кинетика биохимического процесса в отсутствие БАВ после его инокуляции характеризуется первоначальным выделением водорода, содержание которого в выделяющемся биогазе постепенно возрастает до максимума 7-10% через 4-6 суток, остальное составляет CO₂.

Затем количество биоводорода начинает снижаться, и в составе биогаза появляется угарный газ (CO), содержание которого на 9-11 сутки процесса также проходит через максимум (около 7%). И только на третьей стадии процесса (через 10-12 суток), по мере снижения содержания H₂ и CO, в составе биогаза появляется метан, количество которого в газе постепенно возрастает и через 16-20

* Авторы выражают благодарность инж. И. Драгуцану за проведение анализов биогаза.

суток стабилизируется на уровне 62-65%. При этом биологически потребляемый кислород (БПК) обрабатываемой среды снижается в биореакторах с 23200 мгО₂/л до 2500-2800 мгО₂/л.

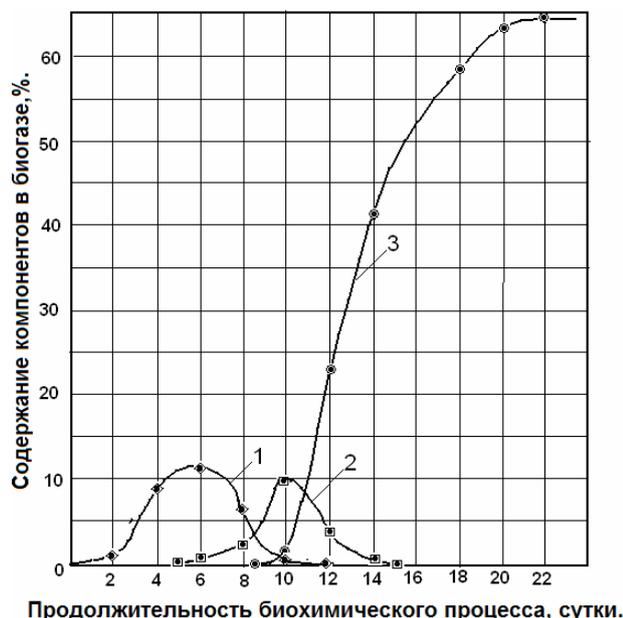
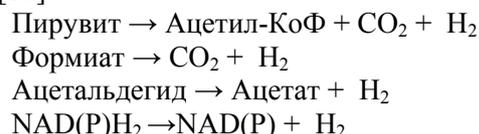


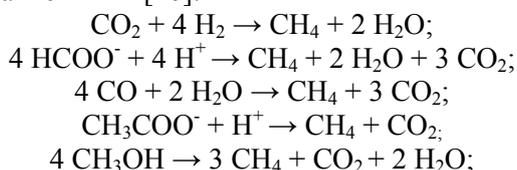
Рис.1. Изменение состава выделяющегося водорода (крив.1), монооксида углерода (кривая 2) и метана (крив.3) в составе биогаза с течением времени анаэробного сбраживания исходной зерновой барды спиртового производства.

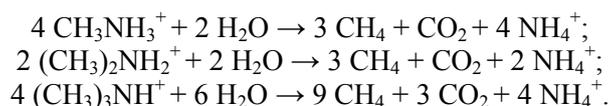
Эти процессы, протекающие в анаэробных условиях на первоначальной ацетогенной стадии биохимических реакций, можно связать с образованием промежуточных продуктов брожения – пирувата, формиата, ацетальдегида и восстановленного никотинамидадениндинуклеотидфосфатов (NAD(P)H₂). В результате, консорциум микроорганизмов способен при брожении восстанавливать протоны, избавляясь от избытка восстановителя. В результате происходит выделение водорода (H₂) и CO₂ согласно схемам [16]:



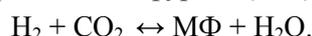
При этом выделение водорода катализируется одновременно двумя ферментами: гидрогеназой и специфической СО-гидрогеназой. В связи с этим, в отсутствие конечного акцептора электронов (кислорода, нитратов и нитритов и др.), начинает выделяться угарный газ (СО). Для протекания этих реакций анаэробного брожения консорциум бактерий использует органические соединения. Среди их представителей найдено 25% родов бактерий, таких как *Escherichia coli*, а также патогенные для человека бактерии *Salmonella*, представленных в определителе бактерий Берги. Наряду с выделением водорода часть высвобожденной энергии, выделяющейся в процессах брожения органического вещества, расходуется на образование других побочных продуктов, среди которых уксусная кислота, обуславливающая некоторое смещение рН среды в кислую сторону.

Затем, по мере развития биохимического процесса происходит метаногенная трансформация CO₂ и водорода с другими промежуточными соединениями с выделением метана, выход которого становится превалирующим. В процессах метанообразования бактерии используют ограниченное количество субстратов, среди которых самым важным является ацетат (до 75 %), а также углекислый газ, формиат, метанол, метиламины, окись углерода. Протекающие биохимические процессы могут быть представлены следующими уравнениями [16]:





Другие углеродные соединения процесс роста метаногенных бактерий не поддерживают. При этом до 90-95% используемого углерода они трансформируют в метан, остальная часть расходуется на рост биомассы. Согласно данным изотопного анализа, было установлено, что при восстановлении CO_2 принимает участие его молекулярная форма, а не карбонат-ионы, а водород для образования молекул метана микроорганизмы получают из воды. Первичной стадией этого процесса является их взаимодействие, стимулированное бактериями *Mb.Termoautotrophicum*, с образованием промежуточных соединений – метанофурана и формилметанофурана (МФ):



Под влиянием большого количества метаногенов CO_2 восстанавливается до CH_4 , при этом расход биомассы варьирует от 1,6 до 2,7 г сухого веса на 1 моль CH_4 для организмов, которые растут только на H_2 и CO_2 . Другие микроорганизмы, такие как *Mb.formicicum* и *Ms.barkeri*, дают более высокий выход метана, составляющий 3,5 и 6,4-8,7 г/моль, соответственно.

Термодинамически эти реакции протекают более эффективно при удалении водорода, осуществляемом метаногенными бактериями. Значения парциального давления водорода, выше которого деятельность ацетогенных микроорганизмов прекращается, находятся (для разных соединений) в пределах от $9,10^{-5}$ атм до 0,15 атм. Таким образом, низкое парциальное давление водорода является необходимой предпосылкой для оптимального функционирования анаэробных микробных систем и конверсии ацетата в метан. Одной из причин этого является то, что водород ингибирует рост чистых культур метаногенов, использующих ацетат, так как ацетокластическая реакция является менее энергетически выгодной, чем восстановление CO_2 водородом.

Влияния биологически активных веществ на выделение биоводорода Учитывая характер влияния БАВ на дегидрогеназную активность, проведены исследования процессов в присутствии добавок, ингибирующих метаногенез и стимулирующих биохимическое выделение биоводорода. Эти процессы представляют практическую важность для развития биоводородной энергетики [17, 18].

Как следует из полученных экспериментальных данных (рис.2), в присутствии добавок гипсозида и спиростана содержание водорода в течение первых 10 суток нарастало и достигло значений 67,8 и 40,2% для гипсозида и спиростана соответственно.



Рис.2. Изменение содержания водорода в составе биогаза в присутствии БАВ, $5 \cdot 10^{-3}$ масс.%.
1 – гипсозид; 2 – спиростан.

Следует отметить, что, в отличие от данных по исследованию кинетики процесса в отсутствие БАВ, выделение водорода не приводит к большому снижению БПК: значение БПК в этих условиях за 24 суток изменилось с 23200 мг O_2 /л лишь до 19500 мг O_2 /л. Оценка баланса количества выделенного водорода и элементов органических соединений в биомассе явно свидетельствует в пользу того, что отщепление водорода происходит не столько вследствие их биохимического расщепления и минерализации органических веществ, а преимущественно с участием атомов водорода молекул воды в этом процессе.

Объяснение механизма действия таких биологически активных добавок с изопреноидной молекулярной структурой связано, по-видимому, с селективным ингибированием деятельности метаногенных бактерий, которые снижают активность дегидрогеназы. В связи с этим водород, который в отсутствие БАВ используется метаногенами для выделения метана, переориентируется на выделение в молекулярной форме.

Одна из основных биохимических реакций, связанных с выделением водорода в результате так называемой *шифт*-реакции (т.е. реакции конверсии), обусловлена протеканием в биохимических условиях взаимодействия СО с молекулами воды по уравнению: $\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2$. Микроорганизмы в данном случае используют эту реакцию для дополнительного получения энергии. По мере развития биохимического процесса, количество выделяющегося СО в составе биогаза сокращается, вплоть до его полного отсутствия, в результате его взаимодействия с молекулами воды, и начинает выделяться только водород.

Ингибирующая способность предложенных изопреноидных соединений в качестве стабилизаторов биоводородного процесса заключается, по-видимому, в сильной ненасыщенности их молекул, структура которых характеризуется наличием двойных связей: (до двух-трех в молекулах монотерпеноидов и до семи-восьми – в тетратерпеноидах (каратеноидах)). Другой особенностью является разнообразие циклических структур: от 1 цикла до 5-6 циклов в структуре их молекул в различных сочетаниях: сочлененных, конденсированных, трех-, пяти- и шестичленных циклов и гетероциклов, содержащих кислород.

Еще одной особенностью молекулярного строения изопреноидов является сочетание в одной и той же молекуле различных функциональных групп и структурных группировок, например в спирокетальной группировке – стероидных сапогенинов. Благодаря такому разнообразию химических структурных элементов, соединения предложенных нами биологически активных добавок из класса растительных веществ изопреноидной природы выполняют роль переносчиков кислорода и электронов в биохимических процессах, а также способствуют проявлению мембранотропной активности, способствующей изменению проницаемости мембран микроорганизмов и их электрического потенциала. В свою очередь, изменение проницаемости клеточных мембран приводит к нарушению гомеостаза клеток микроорганизмов, вследствие чего некоторые органеллы и ферменты утрачивают свои функции, которые в процессах метаногенного брожения приостанавливают функционирование гидрогеназ и ингибируют процесс метаногенеза, что приводит к переориентации процесса метанообразования на конверсию СО и H_2O для выделения молекулярного биоводорода. При этом, только 20% биомассы используется в биоводородной технологии, остальное количество биоводорода выделяется из молекул воды по вышеприведенной *шифт*-реакции.

Вследствие этого, основным источником получаемого молекулярного биоводорода является вода, так как до 80% энергии биомассы не используется в этом процессе. Поэтому целесообразно проводить биохимический процесс в две стадии: на первой стадии осуществлять стабилизированный процесс получения биоводорода, поддерживая концентрацию стимулирующих микродобавок на оптимальном уровне, а на второй стадии процесса, для более полного использования энергии биомассы, переключить работу биореактора на метаногенный биохимический процесс для получения биометана по известной технологии, и этот процесс проводить в отдельном биореакторе.

Таким образом, вводимые в биомассу барды в процессе ее анаэробного сбраживания биологически активные добавки из класса растительных веществ изопреноидной природы избирательно снижают активность дегидрогеназы, ингибируют работу метаногенных микроорганизмов и предотвращают развитие метаногенного процесса ферментации. В этих условиях процесс ферментации избирательно переключается на реакции, связанные с биохимическим взаимодействием первоначально образующегося СО с молекулами воды по схеме: $\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2 + \text{CO}_2$, а также и на другие реакции, которые обеспечивают преимущественное выделение биоводорода. При этом за счет торможения процессов метаногенеза практически происходит полное прекращение выделения метана. Источником получаемого водорода является главным образом вода и в меньшей степени – органический субстрат. В суммарном биохимическом процессе не используемый в этих условиях метаногенами водород выделяется в свободном молекулярном виде (H_2) в повышенных количествах. Более того, в этих условиях более активизируется часть консорциума микроорганизмов, ответственных за реакции биохимического выделения водорода, способствуя повышению общей эффективности этих процессов.

Таким образом, повышается производительность процесса биохимического получения молекулярного биоводорода и его выход в составе биогаза увеличивается почти до 70 %. Использование органического субстрата, содержащегося в составе барды ввиду дистилляции виноматериалов и спиртоперегонки, удешевляет процесс его биохимического получения. Стабилизация процесса выделения водорода в этом случае может быть достигнута поддержанием концентрации предложенных БАВ на заданном уровне.

Следует отметить, что выделяющийся в биореакторе молекулярный водород блокирует активность микроорганизмов, поэтому при разработке биореакторов необходимо предпринять соответствующие меры по интенсификации процессов массообмена и массопереноса и непрерывного отвода из реакторов повышенных количеств биоводорода.

Получаемый биоводород составляет 50-70% содержания его в биогазе, остальное – преимущественно CO_2 , может использоваться в своем исходном состоянии без специальной подготовки как эффективное энергетическое средство для получения тепловой и электрической энергии посредством промышленных когенерационных установок, либо как газовое топливо для автомобильного транспорта, а также в качестве сырьевой базы в химической промышленности. Получаемый биоводород, после его очистки от примесей других газов (CO_2 , CO , H_2S), можно также применять для энергетических топливных элементов.

Выводы

1. Изучены особенности кинетики ацетогенного и метаногенного процессов биохимического сбраживания послеспиртовой барды, выявлены условия формирования водорода до 7-10 об.% на первичной стадии, количество которого затем снижается и параллельно начинается выделение угарного газа (CO), с последующим развитием метаногенной стадии, результатом которой является взаимодействие H_2 и CO с выделением биометана до 62-65 об.%, при одновременном снижении на порядок значений ХПК и БПК.

2. Рассмотрен механизм процессов, связанных с образованием промежуточных продуктов, при которых консорциум микроорганизмов способен при брожении восстанавливать протоны, избавляясь от избытка восстановителя, в результате чего на первой стадии происходит выделение H_2 и CO_2 .

3. Обнаружено, что при введении микроколичеств изопреноидных соединений, структура которых характеризуется ненасыщенностью их молекул и наличием в их молекулах двойных связей, стабилизирует биоводородный процесс, в результате чего содержание молекулярного водорода в течение первых 10 суток достигает значений 67,8 и 40,2% для гипсозида и спиростана, соответственно. В этих условиях метаногенный процесс ингибируется и выделение метана не происходит. На основе структурных характеристик стимулирующих БАВ и их ингибирующего воздействия на метаногенные микроорганизмы, предложен механизм стабилизации процесса биоводородной технологии.

4. Установлено, что только 20% биомассы используется в биоводородной технологии, остальное количество биоводорода в биохимических условиях выделяется из молекул воды за счет взаимодействия CO с молекулами воды по *шифт*-реакции: $\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2$, при этом до 80 % биомассы в этом процессе не участвует. В связи с этим, предложено проведение биохимического процесса сбраживания барды в две стадии, на первой стадии которого в отдельном биореакторе осуществлять стабилизированный процесс получения биоводорода, а для более полного использования энергии биомассы на второй стадии, проводимой в следующем биореакторе, переключить его работу на метаногенный биохимический процесс для получения биометана, что обеспечивает более высокую эффективность этого процесса.

Настоящая работа выполнена при финансовой поддержке Фонда STCU # 5393 и Государственной Программы по науке и инновациям 11.820.08.93.STCU.A/5393 "Combined Bioreactor with Useful Products and High Efficiency of Biomethane as Alternative Energy Source".

Литература:

1. Das D, Veziroglu T.N. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature // International Journal of Hydrogen Energy, vol.26, Issue 1, 2001, p.13-28.
2. Ковалев В.В., Унгурияну Д.В., Ковалева О.В. Теоретические и практические аспекты совершенствования процессов биогазовой технологии // Проблемы региональной энергетики, 2012, №1.
3. INTERNET: WO 2009-101528 din 2009.08.20 Method for ecologising food industry technologies and a system for carrying out said method.
4. Ковалев В.В., Ковалева О.В., Дука Г.Г., Иванов М.В. Совершенствование электрохимических процессов для водородной энергетики // Проблемы региональной энергетики, 2011, №1, с.3-15.
5. Шлегель Г. Общая микробиология / Пер. с нем. – Москва: Мир, 1987, с.194-197.
6. Никитин Г.А. Метановое брожение в биотехнологии. - Киев: Выща школа, 1990, с.15-16.
7. Добрынина О.М., Калинина Е.В. Технологические аспекты получения биогаза // Вестник Пермского государственного технического университета: Охрана окружающей среды, транспорт, безопасность жизнедеятельности, 2010, №2, с. 33-40.
8. Корзникова М.В., Блохин А.Ю., Козлов Ю.П. Оценка степени конверсии органического вещества отходов животноводства и птицеводства в биогаз (на примере РФ) // Вестник ВГУ. Серия: химия, биология, фармацевтика, 2008, №2, с.108-111.
9. Шеина О.А., Сысоев В.А. Биохимия процесса производства биогаза как альтернативного источника энергии // Вестник ТГУ, 2009, т.14, вып.1, с. 73-76.
10. Speece R.E. Anaerobic Biotechnology. - Tennessee: Published by Archae Press, USA, 1996. -393p.
11. Heckey R.F., Vanderwielen J. and Switzenbaum M.S. The Effect of Organic Toxicants on Methane Production and Hidrogen Gas levels Duing tht Anaerobic Digestion of Waste Activated Sludge // Wat.Res., vol.21, 1987, p.1417.
12. Марков С.А. Биоводород: Возможное использование водорослей и бактерий для получения молекулярного водорода // Sc.J. for Alternative Energy and Ecology, 2007, no.1(45), p.30-35.
13. Стимулирование процессов метаногенного брожения жидких органических отходов / Ковалев В.В., Ненно В.Э., Бобейка В.А., Сеньковская И.А., Ковалева О.В., Унгурияну Д.В. // Studia Universitatis, Seria: Științe reale și ale naturii, 2012, no1(51).
14. ИНТЕРНЕТ: badus.ru/...etilovogo.../ximicheskiie-sostav-poslespirtovoie-bardi.htm
15. Cerere pentru brevetarea MD №2012-0010 din 23.01.2012. Procedeu pentru obținere anaerobă a hidrogenului molecular din biomasa. Autorii: V.Covaliov, V.Bobeica, O.Covaliova, V.Nenno, Gh.Duca, D.Ungureanu.
16. Калюжный С.В., Пузанков А.Г., Варфоломеев С.Д. Биогаз: Проблемы и решения // Биотехнология, 1988, т.21, М: ВИНТИ. - 190 с.
17. Цыганков Ф.Ф. Получение водорода биологическим путем // Ж. Рос. Хим. об-ва им. Д.И.Менделеева, 2006, т.L, №6, с.26-33.
18. Percival Zhang Y.-H., Evans B.R., Mielenz J.R., Horkins R.C., Adams M.W.W.. High-Yield Hidrogen Production from Starch and Water by a Syntetic Enzymatic Pathway// Internet: www.plosone.org/article/fetRArticle.ction?article URI=info:doi/101371/journal.pone.0000456.

Prezentat la 07.03.2012

СТИМУЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ МЕТАНОГЕННОГО БРОЖЕНИЯ ЖИДКИХ ОРГАНИЧЕСКИХ ОТХОДОВ

**В.В. КОВАЛЕВ, В.Э. НЕННО, В.А. БОБЕЙКА, И.А. СЕНЬКОВСКАЯ,*
О.В. КОВАЛЕВА, Д.В. УНГУРЯНУ****

Научно-исследовательский центр прикладной и экологической химии Молдавского госуниверситета

**Институт почвоведения, агрохимии и защиты почвы им. Н.А. Димо*

***Технический университет Молдовы*

Se propune un concept nou tehnico-științific privind utilizarea deșeurilor de la producerea vinului și de la procesele de distilare. Sunt arătate rezultatele cercetărilor complexe privind efectul substanțelor biologic active asupra procesului de metanogeneză, microorganismelor și activitatea dehidrogenazică a deșeurilor industriale de distilare a vinului și alcoolului. S-a demonstrat că substanțele testate ridică de 3-4 ori eficacitatea fermentării, iar conținutul metanului în biogaz – de la 58-60% până la 90-95% – activează dehidrogenaza. Se discută efectul substanțelor biologic active asupra procesului de metanogeneză.

A new scientific-technological concept of the utilization of wastes wine and alcohol production is proposed. The results of complex research are given, related to the effect of biologically active substances on the process of methanogenesis, microorganisms and dehydrogenase activity of winery and alcohol industry wastes. It was shown that the test substances increase the efficiency of the fermentation by 3-4 times, the methane content in biogas from 58-60% to 90-95% and stimulate the dehydrogenase. The effect of biologically active substances on the process of methanogenesis is discussed.

Введение

Получение биогаза является важной частью общей концепции устойчивого развития, основанной на производстве высокоэнергетических топливных агентов – спиртов, масел, газов, прессованных брикетов из восстанавливаемого растительного сырья, с расчетом частичной замены и экономии невозобновляемых видов энергетических ресурсов – нефти, угля, природного газа.

Развитие технологий анаэробного сбраживания жидких и твердых отходов предприятий по переработке сельскохозяйственной продукции является одним из перспективных направлений в производстве биогаза из растительного сырья и органических отходов агропромышленного комплекса. Энергетическим материалом могут служить жидкие отходы винодельческого, спиртоперегонного, пивоваренного, дрожжевого и мясомолочного производств, твердые и жидкие отходы переработки различных видов зерновых культур, картофеля, сахарной свёклы, фруктов и овощей и др.

Биогaz – продукт анаэробного разложения органических веществ. Перечень органических субстратов, которые можно использовать для производства биогаза, является огромным по сравнению с перечнем тех, которые применяются в настоящее время. Установлено, что 86% биогазового потенциала содержится в сельскохозяйственном сырье и лишь 8% – в промышленных и коммунальных отходах [2, 4].

Подход, основанный на утилизации отходов с целью получения биогаза, имеет ряд неоспоримых преимуществ:

- существенное повышение степени переработки отходов сельскохозяйственного производства, более полная их утилизация;
- сокращение площадей сельскохозяйственных земель для выращивания растений, имеющих значение с точки зрения энергетики;
- значительное снижение содержания органических загрязнителей в сточных водах предприятий, уменьшение нагрузки на очистные сооружения и смягчение негативного техногенного воздействия на окружающую среду.

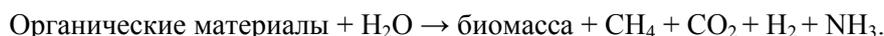
В настоящее время разработано и применяется достаточно большое количество технологий получения биогаза, основанных на использовании различных условий его производства: температурного режима, влажности, концентраций микробной биомассы, длительности протекания микробиологических процессов и так далее [9]. Однако существующие технологии и оборудование до сих пор не обеспечивали получение биогаза из отходов с максимально возможным выходом. Согласно техноло-

гическим параметрам, только 30-60% органических примесей в составе отходов подвергаются превращению в биогаз, а содержание метана в биогазе в большинстве случаев составляет не более 60-70%.

Решение проблемы повышения эффективности производства биогаза из отходов переработки сельскохозяйственной продукции должно быть основано на улучшении производственных параметров (снижения расходов, повышения КПД и др.), оборудования и технологических схем, а также на разработке и внедрении новых технологий с учетом экологической безопасности.

В биотехнологии получения биогаза из органических отходов *должны учитываться особенности метаногенеза*. Согласно современным представлениям, преобразование органических отходов в биогаз происходит в результате целого комплекса сложных биохимических превращений благодаря микроорганизмам [8, 11, 12] и в соответствии со схемой (рис. 1).

Суммарная реакция этого процесса может быть описана следующим образом:



Качество биогаза определяется в первую очередь содержанием метана. Двуокись углерода разбавляет биогаз и снижает его энергетические показатели. Кроме того, по балансовому расчету количество образующегося водорода является недостаточным для образования CH_4 . Поэтому актуальной является разработка биотехнологий по увеличению содержания метана в биогазе. Это может быть достигнуто селективной очисткой биогаза от сопутствующих газов (CO_2 , H_2S), оптимизацией технологии его получения путем ввода биологически активных соединений, способствующих развитию метаногенных бактерий.

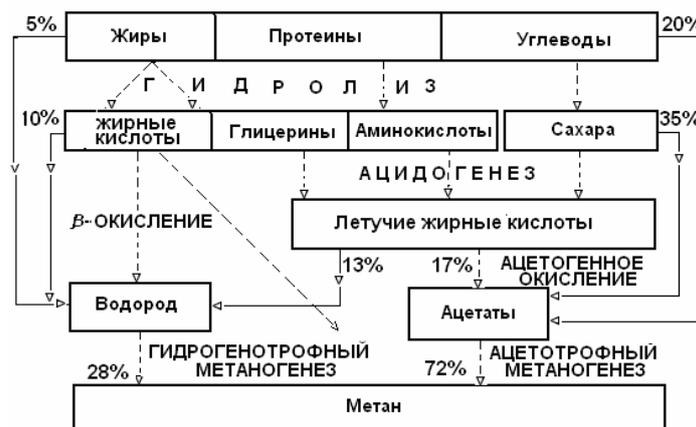


Рис.1. Пути метаболизма органических соединений при анаэробном брожении [4]

При введении биостимуляторов в биохимический процесс даже в незначительных количествах повышается скорость роста бактерий и интенсивность анаэробного сбраживания. Это приводит к снижению времени процесса, что, в свою очередь, может существенно снизить капитальные и эксплуатационные затраты. Получены хорошие результаты при использовании для этих целей «мелафена» – синтетического стимулятора развития растений, являющегося меламиновой солью бис(оксиметил)фосфиновой кислоты [1]. Для изучения процессов интенсификации метаногенеза нами выбрано направление по получению и испытанию в качестве биологически активных веществ (БАВ) природных изопреновых соединений с возрастающим количеством функциональных групп в молекуле.

Одним из путей совершенствования биохимической технологии для повышения выхода биометана является *разделение ацетогенного и метаногенного пространств в биореакторе*, с целью отделения выделяющегося CO_2 от других продуктов ацетогенной стадии процесса и его последующего смешивания в метаногенном пространстве с водородом.

Цель предпринятых исследований – интенсификация анаэробного сбраживания барды винного и спиртоперегонного производства при помощи природных биологически активных веществ для повышения выхода биогаза, содержания в нём метана и снижения энергоёмкости биохимического процесса.

Материалы и методы исследований

Изучение влияния биологически активных веществ на процесс метаногенеза проводили на специально разработанной установке, состоящей из 4-х биореакторов (рис.2).

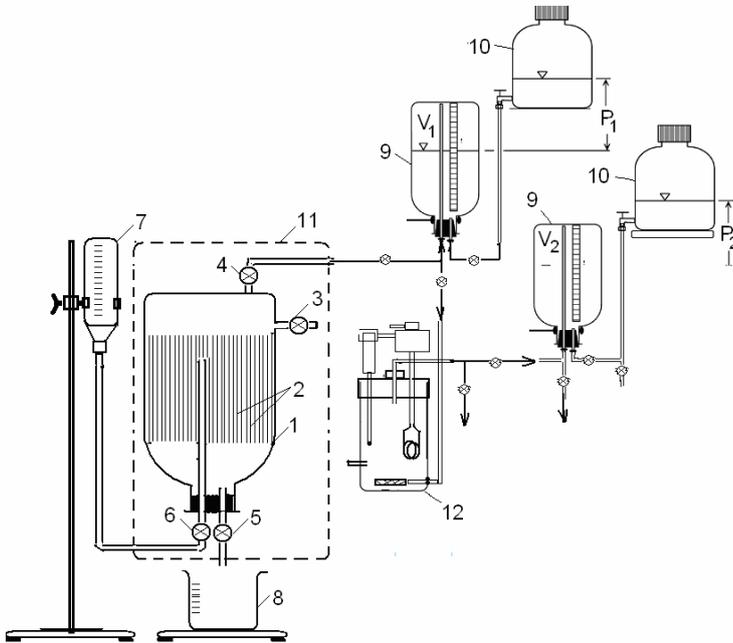


Рис. 2. Схема лабораторной установки для биохимического генерирования биогаза и его очистки от примесей: 1 – биореактор; 2 – загрузка для прикрепления микрофлоры; 3 - 6 – вентили; 7 – ёмкость питательного раствора; 8 – стакан; 9 – ёмкость с тарированным объёмом; 10 – ёмкости хранения воды; 11 – термостат; 12 – устройство для очистки биогаза

Общий объем каждого биореактора составляет 5000 см^3 , полезный объем – 3500 см^3 . Установка состоит из герметичного биореактора 1, размещённого в термостате, устройства вывода и контроля объёмов получаемого биогаза, образующегося осадка и очищенной жидкости. Такая установка позволяет одновременно изучать процесс очистки биогаза от примесей CO_2 и H_2S .

Биогаз, полученный в биореакторе 1, аккумулировался в тарированной ёмкости 9, вытесняя из неё воду в ёмкость 10. При этом контролировались параметры образующегося биогаза – объём (V_1) и давление (P_1), которое определялось по разности высот уровней воды. После накопления нужного для эксперимента объёма биогаза вентиль подачи биогаза 4 перекрывался. За счёт увеличения разности высот ёмкостей 9 и 10, в объёме 9 создавалось давление, необходимое для пропускания газа через устройство по его очистке 12. Поступающая из ёмкости хранения воды 10 жидкость вытесняла газ из тарированной ёмкости и с необходимым давлением и расходом направляла его в устройство для очистки газа. Газ, прошедший очистку, собирался в устройстве, состоящем из тарированной ёмкости 9 и ёмкости для хранения воды 10. На выходе из устройства по очистке биогаза также контролировались объём (V_2), давление (P_2) и температура газа.

Установка позволяет контролировать работу различных устройств по очистке биогаза, последовательно подключая их в схему.

Для создания дополнительной поверхности, способствующей иммобилизации микрофлоры, в биореакторы были помещены прутья виноградной лозы с общей поверхностью загрузки 8000 см^2 [13]. Эксперимент проводился в анаэробных условиях, при постоянной температуре $33,0 \pm 0,1^\circ \text{C}$.

Культивирование и адаптация анаэробной микрофлоры велась по известной методике путем инокуляции осадка сточных вод очистных сооружений г. Кишинева. В течение месяца в биореакторах наращивалась биомасса метаногенных микроорганизмов в контролируемых условиях процесса, при постоянном добавлении в них питательной смеси, содержащей сахар и молоко (3:1). Культивирование микрофлоры производилось периодическим циклическим введением субстрата. Индикаторами перехода от ацетогенной к метаногенной стадии в биореакторах было достижение значений $\text{pH}=7,4-7,6$ и стабильный объём выделяемого биогаза. Режим введения питательной смеси оставался

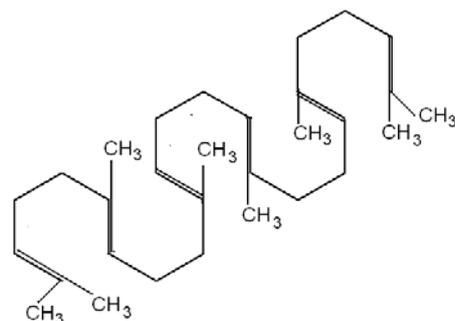
неизменным – рН в биореакторах поддерживался на уровне 7,4-7,6. Одновременно проводились замеры объема выделяемого газа и его состав. Одинаковые значения этого показателя в течение 5-7 суток свидетельствовали о завершении процесса выращивания микрофлоры в биореакторах.

Затем производилось постепенное замещение питательной смеси (порционно, на 25%) на барду спиртоперегонного завода «Бардар», образующуюся в результате перегонки виноматериалов на коньячный спирт. После каждого замещения выдерживалось время до получения стабильных показателей выхода газа. Один из биореакторов служил контролем. После проведения первой серии экспериментов биореакторы переводились на единую для всех питательную смесь, и после достижения стабильных показателей рН, объема и состава газа они были готовы к проведению следующей серии экспериментов.

Влияние БАВ на процесс метаногенеза оценивалось по изменению скорости выделения газа и содержания в нем метана. Измерения проводили с 10 до 54 ч с момента введения свежей барды. Показания снимали после 2-х циклов подкормки и последующих 3-х циклов подкормки. Общее время одного эксперимента составляло 300 часов.

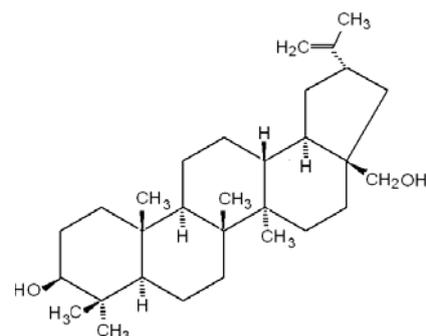
Биологически активные вещества. В качестве биологически активных веществ, которые, как предполагалось, будут стимулировать микробиологическую активность, ускорять процесс метаногенеза и повышать выход метана, испытывали *скавален* и *бетулинол* в различных концентрациях. БАВ отбирали с учетом их биологической активности, простоты синтеза или экстракционного выделения, а также доступности исходного сырья.

Скавален (2,6,10,15,19,23-гексаметилтетракоза-2,6,10,14,18,22-гексаен) получали из неомыляемой фракции масла амаранта при действии соляной кислоты путем его экстрагирования малополярными органическими растворителями – хлороформом, или ацетоном, или гексаном, или петролейным эфиром. Представляет собой углеводород тритерпенового ряда природного происхождения. Принадлежит к группе каротиноидов и содержится не только в составе семян амаранта, но и в семенах хлопка, льна и других. Содержание скавалена в семенах амаранта составляет 8-10%.



Бетулинол ($C_{30}H_{50}O_2$) – кристаллическое органическое вещество, содержащееся в берёзовом соке и дегте, заполняющее полости клеток пробковой ткани берёзовой коры, придавая белый цвет стволам березы. Он легко экстрагируется из бересты, содержащей тритерпеновые соединения, основным из которых является *бетулин*.

Бетулин не растворим в воде, но сравнительно хорошо растворяется в спирте. Обладает широким спектром биологического воздействия на микроорганизмы. Благодаря антиоксидантной, антигипоксантной и антимуtagenной активности, он стабилизирует клеточные мембраны микроорганизмов, повышает их устойчивость к повреждению в условиях недостатка кислорода и одновременно с этим препятствует перекисному окислению липидов.



Тестирование БАВ с целью проверки их возможного активирующего (ингибирующего) действия на микроорганизмы проводили в эксперименте с использованием питательной среды с добавлением их в концентрациях $10^{-2} \dots 10^{-5}$ %. Тест-объектом служили аэробные бактерии барды спиртоперегонного производства (СП), отобранной из контрольного биореактора. Тестирование амаранта и бетулинола в аспекте их влияния на дегидрогеназную активность барды осуществляли в дополнительном эксперименте, в анаэробных условиях. БАВ применяли в концентрации 0,033%.

Химические показатели. Предварительно оценивали рН, влажность, содержание сухого вещества, содержание общего углерода в исходной барде стандартными методами. Показатели химического и биологического потребления кислорода (ХПК и БПК₅) регистрировали по стандартной методике, объем газа – волюмометрическим методом, состав биогаза – хроматографическим методом.

Микробиологические и энзиматические показатели. Микробную биомассу (МБ) в осадке сточных вод определяли регидратационным методом. Численность микроорганизмов (в том числе аэробных

гетеротрофных) определяли методом посева на твердые питательные среды [3, 5]. Метанобразующие бактерии в исходной барде определяли по методике Хангейта. CO₂-продуцирующую способность осадка оценивали методом титрования. Активность дегидрогеназы определяли колориметрическим методом [5].

Результаты исследований и их обсуждение

Характеристика барды спиртоперегонного производства и осадка сточных вод. Барда СП представляет собой жидкую суспензию желтоватого цвета с влажностью 91,3-91,6%, с незначительным содержанием сухого вещества – 8,4-8,8% и кислой реакцией среды (pH=5,4). Содержание общего углерода составляло 4,25% от сырой и 49,5% от сухой массы отходов (табл.1). Отходы характеризуются высокими показателями ХПК и БПК₅ – 28250 и 17800 мгО₂/л соответственно. Исходная барда содержала аэробную гетеротрофную микрофлору (табл.1). После нейтрализации и подщелачивания, такая барда использовалась как среда для культивирования метанобразующих бактерий.

Таблица 1

Химический и микробиологический состав исходной барды СП

Отходы	pH	Влажность, %	Сухое вещество, %	C, % от сырой массы	C, % от сухой массы	ХПК, мгО ₂ /л	БПК ₅ , мгО ₂ /л	Гетеротрофные бактерии, КОЕ·10 ⁶ /мл
Барда СП	5,4	91,25-91,59	8,41-8,75	4,25	49,5	28250	17800	7,39

*в таблицах КОЕ – колониеобразующие единицы

Микробиологические исследования осадков сточных вод показали, что они являются материалом со слабощелочной реакцией (pH=7,5), обладают высоким содержанием органического вещества (в среднем 21,3%). Это обуславливает высокую численность бактерий, CO₂-продуцирующую способность отходов и их дегидрогеназную активность (табл.2).

Таблица 2

Микробиологическая и биохимическая характеристика осадков сточных вод

МБ	Гетеротрофные бактерии	Nocardia	Актиномицеты	Метанобразующие бактерии	Грибы	CO ₂	Дегидрогеназная активность
мг С /г	КОЕ·10 ⁶ / г			КОЕ·10 ³ / г		мг/100г/24 ч	мг ТФФ/ 10 г /24ч
2,5	1286,8	249,3	22,8	350	5,4	1,91	11,8

Установлено, что осадки сточных вод являются биологически активными материалами, в микробном сообществе которых преобладают бактерии. Численность грибов незначительна. Содержание микробного углерода составляет 2,5 мг С/г осадка. Одна тонна отходов содержит в среднем 5,0 кг сухой микробной биомассы. Осадок сточных вод содержит метанобразующие бактерии в количестве 350 · 10³ КОЕ/ г.

Оптимизация условий анаэробного процесса. Скорость выделения биогаза находится в зависимости от длительности процесса и вида питательной смеси (рис.3). На начальном этапе происходит адаптация микробного сообщества к новым источникам питания, затем наблюдается интенсивное выделение газа и подкисление питательной жидкости в результате ацетогенной фазы брожения. В условиях кислой реакции среды (pH = 3,8 -5,0) выделение биогаза практически полностью подавляется и возникает вновь только при достижении значений pH >7,0. Скорость продуцирования газа резко нарастает в течение 10-15 часов и отражает экспоненциальную фазу роста микроорганизмов. В течение последующих 10-30 часов (при подпитывании смесью сахар + молоко) и 15-50 часов (при подпитывании бардой

СП) регистрируется стабилизация этого показателя. В течение последующих 20 часов происходит снижение выделения газа: резкое – при подпитывании смесью сахар + молоко и плавное – при подпитывании бардой СП. График зависимости скорости выделения биогаза от времени брожения совпадает с классической кривой роста бактерий в периодической культуре [10]. Следует отметить, что выделение газа при использовании смеси сахар + молоко в десятки раз превышает таковое при переводе анаэробного микробного сообщества на подпитывание бардой СП. Это свидетельствует о том, что органическое вещество отходов является для анаэробов более сложным для разложения субстратом.

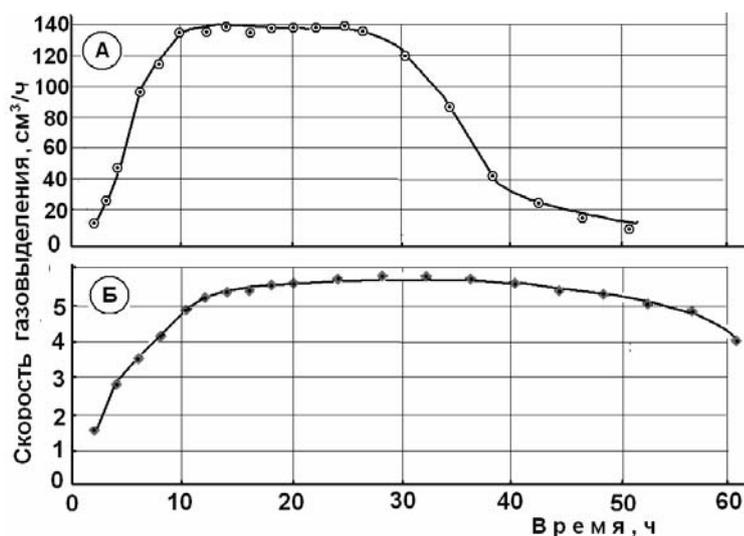


Рис.3. Изменение скорости выделения биогаза в зависимости от питательной смеси: А – смесь сахар+молоко; Б – барда спиртового производства

Влияние БАВ на процесс метаногенеза. Бетулин и сквален способствуют интенсификации процесса анаэробного сбраживания органического субстрата барды и как следствие – повышению общего выхода биогаза, а в ряде случаев – и содержания в нём метана. Экстракт амаранта (действующее вещество – сквален) в 3-4 раза повышает скорость выделения газа и производительность процесса метаногенеза. Использование бетулинола (действующее вещество – бетулин) не оказывает заметного влияния на скорость биохимического процесса, однако приводит к увеличению доли метана в составе биогаза с 65-70 % до 90-95%. В связи с этим представляло интерес изучить влияние смеси БАВ на метаногенный процесс. Применение добавок повышает в 2,5-3 раза скорость выделения биогаза (рис. 4, табл. 3). При этом содержание в нем метана увеличивается с 58-60% на контроле до 90-92% на вариантах с использованием смеси бетулинол + амарант. БАВ позволяют получать практически тот же объем биогаза, что и на контроле, только в 3,7 раза быстрее, при этом скорость выделения биогаза почти в 4 раза выше. Увеличение концентрации БАВ свыше 5,0 мг/л барды не сопровождается увеличением скорости продуцирования газа и усилением интенсивности метаногенеза, поэтому является нецелесообразным.

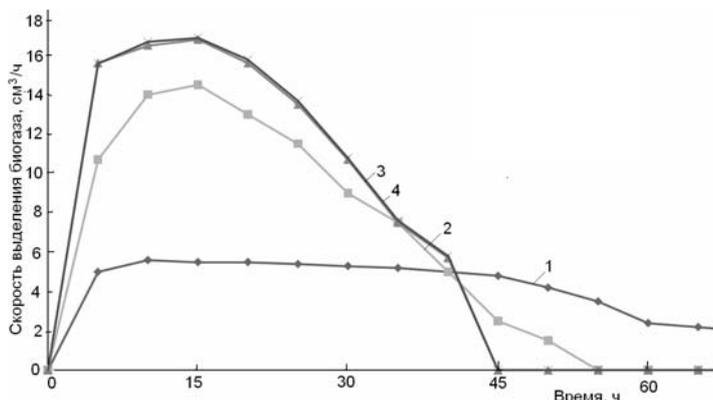


Рис.4. Скорость выделения биогаза в зависимости от концентрации БАВ (бетулинол + амарант в соотношении 1:1):
 1 – контроль;
 2 – 2,5 мг/л;
 3 – 5,0 мг/л;
 4 – 10,0 мг/л.

Таблица 3

Влияние смеси бетулинола и амаранта на объём и скорость выделения биогаза

Время, ч		Контроль		Концентрация добавок смеси бетулинола и амаранта в их соотношении 1 : 1, в вес. %					
				$2,5 \cdot 10^{-4}$		$5,0 \cdot 10^{-4}$		$1,0 \cdot 10^{-3}$	
с начала		объём, мл	скорость, мл/ч	объём, мл	скорость, мл/ч	объём, мл	скорость, мл/ч	объём, мл	скорость, мл/ч
0-18	18	90	5,6	250	13,9	325	19,1	300	16,7
19-25	7	40	5,5	75	10,7	75	10,7	100	14,3
26-45	20	100	5,5	50	2,5	0	0	0	0
46-69	24	110	5,0	0	0	0	0	0	0
70-93	24	75	3,1	0	0	0	0	0	0
ИТОГО		415	4,8	375	8,3	400	16,0	400	16,0

Необходимо отметить, что использование смеси бетулинол + амарант не только сокращает лаг-фазу и активирует быстрый рост микробного сообщества в биореакторах, но и существенно укорачивает стационарную фазу его развития. Это способствует ускорению протекания биохимических метаногенных процессов, повышению выхода биогаза и позволяет быстрее утилизировать отходы.

С практической точки зрения это обуславливает возможность сокращения капитальных и эксплуатационных расходов на строительство биореакторов и очистных сооружений в целом.

Влияние БАВ на микроорганизмы и дегидрогеназную активность. Известно, что на метанобразующие микроорганизмы стимулирующее влияние оказывают биомасса и экстракты различных видов растений – лаванды, золотарника, тысячелистника, ипомеи, амаранта [12, 13]. Предполагается, что БАВ способствуют интенсификация процесса анаэробного брожения органического субстрата благодаря их антиоксидантной, антигипоксантажной и антимутагенной биохимической активности. БАВ стабилизируют клеточные мембраны микроорганизмов, снижают перекисное окисление липидов и препятствуют повреждению клеточных мембран. Немаловажное значение имеет и тот факт, что белок листьев амаранта по своему аминокислотному составу близок к идеальному и обладает высокой пищевой ценностью. В литературе обсуждаются перспективы приготовления на основе амаранта питательных сред для выращивания микроорганизмов.

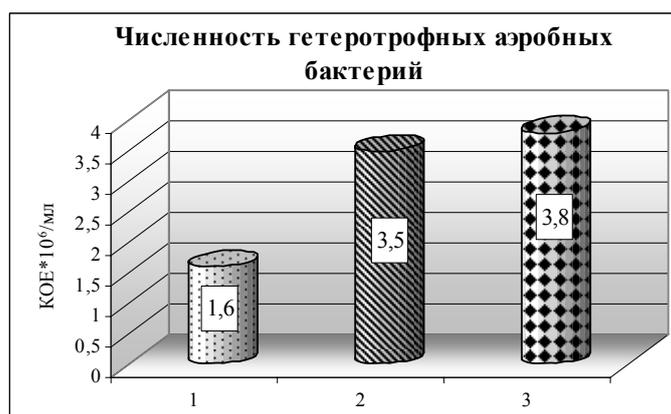


Рис.5. Стимулирование роста гетеротрофных аэробных бактерий в эксперименте с лабораторными биореакторами: 1 – контроль; 2 – амарант 0,0005%; 3 – бетулинол 0,0005%

Установлено, что амарант и бетулинол стимулируют в 2,2-2,4 раза рост и размножение гетеротрофных аэробных бактерий (рис. 5), что может активировать аэробную фазу переработки отходов и улучшить их подготовку к процессу метаногенеза. Эти результаты косвенно свидетельствуют о существовании механизма биологически активного действия этих веществ на микроорганизмы.

Механизм энергетических процессов метаногенов еще не расшифрован, но общие принципиальные положения установлены. Получение энергии, по крайней мере при окислении H_2 , сопряженном с восстановлением CO_2 , связано с функционированием электрон-транспортной системы, включающей дегидрогеназы, переносчиков электронов и редуктазы. В качестве дегидрогеназ идентифицированы гидрогеназа и формиатдегидрогеназа.

Тестирование 2-х видов БАВ продемонстрировало стимулирующее влияние амаранта и бетулинола в концентрации 0,033% на активность дегидрогеназы (рис. 6).

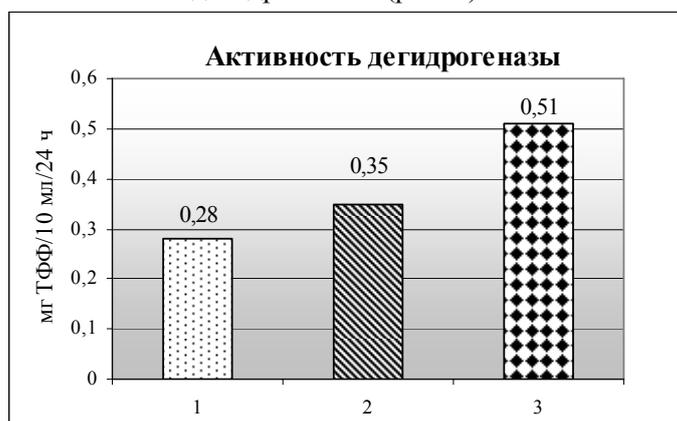


Рис.6. Влияние БАВ на активность дегидрогеназы в барде СП:
1 – контроль; 2 – амарант 0,033%; 3 – бетулинол 0,033%

Амарант активировал дегидрогеназы на 25%, бетулинол – в 1,8 раза. Эти БАВ признаны перспективными для их использования в качестве стимуляторов метаногенного процесса. Дальнейшие исследования предполагается проводить с расширением номенклатуры БАВ и разработкой оптимальных условий их применения.

Выводы

1. Решение проблемы утилизации жидких отходов винодельческой и спиртоперегонной промышленности возможно на основе разработки экологически обоснованных технологий их анаэробного сбраживания. Повышение эффективности производства биогаза с увеличенным содержанием в нем биометана из растительного сырья и отходов переработки сельскохозяйственной продукции может быть осуществлено посредством использования различных биологически активных веществ природного происхождения.

2. Барда спиртоперегонного производства представляет собой жидкую суспензию с влажностью 91,3-91,6%, незначительным содержанием сухого вещества – 8,4-8,8%, и с кислой реакцией среды (рН=5,4). Содержание общего углерода составляет 4,25% от сырой и 49,5% от сухой массы отходов. Отходы характеризуются высокими показателями ХПК и БПК₅ – 28250 и 17800 мгО₂/л соответственно. Барда содержит аэробную гетеротрофную микрофлору. После нейтрализации и подщелачивания она может быть использована как среда для культивирования метанобразующих бактерий.

3. Технология анаэробного сбраживания барды основана на нейтрализации кислой реакции среды отходов до рН=7,0-7,2 и использовании биологически активных веществ в качестве добавок, стимулирующих процесс метаногенеза.

4. Использование бетулинола и экстракта амаранта в их соотношении 1 : 1 и концентрации $5,0 \cdot 10^{-4} \dots 1,0 \cdot 10^{-3}$ вес. % является эффективным способом ускорения биохимических метаногенных процессов. Эти вещества повышают активность дегидрогеназы, сокращают лаг-фазу, активируют экспоненциальный рост микробного сообщества и существенно укорачивают стационарную фазу его развития. Применение смеси бетулинола и экстракта амаранта повышает выход биогаза в 2,5-3 раза, увеличивает содержание в нем метана с 58-60% до 90-92%, что позволяет более эффективно и быстро утилизировать отходы.

5. Бетулинол и экстракт амаранта обладают способностью стимулировать рост аэробных гетеротрофных бактерий, что может быть использовано в аэробной стадии утилизации жидких отходов

винодельческого и спиртоперегонного производства и для улучшения их подготовки к анаэробной стадии. Механизм биологического действия добавок на процесс метаногенеза и в целом на микроорганизмы обсуждается.

Литература:

1. Барский Е. Л., Шандиева И. О., Саванина Я. В. и др. Эффект мелафена на развитие культур цианобактерий и зеленых микроводорослей в стрессовых условиях // Вестник Московского государственного университета, 2011, №1, с.15-20.
2. Добрынина О.М., Калинина Е.В. Технологические аспекты получения биогаза // Вестник Пермского государственного технического университета: Охрана окружающей среды, транспорт, безопасность жизнедеятельности, 2010, №2, с.33-40.
3. Йожеф Сэги. Методы почвенной микробиологии. - Москва: Колос, 1983. - 295 с.
4. Корзникова М.В., Блохин А.Ю., Козлов Ю.П. Оценка степени конверсии органического вещества отходов животноводства и птицеводства в биогаз (на примере РФ) // Вестник ВГУ. Серия: химия, биология, фармация, 2008, №2, с.108-111.
5. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Д.Г.Звягинцева. - Москва: МГУ, 1991. - 224 с.
6. Миндубаев А.З., Минзанова С.Т., Скворцов Е.В. и др. Влияние фитомассы амаранта на кинетику метанового брожения // Материалы II Международной научно-практической конференции «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии» 15-16 сентября 2008 г. - Казань, 2008, с.85.
7. Миндубаев А.З., Минзанова С.Т., Скворцов Е.В. и др. Стимулирующее влияние сухой фитомассы амаранта *Amaranthus spulentus* на биометаногенез в трудноферментируемых субстратах. Тезисы докладов V Всероссийской научной конференции «Химия и технология растительных веществ», 2008, с. 206.
8. Хаммер М. Технология обработки природных и сточных вод / Перевод с англ., под ред. Т.А.Карюхиной. - Москва, 1979. - 400 с.
9. Шеина О.А., Сысоев В.А. Биохимия процесса производства биогаза как альтернативного источника энергии // Вестник ТГУ, 2009, т.14, вып.1, с.73-76.
10. Шлегель Г. Общая микробиология / Пер. с нем. - Москва: Мир, 1987, с.194-197.
11. Яковлев С.В., Карюхина Т.А. Биохимические процессы в очистке сточных вод. - Москва, 1980. - 200 с.
12. Barker H.A. Biological formation of methane // Bacterial fermentations. - N.Y., 1956, p.1-95.
13. Covaliov V., Covaliova O., Ungureanu D. Procedeu de obținerea a încărcăturii volumice pentru fixarea microflorei și reactor anaerob cu utilizarea acestuia pentru epurarea biochimică a apelor uzate. Brevet de invenție Nr. 187Y. Publ. BOPI, 2010, nr.4.

Prezentat la 07.03.2012

STUDIUL INFLUENȚEI SUBSTANȚELOR SURFACTANTE ANIONICE ASUPRA PROCESULUI DE ÎNLĂTURARE A COLORANȚILOR DIN SOLUȚIILE MODEL LA TRATAREA LOR PRIN METODE FIZICO-CHIMICE

Vera MATVEEVICI, Maria GONȚA, Gheorghe DUCA, Larisa MOCANU

Catedra Chimie Industrială și Ecologică

It was studied process of elimination of direct red dye in the presence of anionic surfactant (sodium lauryl sulphate) of model solution, with their combined treatment with aluminium coagulant, catalytic oxidation with hydrogen peroxide and sorption of remain compounds from activated charcoal by depending of concentration of aluminium ions, dye, surfactant and time of catalytic oxidation.

It was obtained that direct dye can be eliminated from model solution with initial concentration of dye from 50 to 200 mg/l in presence of anionic surfactant (only to 40 mg/l) by applying of combined methods of coagulation with aluminium coagulant and adsorption from activated charcoal. Consumption of coagulant in presence of surfactant rise from 2-3 times compared with removal of dyes in absence of surfactant. It was found that catalytic oxidation of direct dyes and anionic surfactants, molecules of surfactant degrade more difficult than dye molecules at the catalytic oxidation in presence of hydrogen peroxide, catalysed by Fe (II), and concentration of remain organic compounds can be reduced only on adsorption by activated charcoal. Cleaning concentrated solution, that contain direct dye and anionic surfactant with 200 mg/l and 60 mg/l concentration, can be realized only with combination of coagulation, catalytic oxidation and adsorption with activated charcoal methods.

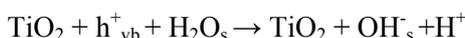
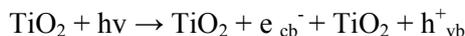
Introducere

Întreprinderile și fabricile textile folosesc o cantitate mare de apă naturală în procesul tehnologic, pe care apoi o evacuează în sistemul de canalizare. Volumul mare de ape reziduale, care se formează în rezultatul activității industriale, este parțial epurat, iar restul este deversat direct în sistemul de canalizare, care apoi ajunge la stația de epurare biologică orășenească, unde compușii organici nebiodegradabili practic nu se degradează și nimeresc în bazinele acvatice. Acestea prezintă un pericol destul de mare pentru viețuitoarele acvatice. Principalii poluanți ai apelor reziduale textile sunt surfactanții și diferiți coloranți textili, precum și o serie de compuși auxiliari textili (alcooli, polialcooli, fenoli, aldehide, stabilizatori, fixatori, dispersatori etc.), aplicați în procesul tehnologic de vopsire a țesăturilor de diferită natură.

Surfactanții sunt substanțe nebiodegradabile și, pătrunzând în bazinele acvatice, duc la diferite dereglări ale procesului de autopurificare a apelor, fiind toxice pentru vietățile acvatice. Concentrația surfactanților în apele reziduale textile este de 40-60 mg/l, iar concentrația coloranților variază de la 50 mg/l până la 200-250 mg/l, în dependență de procesul tehnologic. Concentrația minimă a surfactanților în apele tratate și în cele naturale, folosite pentru industria piscicolă, trebuie să fie de 0,5 mg/l pentru surfactanții anionici și de 0,05 mg/l pentru surfactanții neionogeni [1,2]. Atât surfactanții, cât și coloranții sunt substanțe stabile din punct de vedere biochimic și în procesul tratării biochimice se oxidează foarte greu.

Pentru înlăturarea surfactanților din apele reziduale se aplică diferite metode fizico-chimice, chimice și biochimice. Metoda de coagulare se aplică cu succes pentru înlăturarea concomitentă a coloranților și surfactanților la etapa de pretratare a soluțiilor, care duce la o concentrare a componentelor organici pe suprafața coagulantului de aluminiu [3]. Efectul înlăturării depinde de concentrația colorantului și a surfactantului, deoarece în soluții mai concentrate, când se atinge concentrația critică de formare a micelilor, se formează micelile mixte dintre colorant și surfactant, care duc la dispersarea particulelor asociate de colorant. La a doua etapă de tratare se aplică metoda de concentrare a compușilor organici remanenți prin metoda de ultrafiltrare [4]. Metoda de ultrafiltrare este aplicată pentru înlăturarea concomitentă a coloranților activi și a surfactanților anionici și cationici. În prezența surfactanților cationici se micșorează impermeabilitatea membranelor, respectiv se micșorează reținerea colorantului și a surfactantului [5]. În ultimul timp se aplică metodele de oxidare avansată, care duc la degradarea compușilor organici în compuși mai simpli sau la oxidarea lor până la compuși anorganici, ca dioxidul de carbon și apă. Surfactanții anionici sunt degradați cu ajutorul radicalilor OH*, care se obțin fotocatalitic cu ajutorul electrozilor nanoporoși de Ti/TiO₂ [6]. Timpul de iradiere cu

razele UV este de 90 minute. În rezultatul oxidării și mineralizării surfactanților anionici carbonul organic total se micșorează până la 94%, iar concentrația lui remanentă se încadrează în normele sanitare. Formarea particulelor active de radicali OH* are loc pe suprafața electrodului de titan, acoperit cu oxid al titanului, conform următoarelor reacții:



Surfactanții se oxidează și degradează cu participarea radicalilor OH*, care se formează și la descompunerea fotocatalitică a apei cu participarea oxidului de titan sub formă de particule mărunte. Gradul de degradare depinde de natura substituenților (grupa metil, etil etc.) de la atomul cuarternar de azot și de natura anionului exterior (clorură, bromură). Gradul de mineralizare a surfactanților ajunge până la 60-80% [7,8].

În literatura de specialitate sunt indicate și descrise metodele de adsorbție a surfactanților de către cărbunii activi sau alți adsorbenți naturali și sintetici. Înlăturarea surfactanților până la normele sanitare se realizează prin aplicarea metodelor combinate, care constau în concentrarea surfactanților prin metodele de extracție – flotare cu degradarea lor la a doua fază de tratare [9].

Însă, cu mult mai greu se înlătură surfactanții din apele reziduale textile, unde ei sunt împreună cu coloranții textili, fiind stabiliți de alte substanțe auxiliare textile, care se aplică în procesul tehnologic de vopsire a diferitelor țesături. Pentru aceste ape reziduale aplicarea metodelor de adsorbție cu ajutorul cărbunilor activi este limitată din motivul că numai în jur de 2-4% de surfactanți și coloranți sunt înlăturați, deoarece o parte mare din microporii și mezoporii cărbunilor activi nu sunt accesibili pentru particulele asociate ale acestor poluanți organici. De aceea, la prima etapă de tratare a apelor reziduale textile de poluanții organici menționați se aplică metoda de coagulare cu ajutorul sărurilor de fier sau aluminiu, care, prin dizolvarea lor în apa tratată, formează particule coloidale, în stare să neutralizeze și să sedimenteze surfactanții și coloranții. După cum a fost menționat anterior [10-11], coloranții se înlătură eficient cu ajutorul coagulanților de aluminiu la prima etapă de tratare a soluțiilor model. Mărirea eficacității de înlăturare a coloranților textili din soluțiile model s-a obținut la aplicarea combinată a metodelor de coagulare și oxidare catalitică cu peroxidul de hidrogen a coloranților textili [12]. De aceea, la etapa a doua de tratare a apelor reziduale textile se poate aplica procesul de adsorbție pe cărbunii activi sau oxidarea catalitică a poluanților organici remanenți (surfactanții și coloranții) după procesul de coagulare la prima etapă.

Prin urmare, procesul de tratare și epurare a apelor reziduale textile reprezintă o problemă complicată și complexă, care poate fi rezolvată numai prin combinarea eficientă a metodelor mecanice, chimice, fizico-chimice și biologice.

Cu acest scop a fost studiat procesul de înlăturare a coloranților textili în prezența surfactanților anionici la tratarea lor cu coagulantul de aluminiu, urmată de oxidarea catalitică cu peroxidul de hidrogen sau de adsorbția lor de către cărbunii activi în funcție de valoarea pH-ului, concentrația ionilor de aluminiu, colorantului roșu aprins direct (RAD), surfactantului anionic, peroxidului de hidrogen și de timpul oxidării catalitice.

Partea experimentală

Cercetările au fost efectuate după cum urmează: soluțiile model, care conțineau colorantul RAD cu concentrația de la 50 mg/l până la 200 mg/l și surfactantul anionic (lauril sulfat de natriu) cu concentrația de la 20 mg/l până la 60 mg/l, se tratau cu soluția de sulfat de aluminiu la diferite valori ale pH-ului și la diferite concentrații ale ionilor de aluminiu, se agitau și se lăsau o oră pentru coagulare și sedimentare. Apoi, soluțiile se filtrau și în ele se determina concentrația sumară a substanțelor organice remanente, după valoarea CCO-Cr, conform metodicii prezentate în [13].

Adsorbția compușilor organici remanenți după procesul de coagulare a soluțiilor model a fost efectuată cu ajutorul cărbunilor activi BAU în felul următor: la soluția filtrată cu volumul de 100 ml se adăugau 5 g de cărbune activ și după amestecarea lor timp de 60 minute se determina concentrația remanentă a compușilor organici prin determinarea valorii CCO-Cr.

Oxidarea catalitică cu peroxidul de hidrogen s-a efectuat după procesul de coagulare în felul următor: soluțiile filtrate se tratau cu peroxidul de hidrogen cu concentrația de la $1 \cdot 10^{-3}$ moli/l până la $3 \cdot 10^{-3}$ moli/l în

prezența ionilor de fier (II) cu concentrația de $3 \cdot 10^{-4}$ moli/l prin amestecarea permanentă timp de 10-60 minute la agitator magnetic. După ce procesul de oxidare lua sfârșit, în soluții se determina concentrația remanentă a substanțelor organice, la fel prin determinarea valorii CCO-Cr. În baza rezultatelor obținute s-a calculat efectul înlăturării și gradul de oxidare și de mineralizare a compușilor organici din soluțiile epurate.

Rezultate și discuții

În cercetările anterioare [10-12] s-a stabilit că coloranții direcți se pot înlătura din soluțiile model până la normele sanitare la tratarea lor combinată cu coagulantul de aluminiu și prin oxidarea lor ulterioară catalitică cu peroxidul de hidrogen, catalizat de ionii de fier (II). În aceste condiții, consumul specific de aluminiu se micșorează de 2,5-3,0 ori în comparație cu tratarea lor numai prin aplicarea coagulamentului de aluminiu.

Însă, apele reziduale textile conțin împreună cu coloranții și substanțe surfactante nebiodegradabile, care trebuie să fie înlăturate concomitent cu coloranții în procesul de epurare a lor.

De aceea, în prezenta lucrare a fost studiat procesul de diminuare a concentrației amestecului de colorant RAD și de surfactant anionic din soluțiile model la tratarea lor combinată cu coagulantul de aluminiu și la oxidarea compușilor organici remanenți de către peroxidul de hidrogen, care este catalizat de către ionii de fier (II). Soluțiile model, care conțineau colorantul RAD cu concentrația de 100 mg/l și de 200 mg/l și surfactantul anionic lauril sulfat de sodiu cu concentrația de 60 mg/l, au fost tratate cu sulfat de aluminiu la valoarea pH=6,5 la prima etapă de tratare, apoi soluțiile s-au filtrat și au fost supuse oxidării cu peroxidul de hidrogen în prezența ionilor de fier (II) timp de 10 minute. După finisarea procesului de oxidare în probele studiate s-a determinat concentrația remanentă a compușilor organici intermediari prin determinarea valorii CCO-Cr. Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 1.

Tabelul 1

Diminuarea gradului de oxidare și de mineralizare a compușilor organici remanenți după coagulare, la tratarea soluțiilor cu peroxid de hidrogen, în dependentă de concentrația ionilor de aluminiu

$$C(\text{Fe}^{2+})=3 \cdot 10^{-4} \text{ M}, C(\text{H}_2\text{O}_2)=3 \cdot 10^{-3} \text{ M}, C(\text{surf.})=60 \text{ mg/l.}$$

C(Al ³⁺), mg/l	C(RAD)= 100 mg/l; CCO ₀ =150 mgO/l			C(RAD)= 200 mg/l; CCO ₀ =240 mgO/l		
	CCO _{rem.} , după coag., mgO/l	CCO _{rem.} , după oxid., mgO/l	Gr.oxid., %	CCO _{rem.} , după coag., mgO/l	CCO _{rem.} , după oxid., mgO/l	Gr.oxid., %
5,4	18,75	7,75	56,7	82,00	12,50	84,5
10,8	11,87	7,37	37,9	57,50	12,50	78,3
16,2	25,00	5,75	79,0	21,90	12,63	42,3
21,6	25,00	5,25	79,0	21,20	12,14	42,7
27,0	20,00	5,25	73,7	13,70	13,70	0,0
32,4	20,00	4,00	80,0	11,20	11,20	0,0
37,8	15,63	4,00	79,4	13,10	13,12	0,0

Din datele prezentate în Tabelul 1 rezultă că în procesul de oxidare cu peroxid de hidrogen a compușilor organici remanenți după procesul de coagulare se micșorează concentrația compușilor organici până la normele sanitare în cazul concentrației colorantului RAD din soluțiile model de 100 mg/l, care se află în amestec cu surfactantul anionic de 60 mg/l, fiindcă și concentrația compușilor organici remanenți după valoarea CCO-Cr. nu este prea mare (în jur de 15-25 mgO/l). Prin aplicarea metodei combinate de tratare cu coagulantul de aluminiu și a oxidării catalitice cu peroxid de hidrogen, concentrația remanentă a compușilor organici intermediari se micșorează până la normele sanitare; se micșorează de 2 ori și consumul specific de aluminiu. Cu mărirea concentrației inițiale a colorantului RAD în soluțiile model până la 200 mg/l, epurarea soluțiilor are loc până la normele sanitare prin combinarea acestor metode. Însă, concentrația remanentă a compușilor organici după procesul de oxidare poate fi micșorată prin adsorbția lor suplimentară de către cărbunii activi și consumul specific de aluminiu, necesar pentru neutralizarea și coagularea particulelor asociate de colorant în prezența surfactantului anionic, se mărește de la 5,4 mg/l ioni de aluminiu până la 27,0 mg/l.

Prin urmare, prezența surfactantului anionic în soluțiile model, care conțin colorantul RAD, duce la mărirea consumului specific de aluminiu pentru epurarea acestor soluții și la micșorarea procesului de oxidare. Ca urmare, concentrația remanentă a compușilor intermediari poate fi micșorată până la normele în vigoare numai prin adsorbția lor suplimentară de către cărbunii activi. Aceasta se lămurește prin faptul că surfactantul anionic este destul de stabil și se oxidează optimal în primele 10 minute de tratare cu peroxid de hidrogen, iar concentrația remanentă a compușilor organici remanenți după valoarea CCO este de 18,75 mgO/l (Tab.2), care este cu mult mai mare decât limita admisibilă, prevăzută pentru apele epurate care pot fi deversate în bazinele acvatice.

Tabelul 2

Dependența gradului de oxidare și de mineralizare a surfactantului anionic lauril sulfat de sodiu de timpul oxidării catalitice la diferite concentrații ale peroxidului de hidrogen

$$C(\text{Fe}^{2+}) = 3 \cdot 10^{-4} \text{ M, pH} = 2,5, \text{CCO}_0 = 75 \text{ mgO/l.}$$

[H ₂ O ₂]= 1·10 ⁻³ mol/l			[H ₂ O ₂]= 3·10 ⁻³ mol/l		
t., min	CCO _{rem.} , mgO/l	Gr.oxid., %	t., min	CCO _{rem.} , mgO/l	Gr.oxid., %
10	20,0	73,3	10	20,0	73,3
20	18,75	75,0	20	18,75	75,0
40	18,75	75,0	40	18,75	75,0
60	18,75	75,0	60	18,75	75,0

Astfel, s-a obținut că și procesul de oxidare a amestecului de colorant RAD și de surfactant anionic din soluțiile model la tratarea lor cu peroxidul de hidrogen, catalizat de către ionii de fier (II), este mai puțin eficient în comparație cu oxidarea numai a moleculelor de colorant (Tab.3). Faptul se lămurește prin stabilitatea mai mare a radicalilor organici alifatici din compoziția moleculelor de surfactant față de moleculele de colorant, care conțin inele benzenice mai puțin stabile față de oxidanții chimici.

Tabelul 3

Dependența gradului de oxidare și de mineralizare a surfactantului anionic lauril sulfat de sodiu și a colorantului RAD de timpul oxidării catalitice

$$C(\text{Fe}^{2+}) = 3 \cdot 10^{-4} \text{ M, pH} = 2,5, \text{CCO}_0 = 75 \text{ mgO/l.}$$

Colorantul RAD. CCO ₀ =63,0 mgO/l			Colorantul RAD + surfactant. CCO ₀ = 135,0 mgO/l		
t., min.	CCO _{rem.} , mgO/l	Gr.oxid., %	t., min.	CCO _{rem.} , mgO/l	Gr. oxid., %
5	16,87	73,2	5	33,12	75,5
10	12,50	80,2	10	31,25	76,8
20	11,25	82,1	20	31,25	76,8
40	9,37	85,1	40	31,25	76,8
60	7,50	88,1	60	31,25	76,8

Prin urmare, dacă se oxidează cu peroxid de hidrogen amestecul de colorant RAD și surfactantul lauril sulfat de sodiu în prezența ionilor de fier (II), procesul de oxidare și de mineralizare pentru moleculele de colorant este mai eficient și gradul de mineralizare a compușilor organici intermediari este mai mare, ceea ce duce la micșorarea valorii totale a CCO, iar procesul de oxidare al moleculelor de surfactant este mai încetinit și mineralizarea compușilor intermediari este mai mică, ceea ce duce la mărirea valorii CCO- Cr. (Fig.1).

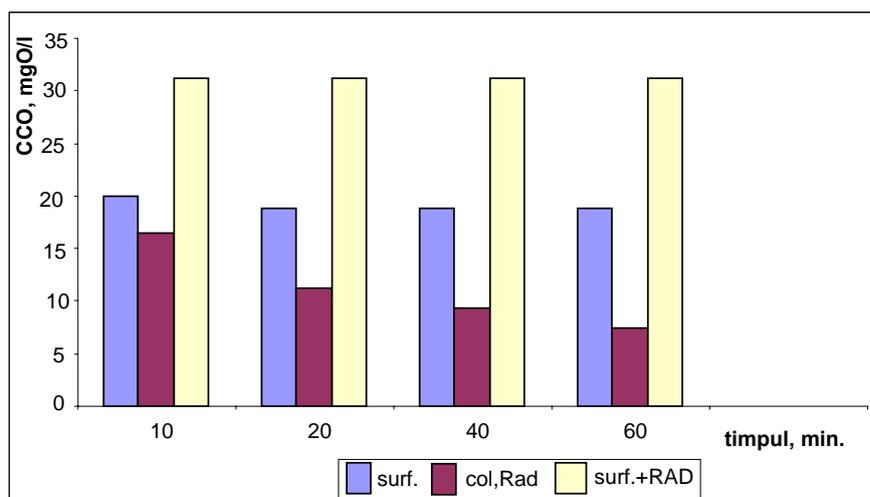


Fig.1. Dependența concentrației remanente a compușilor organici (surfactantului anionic și a colorantului RAD) de timpul oxidării catalitice cu peroxidul de hidrogen, catalizat de ionii de fier (II).

$$C(\text{surf.}) = 60,0 \text{ mg/l}, C(\text{RAD}) = 75,0 \text{ mg/l}, C(\text{H}_2\text{O}_2) = 3 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}.$$

De aceea, la finalizarea procesului de oxidare și mineralizare valoarea totală a CCO-Cr. este mai mare (în cazul tratării amestecului de colorant RAD și de surfactant anionic) decât limita admisibilă și aceste soluții se cer epurate în continuare prin metoda adsorbției cu ajutorul cărbunelui activ. Adică, etapa de oxidare catalitică este mai puțin eficientă în procesul de epurare a soluțiilor concomitent de coloranții direcți și surfactantul anionic și nu permite diminuarea concentrației compușilor organici remanenti până la normele admisibile, care permit evacuarea lor în bazinele acvatice.

Pentru a clarifica care din substanțele componente (colorantul RAD sau surfactantul anionic) rămâne în soluție după procesul de coagulare s-a măsurat densitatea optică a soluțiilor și s-a determinat concentrația colorantului RAD rămasă, în comparație cu valoarea sumară a CCO-Cr. Rezultatele obținute și cele calculate sunt prezentate în Tabelul 4 și în Figurile 2 și 3.

Tabelul 4

Dependența concentrației remanente a colorantului RAD de concentrația ionilor de aluminiu la tratarea soluțiilor model cu sulfat de aluminiu în lipsa și în prezența surfactantului anionic

$$C_{\text{col.}} = 200 \text{ mg/l}, C_{\text{surf.}} = 60 \text{ mg/l}, \text{pH} = 6,5.$$

Colorantul RAD; CCO = 160 mgO/l			Colorantul RAD+ surfactant; CCO= 240 mgO/l		
$C_{\text{Al}^{3+}}$, mg/l	$C_{\text{col.}}$, mg/l	$\text{CCO}_{\text{rem.}}$, după coag, mgO/l	$C_{\text{Al}^{3+}}$, mg/l	$C_{\text{col.}}$, mg/l	$\text{CCO}_{\text{rem.}}$, după coag, mgO/l
5,4	11,49	8,12	5,4	10,69	82,0
10,8	4,09	6,87	10,8	7,70	57,5
16,2	0,55	4,37	16,2	6,80	35,0
21,6	0,40	4,37	21,6	0,25	35,0
27,0	0,34	3,75	27,0	0,25	20,0
32,4	0,31	3,75	32,4	0,25	11,2
37,8	0,31	5,00	37,8	0,25	13,1

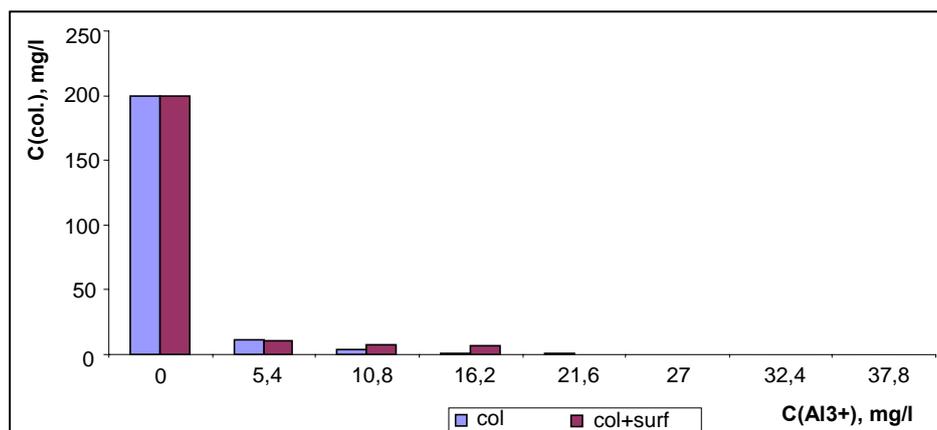


Fig.2. Decolorarea soluțiilor model, care conțin colorantul RAD de concentrația ionilor de aluminiu la tratarea lor cu sulfat de aluminiu în lipsa și în prezența surfactantului anionic. $C_{col.}=200$ mg/l, $C_{surf.}=60$ mg/l, pH=6,5.

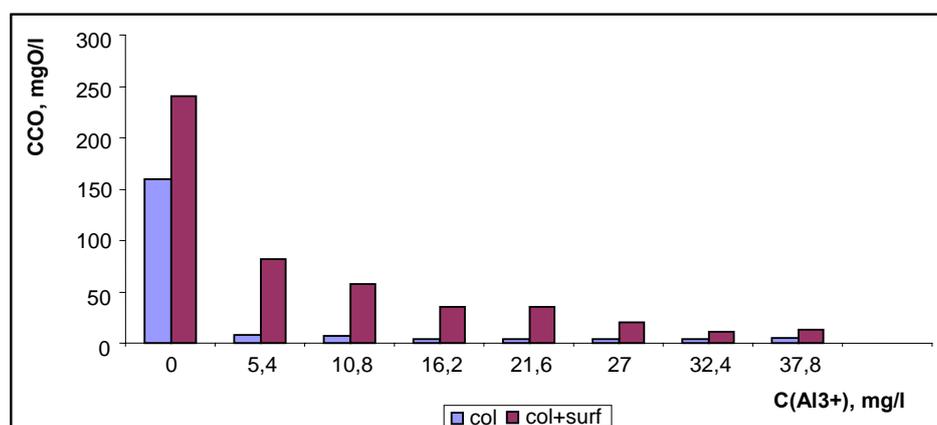


Fig.3. Dependența consumului chimic de oxigen al colorantului RAD și al surfactantului anionic de concentrația ionilor de aluminiu la tratarea soluțiilor model cu sulfat de aluminiu în lipsa și în prezența surfactantului anionic. $C_{col.}=200$ mg/l, $C_{surf.}=60$ mg/l, pH=6,5.

Din datele prezentate în Tabelul 4 și în Figurile 2 și 3 reiese că în rezultatul coagulării cu ajutorul sulfatului de aluminiu are loc diminuarea concentrației colorantului RAD în lipsa și în prezența surfactantului anionic și concentrația remanentă a colorantului în soluțiile epurate se micșorează până la normele sanitare în cazul înlăturării colorantului în lipsa surfactantului anionic, la adăugarea a 10,8-16,2 mg/l de ioni de aluminiu pentru concentrația inițială a colorantului RAD de 200 mg/l. Aceste soluții model epurate corespund normelor sanitare și după valoarea CCO-Cr. Pentru soluțiile, care conțin concomitent cu colorantul RAD și surfactantul anionic (concentrația colorantului RAD este aceeași, iar a surfactantului este de 60 mg/l), înlăturarea colorantului RAD are loc la un consum mai mare de coagulant de aluminiu (după concentrația remanentă a colorantului efectul diminării se observă la concentrația ionilor de aluminiu de 21,6 mg/l (Tab.4, Fig.2), iar după valoarea CCO-Cr. soluțiile model nu se epurează de substanțele organice până la normele sanitare, nici la valori mai mari de ioni de aluminiu ($C(Al^{3+}) = 32,4-37,8$ mg/l).

Aceste rezultate comparative indică la faptul că în rezultatul coagulării cu coagulant de aluminiu moleculele de colorant RAD se neutralizează și se înlătură, însă o parte din molecule de colorant, stabilizate de către moleculele de surfactant, rămân în soluția tratată și nu pot fi înlăturate mai departe cu ajutorul coagulantului de aluminiu. Însă, cea mai mare parte din compușii organici remanenți revine moleculelor de surfactant, care nu se înlătură eficient cu coagulantul de aluminiu. Despre aceasta indică și datele experimentale cu privire la înlăturarea numai a surfactantului cu ajutorul sulfatului de aluminiu din soluțiile model (Tab.1,2).

Acesta se explică prin următoarele. În soluții apoase coloranții textili se asociază și formează particule asociate cu dimensiuni mai mari, care au sarcină negativă și pot fi neutralizate cu particulele coloidale de hidroxid de aluminiu. Gradul de asociere a moleculelor de colorant depinde de concentrația lui inițială (Fig.4). Cu mărirea concentrației inițiale se atinge acea concentrație critică, la care gradul de asociere devine optim pentru formarea particulelor asociate. Pentru colorantul RAD concentrația critică de formare a particulelor asociate, adică a micelilor, este în jur de 125-130 mg/l.

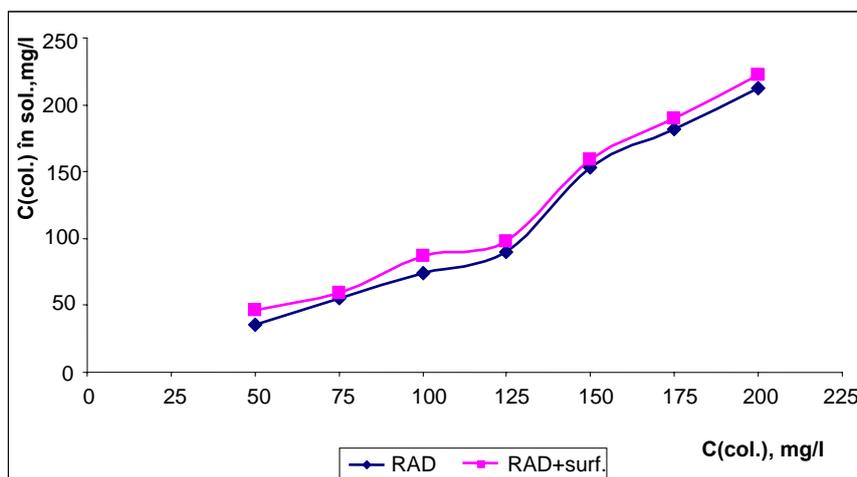


Fig.4. Dependenta concentrației colorantului RAD, în lipsa și în prezența surfactantului din soluțiile model, de concentrația lui inițială.

În prezența surfactantului anionic, particulele asociate de colorant se dispersează datorită interacțiunii dintre moleculele de colorant și moleculele de surfactant, care sunt atrase de către moleculele de colorant și le înconjoară, formând un strat de protecție, modificându-le dimensiunile și sarcina electrică [12]. Prin urmare, în prezența surfactantului se formează particule asociate, se păstrează aceeași valoare a concentrației critice de micelare, însă concentrația particulelor formate este mai mare decât în cazul numai a colorantului. De aceea, pentru neutralizarea și coagularea lor se cere o cantitate mai mare de coagulant, ceea ce s-a confirmat și în cercetările efectuate. Modelul acestor micelle este prezentat în Figura 5.

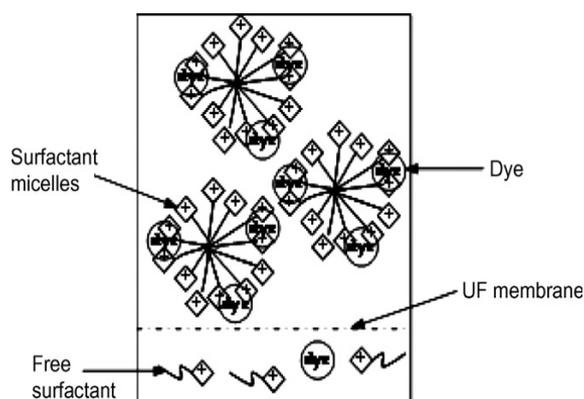


Fig.5. Schema formării particulelor asociate de colorant în prezența surfactantului.

Prin urmare, concentrația amestecului de colorant RAD și surfactant anionic se micșorează la prima etapă de tratare cu ajutorul coagulantului de aluminiu și la această etapă preponderent se înlătură moleculele de colorant RAD, iar concentrația remanentă a moleculelor organice (dintre care cele mai multe sunt de surfactant) poate fi micșorată în continuare, la etapa a doua de tratare, prin oxidarea lor cu peroxidul de hidrogen, catalizat de ionii de fier (II). Însă, datorită stabilității mai mari a moleculelor de surfactant față de oxidanți, concentrația

remanentă a produselor de oxidare este mai mare decât cea admisibilă (în cazul soluțiilor concentrate) și aceste soluții nu pot fi deversate în bazinele acvatice.

În continuare a fost studiat procesul de diminuare a concentrației colorantului textil roșu aprins direct (RAD) și a surfactantului anionic din soluțiile model la tratarea lor combinată cu sulfat de aluminiu la prima etapă de tratare, care este urmată de etapa de adsorbție a compușilor organici, remanenți după etapa de coagulare, de către cărbunii activi. A fost studiat procesul de diminuare concomitentă a concentrației colorantului RAD și a surfactantului anionic în funcție de concentrația inițială a surfactantului la diferite concentrații ale ionilor de aluminiu, care se introduc prin adăugarea sulfatului de aluminiu. Rezultatele experimentale sunt prezentate în Tabelul 5.

Tabelul 5

**Diminuarea concentrației colorantului RAD și a surfactantului din soluțiile model
la tratarea lor cu sulfat de aluminiu și cărbune activ la diferite concentrații ale surfactantului.
C(col.RAD)=200 mg/l, pH=6,5.**

Metoda de coagulare				Metoda de adsorbție pe CA		
$C_{Al^{3+}}$, mg/l	$CCO_{rem.col.}$, mgO/l	M., mg	E dim., %	M (CA), g	$CCO_{rem.col.}$, mgO/l	E dim., %
$C_0(surf.) = 20 \text{ mg/l}; CCO_0 = 135,0 \text{ mgO/l}$						
5,4	8,75	126,25	93,3	5,0	3,12	69,3
10,8	8,75	126,25	93,3	5,0	3,12	69,3
16,2	7,50	127,50	94,4	-	-	-
21,6	7,50	127,50	94,4	-	-	-
27,0	7,50	127,50	94,4	-	-	-
32,3	7,50	127,50	94,4	-	-	-
$C_0(surf.) = 40 \text{ mg/l}; CCO_0 = 160,0 \text{ mgO/l}$						
5,4	19,37	140,63	87,9	5,0	10,63	45,1
10,8	16,87	143,13	89,4	5,0	10,00	40,7
16,2	13,75	146,25	91,4	5,0	4,37	67,0
21,6	13,76	146,25	91,4	5,0	4,37	57,0
27,0	11,25	148,75	92,6	5,0	5,00	55,5
32,4	11,25	148,75	92,6	5,0	4,50	60,0
37,8	10,63	149,37	93,3	5,0	4,50	58,8
$C_0(surf.) = 60 \text{ mg/l}; CCO_0 = 185,0 \text{ mgO/l}$						
5,4	82,0	103,0	55,7	5,0	51,3	37,4
10,8	57,5	127,5	68,9	5,0	41,6	27,6
16,2	21,9	163,1	88,2	5,0	18,0	17,8
21,6	21,2	163,8	88,5	5,0	14,4	32,0
27,0	13,7	171,3	92,6	4,0	13,6	12,1
32,4	11,2	173,8	92,9	5,0	11,2	12,1
37,8	13,1	171,9	92,7	5,0	10,2	22,1
43,2	13,2	171,8	92,7	5,0	10,1	22,1

Din rezultatele prezentate în Tabelul 5 și cele obținute anterior [10-12] rezultă că colorantul RAD se înlătură eficient din soluțiile model cu concentrația de 200 mg/l cu ajutorul coagulantului de aluminiu cu concentrații ale ionilor de aluminiu de 5,4 mg/l. În prezența surfactantului cu concentrația de 20 mg/l soluția model, care conține amestec de colorant direct RAD, cu concentrația inițială de 200 mg/l, și de surfactant anionic se epurează până la normele sanitare deja la o concentrație a ionilor de aluminiu de 16,2-27,0 mg/l. Mărirea concentrației surfactantului din soluțiile model până la 40 mg/l duce la mărirea cantității ionilor de aluminiu până la 32,4-37,8 mg/l (adică, de 2 ori în comparație cu soluțiile care conțin surfactant cu concentrația de 20 mg/l), iar concentrația remanentă a amestecului de colorant RAD și surfactant în soluția epurată atinge valoarea de 7,5-11,2 mgO/l și întrece cu mult valoarea limită admisibilă. Efectul diminuării amestecului de compuși

organici se mărește neesențial cu mărirea concentrației ionilor de aluminiu – de la 93,3% până la 94,4% și cu mărirea concentrației surfactantului de la 20 mg/l până la 40-60 mg/l se micșorează de la 94,4% până la 92,7%.

Prin urmare, s-a constatat că consumul specific de aluminiu necesar pentru epurarea soluțiilor model, care conțin amestec de colorant RAD ($C(\text{col.}) = 200 \text{ mg/l}$) și de surfactant ($C(\text{surf.}) = 60 \text{ mg/l}$) s-a mărit de 2,5-3,0 ori în comparație cu consumul specific de aluminiu, necesar pentru înlăturarea numai a colorantului RAD din soluțiile model. Concentrația remanentă a compușilor organici după procesul de coagulare se micșorează pentru soluțiile, care conțin surfactant anionic, de la 40 la 60 mg/l cu ajutorul cărbunilor activi, care diminuează concentrația lor până la normele sanitare numai pentru concentrația surfactanților până la 40 mg/l. Soluțiile, care conțin colorantul RAD și surfactant anionic cu concentrația până la 60 mg/l nu se epurează până la normele sanitare.

Astfel, mărirea concentrației de surfactant din soluțiile model duce la creșterea cantității de coagulant, necesar pentru diminuarea concentrației amestecului de compuși organici la prima etapă prin procesul de neutralizare și coagulare a particulelor și micelilor formate. Iar epurarea acestor soluții în continuare se poate realiza fie prin oxidarea lor catalitică cu peroxid de hidrogen, fie prin aplicarea metodei de adsorbție la etapa a doua de tratare a soluțiilor, însă în ambele cazuri epurarea soluțiilor concentrate de colorant nu se poate realiza până la normele sanitare (Fig.6).

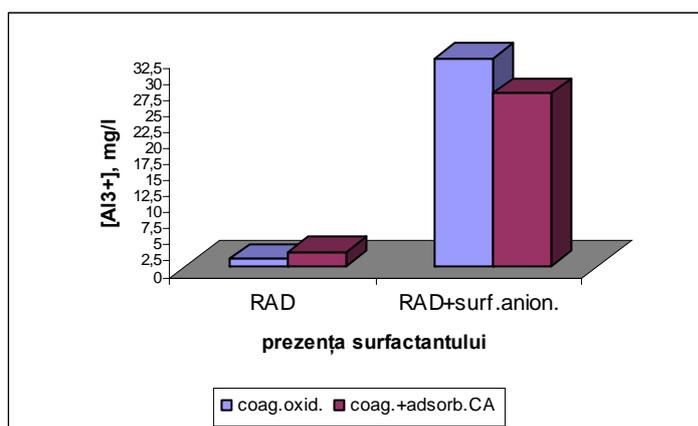


Fig.6. Dependența consumului de aluminiu în funcție de prezența surfactantului, la tratarea combinată a soluțiilor model, care conțin colorant RAD, cu coagulantul de aluminiu, urmată de oxidarea catalitică cu reagentul Fenton sau de adsorbția lor de către cărbunii activi. [col. Init.] = 200 mg/l; [surf.anion.] = 60 mg/l

În continuare a fost studiat procesul diminuarii concentrației colorantului direct RAD din soluțiile model cu concentrația coloranților de 200 mg/l în prezența surfactantului anionic cu concentrația de 60 mg/l prin combinarea metodei de coagulare, oxidare catalitică și adsorbție pe cărbunii activi. Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 6.

Tabelul 6

Diminuarea concentrației colorantului RAD și a surfactantului din soluțiile model la tratarea lor cu sulfat de aluminiu, oxidarea catalitică și adsorbția pe cărbunele activ
 $C(\text{col.RAD}) = 200 \text{ mg/l}$, $C(\text{surf.}) = 60 \text{ mg/l}$, $\text{pH} = 6,5$.

$C_{\text{Al}^{3+}}$, mg/l	Metoda de coagulare		Metoda de oxidare		Metoda de adsorbție pe CA	
	$\text{CCO}_{\text{rem col}}$, mgO/l	E. %	$\text{CCO}_{\text{rem col}}$, mgO/l	E. %	$\text{CCO}_{\text{rem col}}$, mgO/l	E dim, %
16,2	17,50	92,7	20,00	91,7	9,37	96,1
21,6	18,13	92,4	18,12	92,4	4,37	98,2
27,0	14,40	94,0	18,75	92,2	5,63	97,6
32,4	17,50	92,7	21,25	91,1	7,50	96,9

În baza cercetărilor efectuate s-a constatat că în rezultatul procesului de oxidare a moleculelor organice de colorant și surfactant, care rămân în soluție, după tratarea lor cu coagulant de aluminiu, concentrația lor practic nu se schimbă, însă se schimbă structura lor, ceea ce duce la mărirea efectului de înlăturare a lor prin procesul de adsorbție cu cărbunii activi până la concentrația remanentă, corespunzătoare normelor sanitare.

Concluzii

1. S-a stabilit ca coloranții direcți se pot înlătura din soluțiile model cu $Co = 50-200$ mg/l în prezența surfactantului anionic (numai până la concentrația de 40 mg/l) prin combinarea metodei de coagulare cu coagulantul de aluminiu și de adsorbție pe cărbunii activi. Consumul coagulantului în prezența surfactantului se mărește de 2-3 ori în comparație cu înlăturarea coloranților în lipsa surfactantului.

2. S-a constatat că la oxidarea catalitică a amestecului de coloranți direcți și surfactanți anionici, moleculele de surfactanți degradează mai greu decât moleculele de colorant, la oxidarea lor catalitică cu peroxidul de hidrogen, catalizat de Fe(II), și concentrația remanentă a substanțelor organice poate fi micșorată numai prin adsorbție pe cărbunii activi.

3. Epurarea soluțiilor concentrate, care conțin concomitent coloranți direcți și surfactant anionic cu concentrația respectivă de 200 mg/l și de 60 mg/l, se poate realiza numai prin combinarea metodelor de coagulare, oxidare catalitică și adsorbție pe cărbunii activi.

Referințe:

1. Omar Bouras, Jean-Claude Bollinger Michel Baudu, Hussein Khalay. Adsorption of diuron and its degradation products from aqueous solution by surfactant –modified pillared clays // *Applied. Clay Science*, 2007, no37, p.240-250.
2. Ma C.W. and Chu W. Photodegradation a mechanism and rate improvement of chlorinated aromatic dye an non-ionic surfactant solutions // *Was.Res.*, 2001, vol.35, no.10, p.2453-2459.
3. Ahmad A.L., Puasa S.W. Reactive dyes decolorization from an aqueous solution by combined coagulation/micellar – enhanced ultrafiltration process // *Chemical Engineering Journal*, 2007, no132, p.257-265.
4. Katarzyna Majewska-Nowak. The effect of a polyelectrolyte on the efficiency of dye-surfactant solution treatment by ultrafiltration // *Desalination*, 2008, no221, p.395-404.
5. Ibidem.
6. Fabiana M.M., Paschoal M., Anderson A., Valnice M., Zanoni B. Fotoelectrocatalytic oxidation of anionic surfactant used in leather industry on nanoporous Ti/TiO₂ electrodes // *J. Braz.Chem. Sos.*, 2008, vol.19, no4, p.603-810.
7. Michitaka Ohtaki, Hirofumi Sato, Hiroyuki Fujii, Koichi Eguchi. Intramolecularly selective decomposition of surfactant molecules on photocatalytic oxidative degradation over TiO₂ photocatalyst // *Journal of Molecular Catalysis A. Chemical*, 2000, vol.155, p.122-129.
8. Alcantara M.T., Gomez J., Pazos M., Sanroman M.A. Combined treatment of PAHs contaminated soils using the sequense extrasionn with surfactant- electrochemiocal degradation // *Chemosphere*, 2008, no70, p.1438-1444.
9. Louhichi M., Ahmadi F., Bensalan N., Gadri A., Radrigo M. Electrochemical degradation of anionic surfactant on boron doped diamond anode // *Journal of Hazardous Materials*, 2008, no158, p.450-457.
10. Duca Gh., Matveevici V., Gonța M., Coptu O. Înlăturarea coloranților direcți din apele reziduale textile prin metode electrochimice // *Studia Universitatis. Seria „Științe ale naturii”*, 2007, nr.1, p.256-260.
11. Duca Gh., Gonța M., Matveevici V., Iambarțev V. Oxidarea catalitică cu peroxid de hidrogen a colorantului portocaliu activ din soluțiile model // *Studia Universitatis. Seria „Științe ale naturii”*, 2008, nr.2.
12. Matveevici V., Duca Gh., Gonța M., Isac T., Mocanu L. Studiarea procesului de diminuare a concentrației coloranților activi din soluțiile model prin aplicarea metodelor fizico-chimice // *Studia Universitatis. Seria „Științe ale naturii”*, 2010, nr.1(31), p.162-172.
13. Лурье Л. Унифицированные методы анализа вод. - Москва, 1968.

Prezentat la 26.03.2012

CUPRINS

Ecologie, Botanică și Silvicultură

Victor ȘALARU, Victor MELNIC

PARTICULARITĂȚILE STRUCTURII TAXONOMICE ȘI ALE ECOBIOMORFELOR
ALGELOR EDAFICE DIN VEGETAȚIA DE STEPĂ DUPĂ O PERIOADĂ
DE PĂSTRARE ÎNDELUNGATĂ ÎN STARE DE ANHIDROBIOZĂ 5

Valentina BULIMAGA, Svetlana DJUR, Maria PISOV, Liudmila RUDI, Valeriu RUDIC

CAPACITATEA ANTIOXIDANTĂ A PREPARATELOR DE FICOCIANINĂ
OBȚINUTE ÎN BAZA BIOMASEI DE SPIRULINĂ ÎMBOGĂȚITE CU GERMANIU 9

Андрей БАБИЦКИЙ

УРОЖАЙ И УРОЖАЙНЫЕ КАЧЕСТВА СЕМЯН ПШЕНИЦЫ 14

Sergiu DOBROJAN, Cristina GORBATENCO, Galina DOBROJAN, Irina STRATULAT

CULTIVAREA ALGEI *NOSTOC FLAGELLIFORME* PE MEDII OBȚINUTE PE BAZA
DEȘEURILOR DE LA COMPLEXELE ZOOTEHNICE 19

Sergiu DOBROJAN, Irina STRATULAT, Galina DOBROJAN, Tudor POPESCU, Corina NEGARA

UTILIZAREA MEDIULUI DE CULTURĂ DREW LA CULTIVAREA
ALGEI AZOTFIXATOARE *ANABAENOPSIS* SP. 23

Natalia DONȚU, Victor ȘALARU

PARTICULARITĂȚILE DEZVOLTĂRII ALGOFLOREI BAZINELOR
STAȚIEI DE EPURARE BIOLOGICĂ A APELOR MENAGERE DIN mun. CHIȘINĂU 27

Aidaross NASSER NASR NAJI

КАШТАНОВАЯ МОЛЬ *Cameraria ohridella* Desch. and Dim. (Lepidoptera: Gracillariidae) – ОПАСНЫЙ
ВРЕДИТЕЛЬ КАШТАНА ОБЫКНОВЕННОГО *Aesculus hippocastanum* L. (Hippocastanaceae) 34

Biologie Vegetală

Ana BÎRSAN, Vladimir ROTARU, Iurii SCUTARU, Ana CUCER, Dăgălina BÎRSAN

EFFECTUL TRATĂRII SEMINTELOR DE SOIA CU SUBSTANȚE DE NATURĂ HUMICĂ ȘI
FENOLICĂ ASUPRA CREȘTERII ȘI DEZVOLTĂRII SISTEMULUI RADICULAR 39

Anatol CECAN, Gheorghe ȘIȘCANU, Tudor RALEA

UNELE ASPECTE PRIVIND INFLUENȚA PREPARATULUI *MELONGOZIDA O*
ȘI A MICROELEMENTELOR ASUPRA ACTIVITĂȚII INDICELUI CLOROFILIC,
CONȚINUTULUI GLUCIDELOR ÎN FRUNZE ȘI ASUPRA RODIRII LA POMII DE MĂR 44

Ecaterina EMNOVA, Anna HANGANU, Vasiliu GNIDIUC

ECO-PHYSIOLOGICAL INDICATORS OF BIOLOGICAL QUALITY
OF CALCAREOUS CHERNOZEM AFTER LONG-TERM AGRICULTURAL USE 47

Ștefan SANDIC, Galina LUPAȘCU, Svetlana GAVZER, Elena SAȘCO

CERCETĂRI CU PRIVIRE LA CARACTERELE CANTITATIVE ALE SPICULUI
LA *TRITICUM AESTIVUM* L. I. DEPENDENȚE CORELAȚIONALE,
PARTICULARITĂȚI DE MOȘTENIRE ÎN GENERAȚIA F₁ 53

<i>Galina LUPAȘCU, Ștefan SANDIC, Svetlana GAVZER, Elena SAȘCO</i>	
CERCETĂRI CU PRIVIRE LA CARACTERELE CANTITATIVE ALE SPICULUI LA <i>TRITICUM AESTIVUM</i> L. II. MANIFESTAREA VARIABILITĂȚII TRANSGRESIVE ÎN GENERAȚIA F ₂	60
<i>Раиса МАЛИНА, Георгий ШИШКАНУ, Нина ТИТОВА</i>	
ФОТОСИНТЕТИЧЕСКАЯ ПРОДУКТИВНОСТЬ СОРТОВ ПЕРСИКА ПРИ РАЗЛИЧНОЙ НАГРУЗКЕ ПЛОДАМИ	66
<i>Светлана НИКОЛАЕВА, Аркадий НИКОЛАЕВ, Виктория ШУБИНА, Леонид ВОЛОЦУК</i>	
НЕКОТОРЫЕ МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ВЫДЕЛЕНИЮ И ИЗУЧЕНИЮ ДЕЙСТВИЯ ТОКСИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ ГРИБА <i>ALTERNARIA</i> НА ПРОРОСТКИ ТОМАТОВ	72
<i>Елена ПЕЛЯХ, Василий ЧОБАНУ, Лучия АРХИП</i>	
СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ МЯТ, СИНТЕЗИРУЮЩИХ АЦИКЛИЧЕСКИЕ ТЕРПЕНОИДЫ	80
<i>Tatiana STEPURINA, Vitalie I. ROTARI</i>	
THE COMPARATIVE ANALYSIS OF <i>IN VITRO</i> PHASEOLIN PROTEOLYSIS BY PAPAIN AT DIFFERENT pH VALUES	84
<i>Gheorghe ȘIȘCANU, Anatol CECAN</i>	
INFLUENȚA PREPARATULUI <i>MELONGOZIDA O</i> ȘI A MICROELEMENTELOR ASUPRA CONȚINUTULUI GLUCIDELOR ÎN FRUNZE, ÎN ALTE ORGANE ALE SISTEMULUI DONOR-ACCEPTOR LA POMII DE MĂR	93
Biologie Umană și Animală	
<i>Ion BALAN</i>	
ROLUL GLUCIDELOR ÎN STABILIZAREA STĂRII MORFOFUNCȚIONALE A SPERMEI DE COCOȘ ÎN PROCESUL DE CRIOCONSERVARE	96
<i>Ion BALAN</i>	
ASPECTE MEMBRANO-STRUCTURALE ÎN PĂSTRAREA BIODIVERSITĂȚII PRIN CRIOCONSERVARE	101
<i>Ион БАЛАН</i>	
ИЗМЕНЕНИЯ МЕХАНИЗМОВ БЕЛОК-БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ ПРИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ	106
<i>Inga DELEU</i>	
APRECIEREA STĂRII FIZICE A SPORTIVILOR-ÎNOTĂTORI (BĂIEȚI ȘI FETE) ÎN BAZA UNOR PARAMETRI FIZIOLOGO-BIOCHIMICI	119
<i>Liuba PERCIUN</i>	
STAREA FUNCȚIONALĂ A GLANDEI TIROIDE LA ACȚIUNEA STRESULUI COMBINAT (HIPOKINEZIA ȘI INANIȚIA COMPLETĂ)	125
<i>Liuba PERCIUN</i>	
INFLUENȚA HIPOKINEZIEI ASUPRA STĂRII FUNCȚIONALE A GLANDEI TIROIDE	130
<i>Петру ПАВАЛЮК, Александр КОРЛЭТЯНУ, Григоре ВАРМАРЬ</i>	
К ВОПРОСУ О ФУНКЦИОНАЛЬНОМ СООТНОШЕНИИ АФФЕРЕНТНОГО СИНТЕЗА, МОТОРНОЙ ПАМЯТИ И ЛОКОМОТОРНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ЧЕЛОВЕКА	135
<i>Victor PUTIN</i>	
EFECTELE UNUI PRODUS AUTOHTON ȘI ALE CATOZALULUI ASUPRA STĂRII FUNCȚIONALE A FICATULUI LA PUII DE GĂINĂ PENTRU CARNE	141

Chimie

Alexandru CRACIUN, Vladimir ENE, Vasile PLĂMĂDEALĂ, Ilie BEIU

REDUCEREA EMISIILOR NOCIVE ALE MOTOARELOR CU ARDERE INTERNĂ PRIN
UTILIZAREA OZONULUI ÎN FORMAREA AMESTECULUI DE ARDERE 147

B.B KOVALEB, O.B KOVALEVA, B.A. БОБЕЙКА, В.Э. НЕННО, Г.Г. ДУКА

ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССОВ АНАЭРОБНОГО ПОЛУЧЕНИЯ БИОВОДОРОДА 152

B.B. KOVALEB, B.Э. НЕННО, B.A. БОБЕЙКА, И.А. СЕНЬКОВСКАЯ, O.B. KOVALEVA, Д.В. УНГУРЯНУ

СТИМУЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ МЕТАНОГЕННОГО БРОЖЕНИЯ
ЖИДКИХ ОРГАНИЧЕСКИХ ОТХОДОВ 160

Vera MATVEEVICI, Maria GONȚA, Gheorghe DUCA, Larisa MOCANU

STUDIUL INFLUENȚEI SUBSTANȚELOR SURFACTANTE ANIONICE ASUPRA
PROCESULUI DE ÎNLĂTURARE A COLORANȚILOR DIN SOLUȚIILE MODEL
LA TRATAREA LOR PRIN METODE FIZICO-CHIMICE 169

Formatul 60×84 ¹/₈.

Coli de tipar 22,6. Coli editoriale 26,5.

Comanda 295. Tirajul 100 ex.

Centrul Editorial-Poligrafic al USM
str. A.Mateevici, 60. Chișinău, MD 2009