



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **92028** (13) **U**
(51) МПК (2014.01)
C08K 5/07 (2006.01)
A99Z 99/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2014 02042	(72) Винахідник(и): Зінченко Юлія Володимирівна (UA), Машталер Олександра Володимирівна (UA), Сафонов Андрій Іванович (UA), Федотов Олег Валерійович (UA), Велигодська Анастасія Костянтинівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 28.02.2014	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.07.2014	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.07.2014, Бюл.№ 14	(73) Власник(и): ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Університетська, 24, м. Донецьк, 83055 (UA)

(54) СПОСІБ ІНДИКАЦІЇ ЗАБРУДНЕННЯ АТМОСФЕРНОГО ПОВІТРЯ ЗА ДОПОМОГОЮ ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКІСНОГО ВМІСТУ ПОЛІФЕНОЛІВ У ГАМЕТОФІТАХ МОХОПОДІБНИХ

(57) Реферат:

Спосіб індикації забруднення атмосферного повітря за допомогою визначення кількісного вмісту поліфенолів у гаметофітах мохоподібних включає збір рослинного матеріалу, визначення та розділення матеріалу на рівні частини, пересадку зразків-трансплантатів у вибрані моніторингові точки (експозиція експерименту - 3 місяці). Потім здійснюють збір для проведення аналізу у лабораторних умовах. Проводять первинну статистичну обробку експериментальних даних та оцінку ступеня забруднення навколишнього природного середовища. Використовують один вид рослини-індикатора *Amhlstegium subtile* (Hedw.) Schimp. Вимірюють вміст поліфенолів спектрофотометричним методом із застосуванням реактиву Фоліна-Чіокальто у кожному зразку. Порівнюють концентрацію поліфенолів в пробах мохів досліджуваних ділянок з вмістом цих речовин у пробі моху, відібраного з контрольної ділянки.

UA 92028 U

Корисна модель належить до біомоніторингу, екотоксикології, екофізіології та може бути використана для індикації стану навколишнього середовища, а саме оцінки забруднення атмосферного повітря в умовах техногенно трансформованих екотопів.

Поліфенольні сполуки - вторинні метаболіти рослинного організму [11]. Вони належать до класу речовин ароматичної природи, які мають у своєму складі декілька бензольних кілець та одну або декілька гідроксильних груп. Встановлено, що найпродуктивнішими за вмістом поліфенольних речовин серед поліпоральних базидіоміцетів є карпофори видів *F. fomentarius*, *G. applanatum*, *G. lucidum* та *L. sulphureus*, а серед агарикальних - *F. hepatica*, *F. velutipes*, *P. ostreatus*, *S. rugosoannulata*, *A. cylindracea* та *T. flavovirens* [13]. Результати дослідження не враховують екологічного стану місця зростання карпофорів.

Відомо, що фенольні сполуки є антиоксидантами та виконують захисну функцію при дії механічних, термічних, інфекційних та ін. факторів середовища і накопичуються в рослинах при дії несприятливих умов [3, 10].

Це дає можливість стверджувати, що стрес-фактори (запиленість, наявність забруднюючих речовин у повітрі) здатні активізувати процеси накопичення фенольних сполук у гаметофітах моху, що може служити інформативною біоіндикаційною ознакою забруднення середовища.

Мохоподібні знайшли широке застосування як біоіндикатори забруднення навколишнього середовища [1, 2, 5, 6, 8]. Біоіндикаційні дослідження включають методи як пасивного [5], так і активного моніторингу [2, 6, 8].

Відомий спосіб оцінки ступеня антропогенної дигресії степових екосистем з використанням мохоподібних [9], який включає візуальний аналіз та оцінку стану мохоподібних за шкалою за допомогою спеціального обладнання - світлового мікроскопа, фотоапарата. При цьому як індикатори конкретних степових угруповань використовують комплекс видів мохоподібних відділів *Bryophyta* і *Marchantiophyta*, візуальний аналіз включає якісну і кількісну складову та розрахунок і визначення ступеня антропогенної дигресії цих екосистем за п'ятиланковою шкалою.

Найбільш близьким за технічною суттю є спосіб оцінки ступеня забруднення атмосферного повітря із застосуванням трансплантатів моху [8]. Спосіб включає збір рослинного матеріалу, визначення та розділення по видах, поділ загальної площі дернинок моху на рівні частини відповідно кількості вибраних моніторингових зон, прикріплення трансплантатів у моніторингових зонах, щомісячне спостереження за станом трансплантатів, збір зразків-трансплантатів для проведення візуального аналізу та оцінки стану рослин-індикаторів за п'ятибальною шкалою морфологічних змін, розробленою О.Л. Gilbert [12]. Експозиція експерименту - 3 місяці. Недоліком цього способу є неповне дослідження змін екосистем під дією антропогенного фактора, оскільки в основі оцінювання антропогенного навантаження на навколишнє середовище лежить аналіз тільки морфологічних змін трансплантатів.

В основу корисної моделі поставлена задача розробки способу індикації забруднення атмосферного повітря за допомогою визначення кількісного вмісту поліфенолів у гаметофітах мохоподібних із застосуванням трансплантатів моху *Amblystegium subtile* (Hedw.) Schimp., який може бути використаний для індикації стану навколишнього середовища, оцінки забруднення атмосферного повітря в умовах техногенно трансформованих екотопів. Запропонований спосіб є ефективним та нескладним у використанні, не потребує дорогого устаткування і дає змогу визначити та порівняти екологічні умови досліджуваних моніторингових ділянок, а також дати комплексну оцінку їх стану.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі індикації забруднення атмосферного повітря за допомогою визначення кількісного вмісту поліфенолів у гаметофітах мохоподібних, який включає збір рослинного матеріалу, розділення матеріалу на рівні частини, пересадку зразків-трансплантатів у вибрані моніторингові точки (експозиція експерименту - 3 місяці), збір трансплантатів для проведення аналізу у лабораторних умовах, згідно з корисною моделлю, використовується один вид рослини-індикатора *Amblystegium subtile* (Hedw.) Schimp., вимірюється вміст поліфенолів спектрофотометричним методом із застосуванням реактиву Фоліна-Чіокальто у кожному зразку та робиться висновок про рівень забруднення атмосферного повітря шляхом порівняння концентрації поліфенолів в пробах мохів досліджуваних ділянок з вмістом цих речовин у пробі моху, відібраного з контрольної ділянки.

Приклад конкретного виконання.

Спосіб індикації забруднення атмосферного повітря за допомогою визначення кількісного вмісту поліфенолів у гаметофітах мохоподібних відповідно до заявленого рішення здійснюють наступним чином. Для проведення трансплантації рослини *Amblystegium subtile* (Hedw.) Schimp. виділяють 10 моніторингових точок, що знаходяться на однаковій географічній широті в Донецькій області:

- 1) м. Сніжне, вул. Карапетяна;
- 2) м. Сніжне, центральний ринок;
- 3) м. Сніжне, автостанція;
- 4) м. Сніжне, машинобудівний завод ВАТ "Мотор Січ";
- 5) м. Сніжне, міський парк;
- 6) м. Донецьк, Донецький металургійний завод;
- 7) м. Донецьк, площа Леніна;
- 8) м. Донецьк, ринок "Маяк";
- 9) м. Донецьк, залізничний вокзал;
- 10) меморіальний комплекс "Савур-Могила", умовний контроль.

Меморіальний комплекс "Савур-Могила" входить до складу регіонального ландшафтного парку "Донецький кряж" та знаходиться на відстані 15 км від м. Сніжне та 85 км від м. Донецька, вважаємо його умовно чистою зоною.

Для бріоіндикаційних досліджень використовують методи активного моніторингу [2, 6, 8]. Збір рослинного матеріалу для трансплантації проводять на контрольній ділянці. Вибирають найбільш типове дерево, наприклад виду *Asper pedundo* L., стовбур якого від поверхні землі до висоти 0,5-1 м покритий епіфітним мохом. Для експерименту збирають верхній шар кори зі зростаючими на ньому дерновинками мохів, які утворюють найбільші площі обростання. Зібрані дерновинки перед трансплантацією визначають порівняльно-морфологічним методом за допомогою біокулярного мікроскопа МБ1-3 та стереоскопічного мікроскопа МБС-1 за загальноприйнятими методами і методиками [7]. Трансплантати моху розміром 2 × 4 см пересаджують на стовбури *A. pedundo* на середній висоті - 1,5-2 м від основи стовбура, в обраних моніторингових точках. Вибір висоти пояснюється тим, що в приземному шарі атмосфери (до 2 метрів) концентрується більшість шкідливих речовин, які входять до складу викидів промислових підприємств. Якість саме приземного шару атмосфери є невід'ємним критерієм нормального стану здоров'я людини, тварин і рослинних організмів [1]. Експозиція експерименту - 3 місяці.

Через три місяці з моменту закладки експерименту в кожній моніторинговій точці трансплантати збираються для подальшого аналізу в лабораторних умовах.

Вміст поліфенолів в зразках трансплантатів моху *A. subtile* визначають спектрофотометричним методом із застосуванням реактиву Фоліна-Чіокальто [13].

Дерновинки трансплантатів *A. subtile* подрібнюють у гомогенізаторі до розміру часток 1×2 мм. Потім роблять їх наважку - 0,3 г і переміщують до центрифужних пробірок. Центрифужні пробірки з наважками моху переміщують на водяну баню (70 °С), додають 5 мл 80 % розчину етанолу, закривають пробкою та перемішують. Суміш нагрівають протягом 10 хвилин та перемішують. Екстрагування повторюють 2 рази. Після охолодження пробірок до 20 °С, суміш центрифугують протягом 10 хвилин при частоті обертання 3500 хв⁻¹. Отримані екстракти декантують до градуйованих пробірок, об'єм кожного екстракту доводять до 10 мл 80 % розчином етанолу.

Наступним етапом, до 1 мл екстракту кожного зразка моху додають 5 мл водного розчину реактиву Фоліна-Чіокальто та 4 мл розчину карбонату натрію. Розчини витримують протягом 60 хвилин при 20 °С. Визначення вмісту поліфенолів проводять за допомогою спектрофотометра, наприклад, СФ-46, вимірюючи їх оптичну густину при довжині хвилі 765 нм у кюветі з оптичною довжиною шляху 10 мм.

Вміст поліфенолів виражають у мг еквівалентів галової кислоти на грам маси сухої речовини (мг/г). Калібрувальну криву будують за стандартними розчинами галової кислоти [13].

Дослідження проводять у трикратній повторності. Обчислення експериментальних даних проводять згідно з керівництвом [4] за допомогою пакетів програм Excel 2007, Statistica 8.0. Рівень вірогідності для біометричних досліджень відповідає 95 % або 0,95 (надійний інтервал - 5 %).

Середні показники вмісту поліфенолів у зразках трансплантатів моху *A. subtile* з різних моніторингових точок представлені в табл. 1.

Найменшу кількість поліфенольних сполук зазначено в контрольній ділянці (14,29±2,13 мг/г), що підтверджує умовну чистоту даної місцевості. Результати дослідження показали перевищення в різній кількості вмісту поліфенолів в досліджуваних зразках порівняно з контролем. У точках з мінімальним ступенем антропогенного навантаження (точки 5, 2) таке перевищення є незначним та складає 1,16 і 1,29 відповідно.

Таблиця

Вміст поліфенолів у трансплантатах моху
Amblystegium subtile (Hedw.) Schimp. з різних моніторингових точок

Моніторингова точка *	Вміст поліфенолів, мг/г	Моніторингова точка *	Вміст поліфенолів, мг/г
1	20,43±0,85	6	24,03±1,72
2	18,49±0,32	7	19,15±0,48
3	19,61±1,44	8	21,68±0,27
4	27,53±1,22	9	26,79±0,55
5	16,59±0,46	10 (контроль)	14,29±2,13

Примітка: * - місце знаходження моніторингових точок наведено вище.

Найбільші концентрації поліфенолів були зафіксовані в точках 4, 6 і 9, які перевищують контрольні значення в 1,93; 1,68 і 1,87 відповідно. Це вказує на активізацію фізіологічних захисних реакцій у відповідності зі специфічністю хімізму едафотопів, а отже стан атмосферного повітря на даних територіях можна охарактеризувати як несприятливий.

Для оцінки стану атмосферного повітря було проведено ранжування показників вмісту поліфенолів у трансплантатах *A. subtile* (від мінімальних значень до максимальних), моніторингові точки були упорядковані відповідно цим значенням наступним чином: №10 → №5 → №2 → №7 → №3 → №1 → №8 → №6 → №9 → №4. Результати представлені на графіку.

Проведене дослідження підтверджує, що за умов посилення дії стресового фактора активується синтез поліфенолів, що дозволяє свідчити про позитивний зв'язок між вмістом поліфенолів в трансплантатах моху та станом навколишнього середовища, а також доцільності застосування даного методу в екологічному моніторингу (активного типу) техногенно-трансформованих екотопів, які є характерними для Донецького регіону.

Таким чином, запропонований спосіб індикації забруднення атмосферного повітря за допомогою визначення кількісного вмісту поліфенолів у гаметофітах мохоподібних на прикладі рослини *Amblystegium subtile* (Hedw.) Schimp. є новим та придатним для застосування в лабораторних дослідженнях і дає вірогідні результати при вивченні локальних ділянок різного рівня антропогенної дигресії.

Джерела інформації:

1. Глухов А.З. Актуальные вопросы бриоиндикации в условиях Донбасса / А.З. Глухов, И.Н. Остапко, А.В. Машталер // Промышленная ботаника: сборник научных трудов. - Донецк: Донецкий ботанический сад НАН Украины. - 2004. - С. 110-116.

2. Зинченко Ю.В. Определение зависимости морфометрических показателей листовых пластинок трансплантатов мха *Pylaisia polyantha* (Hedw.) Schimp. от состояния окружающей среды // Ю.В. Зинченко / Охорона навколишнього середовища та раціональне використання природних ресурсів / Збірка доповідей XXIII Всеукраїнської наукової конференції аспірантів і студентів. Т.2. - Донецьк: ДонНТУ, ДонНУ, 2013. - С. 48-49.

3. Карпин О. Антиоксидантна активність і вміст поліфенолів у рослинах *Carex hirta* L. та *Faba bona Medic.* (*Vicia faba* L.) за дії нафтового забруднення / О. Карпин, З. Динько, О. Терек, О. Цвілінюк, Л. Шимон // Львів: Біологічні студії. - 2009. - Т.3, №2 - С. 109-114.

4. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин - М.: Высшая школа, 1990-350 с.

5. Машталер А.В. Изучение изменчивости вида *Ceratodon purpureus* Hedw.(Brid.) в условиях техногенно трансформированной среды Донецкой области / А.В. Машталер, Е.С. Башкирова // 36. доповідей VII Міжнар. наук. конф. аспірантів та студентів [Охорона навколишнього середовища та раціональне використання природних ресурсів], (м. Донецьк, 14-16 квітня 2009 р.). - Донецьк, 2009. - С. 177-178.

6. Машталер А.В. Морфологические изменения трансплантатов мхов под влиянием газообразных выбросов промышленных предприятий / А.В. Машталер, Д.В. Задорожная // Матер. Третьей міжнар. наук. конф. "Відновлення порушених природних екосистем" (Донецьк, 7-9 жовтня 2008 р.). - Донецьк, 2008. - С. 367-369.

7. Мельничук В.М. Определитель листовых мхов средней полосы и юга европейской части СССР / В.М. Мельничук. - К.: Наукова думка, 1970. - 444 с.

8. Пат. 46729UA, A99Z 99/00. Спосіб оцінки ступеня забруднення атмосферного повітря із застосуванням трансплантатів моху. - О.З. Глухов, О.В. Машталер, Д.В. Задорожна. - №

u200902264; Заявл. 16.03.2009; Опубл. 11.01.2010. - Бюл. № 1. (прототип)

9. Пат. 82865UA, A99Z 99/00. Спосіб оцінки ступеня антропогенної дигресії степових екосистем із використанням мохоподібних. - М.Ф. Бойко. - № a20124084; Заявл. 10.12.2012; Опубл. 27.08.2013. - Бюл. №16.

5 10. Bravo L. Phenolic phytochemicals: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutr. Rev, 1998; 56: 317-333.

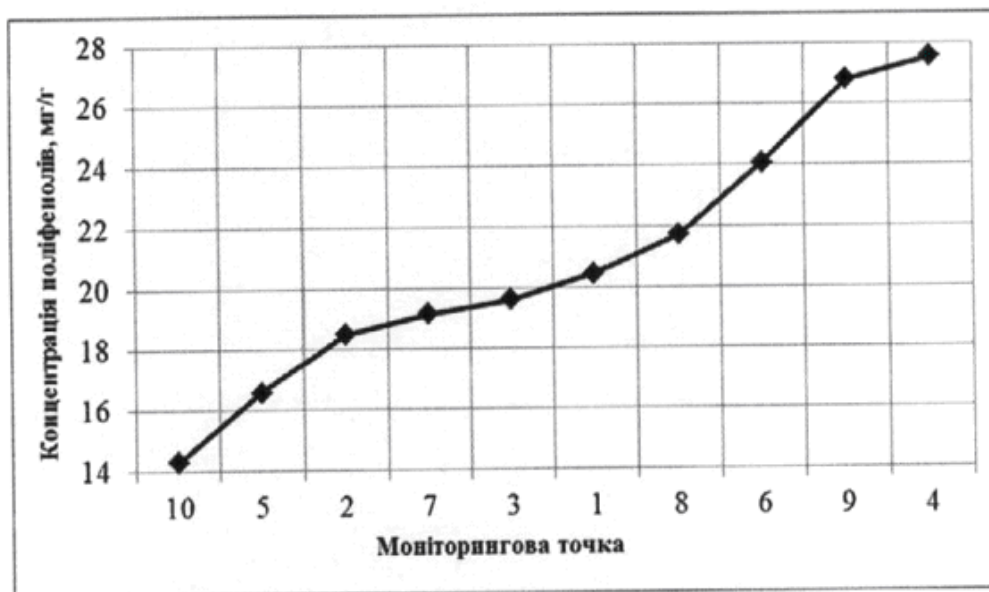
11. Crozier A., Burns J., Aziz A.A. et al. Antioxidant flavonols from fruits, vegetables and beverages: measurements and bioavailability. Biol. Res, 2000; 33: 79-88.

10 12. Gilbert O.L. Bryophytes as indicators of air pollution in Tyne Valley / O.L Gilbert //New Phytology. - 1968. - Vol. 67, №. 1. - P. 15-30.

13. Fedotov O.V., Veligodska AХ. Search producers of polyphenols and some pigments among Basidiomycetes // Biotchnologia Acta. - V. 7, No 1, 2014. -P. 110-116.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

15 Спосіб індикації забруднення атмосферного повітря за допомогою визначення кількісного вмісту поліфенолів у гаметофітах мохоподібних, що включає збір рослинного матеріалу, визначення та розділення матеріалу на рівні частини, пересадку зразків-трансплантатів у вибрані моніторингові точки (експозиція експерименту - 3 місяці), збір для проведення аналізу у
20 лабораторних умовах, проведення первинної статистичної обробки експериментальних даних та оцінку ступеня забруднення навколишнього природного середовища, який **відрізняється** тим, що використовують один вид рослини-індикатора *Amhlystegium subtile* (Hedw.) Schimp., вимірюють вміст поліфенолів спектрофотометричним методом із застосуванням реактиву Фоліна-Чіокальто у кожному зразку, на підставі цього аналізу роблять висновок про рівень
25 забруднення атмосферного повітря шляхом порівняння концентрації поліфенолів в пробах мохів досліджуваних ділянок з вмістом цих речовин у пробі моху, відібраного з контрольної ділянки.



Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601