

УДК 681.51

Адамчук-Чала Н.І.¹, к.б.н., докторант
Яценко В.О.², д.т.н., проф..
Гніденко В.В.³, аспірант
Пашенковська І.С.², аспірант

Рослини в космосі: виміри, моделювання та експерименти

¹ Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К.
Заболотного НАН України, 03680, м. Київ,
вул. Академіка Заболотного, 154,

e-mail: m_nv@mail.ru

² Київський національний університет імені
Тараса Шевченка, 03680, пр. Глушкова 4д,
e-mail: vyatsenko@gmail.com

³ Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут», 03056, м.
Київ, проспект Перемоги 37,
e-mail: vanhealsing@yandex.ru

Adamchuk-Chala N.I.¹, PhD, doctoral candidate
Yatsenko V.O.², doctor of sciences, prof.
Gnidenko V.V.³, graduate student
Pashenkovska I.S.², graduate student

Plants in space: measurements, modeling and experiments

¹ D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and
Virology of the NASU, 03680, Kyiv, Acad.
Zabolotny str., 154,

e-mail: m_nv@mail.ru

² Taras Shevchenko National University of Kyiv,
03680, Kyiv, Prospect Glushkova 4d,
e-mail: vyatsenko@gmail.com

³ National Technical University of Ukraine “Kyiv
Polytechnic Institute”, 03056, Kyiv, Prospect
Peremogy 37,
e-mail: vanhealsing@yandex.ru

Проведено аналіз результатів сучасних досліджень поведінки рослин в умовах мікрогравітації. Описано деякі з перспективних інформаційних технологій дослідження мікробіоценозів та представлені результати експериментальних вимірювань. Представлено положення, що архітектура кореневих, прикореневих і позакореневих субстратних мікроценозів може бути інформативним показником впливу факторів космічного польоту на рослинно-мікробну систему. Розглянуто методіку, яка дозволяє працювати з будь-якими рослинами, використовуючи різні можливості вивчення та порівняння способів організації мікробіоценозу в корінні рослин і біля них, як в умовах Землі, так і в космічних польотах.

Ключові слова: аналіз, вимірювання, моделювання, оптимізація, класифікація.

An analysis of modern results of vegetation dynamics under microgravity conditions has been conducted. Some promising information technologies for microbiocenoses researches and experimental measurement results have been presented. Submitted provisions of root architecture, basal and foliar substrate microcenosis could be informative indicator of the space flight factors impact on plant-microbial system. The method which allows you to work with any plants using a variety of opportunities to study and compare the ways of the indigenous microbiota in plants and around them, as on the Earth and on space flights is considered. New technology was used to identify the dynamics of formation substrate microbiota, bacterial and fungal found associations and contacts between them were identified. Controlled nonlinear lattice imaging has been developed. A method using support vector machines for pattern recognition and image classification microbiocenosis based on validation procedure has been proposed. The resulting material is informative, intuitive and can be widely used in laboratory and in field conditions on the Earth.

Key Words: analysis, measuring, modeling, optimization, classification.

Статтю представив д.т.н., проф. Гаращенко Ф.Г.

1. Вступ

В умовах природних мікробіоценозів мікроорганізми здобувають системно-просторову організацію у вигляді архітектури мікрокосисем, здатних до автономного існування [1].

Спроби з'ясувати справжній стан мікробіоценозів відбувались неодноразово [6]. Наявні сьогодні уявлення про мікробіоценози обмежені можливостями стандартних методів, до яких насамперед варто віднести пряму мікроскопію не усереднених зразків, які обережно витягнуті із субстрату корінців, біоплівки, ділянок листків і т. д.

однак через непрозорість більшості субстратів її можливості аналізу обмежені, що в свою чергу обмежує доступність їхнього дослідження.

Особливе значення може мати архітектура мікробіоценозів, що формується в штучно створених системах – від посівів культурних рослин у польових умовах до їхнього культивування в контейнерах приладів росту рослин при мікрогравітації. Це головним чином зумовлене тим, що корінь рослин є центральним й значною мірою формуючим компонентом мікробіоценозів [3], особливо при становленні ризосферних мікробіоценозів рослин, які культивуються на штучних субстратах.

2. Експерименти з рослинами в космосі

Відомо, що під впливом умов реального космічного польоту істотно змінюються практично всі сторони життєдіяльності рослин – ростові, морфологічні, фізіологічні, біохімічні [5, 7, 8].

У ході біоекспериментів, проведених на космічних станціях «Салют» та «Мир», показано, що в умовах тривалого космічного польоту, мікробіота набуває більшої агресивності відносно рослини-господаря [2]. Підвищення агресивності мікроорганізмів щодо рослини була виявлена під час експерименту на борту космічного корабля «Союз» з водною папороттю Азола в приладі «ИФС – 2». У дослідженнях, проведених на космічній станції «Салют – б» з *Azolla pinnata*, було вперше продемонстровано, що умови мікрогравітації викликають зміни не лише рослини, але й мікросимбіонта [8, 9].

Ультраструктура синьо-зеленої азотофіксуєної водорості *Anabaena azollae*, що є прокаріотичним симбіонтом водної папороті *Azolla pinnata*, детально описана після 8-денного космічного польоту [8]. Ця водорість росте в закритих порожнинах листків. Матеріал був фіксований на орбіті для електронно-мікроскопічних досліджень. За формою й ультраструктурною організацією клітин експериментальної і контрольної популяції були подібні. Розширені тилакоїди були виявлені у незначній кількості клітин. Спостерігалися поодинокі випадки утворення хвилястих або вигнутих клітинних стінок, які формувалися під час поділу клітин. Електронна щільність цитоплазми клітин, що розвивалися в умовах дії зміни сили тяжіння, була значно нижче, ніж у контролі [9].

В умовах космічного польоту технології вирощування рослин значною мірою відрізняються від використовуваних в наземних умовах. Під час космічного польоту штучний субстрат і коріння рослин обростатимуть мікроорганізмами із формуванням абсолютно невідомої архітектури, що впливатиме на ріст і розвиток рослин. За таких умов можливе виникнення складних перебудов у структурно-функціональній організації мікробіоценозів, які не піддаються прогнозу та відображають як зміни в фенотипі в рамках початкових існуючих генетичних програм, так і в генетиці, які виникають під дією факторів космічного польоту [11]. Авторами на прикладі вивчення спор (*Bacillus subtilis*) в 35-денному польоті станції «Мир» показано дворазове збільшення мутації за маркером, який досліджувався, хоча станція «Мир» перебувала на низькій орбіті, нижче радіаційних поясів Землі, де від випромінювання значною мірою захищає магнітосфера. Оскільки міжнародна космічна станція перебуває вище радіаційних поясів Землі, на ній можна чекати більш високий рівень мутагенезу, що може призвести до прискореної деградації біоматеріалу культивуваних камер рослин.

В субстраті культивуваних камер слід чекати збільшення активності біологічних процесів [10]. Перший етап таких змін можна чекати на рівні просторової структури кореневих, прикореневих і позакореневих субстратних мікробіоценозів, архітектура яких може бути дуже інформативним показником впливу факторів космічного польоту на екосистему, що формується на поверхні та навколо вищих рослин.

3. Технологія дослідження рослин

Для дослідження мікробіоценозів за умов мікрогравітації [4] необхідна відповідна технологія. В роботі [3] була запропонована нова технологія, яка не руйнує мікробні спільноти і сприяє вивченню біологічних організмів в усьому діапазоні техніки мікроскопії – від мікро до нанорівня організації живого. Підготовлені для роботи лавсанові пластинки необхідного розміру містяться в субстраті на різній відстані від висіяного інокульованого насіння рослини. Через певний час після початку росту рослини пластинки по черзі вилучаються із субстрату, так щоб не порушувати архітектуру мікробіоценозу, який сформований на поверхні обростання

корінцями й мікроорганізмами, фіксуються та досліджуються. Оскільки пластинки вироблені із прозорого органічного матеріалу, спільноту мікроорганізмів, яка на них виросла, можна досліджувати як у світлооптичному мікроскопі, так й в електронному мікроскопі.

Таку технологію в силу своєї простоти й доступності легко застосовувати при складанні освітніх програм. Спостереження у світлооптичному мікроскопі можливі майже в будь-якій школі, а при вдалому співробітництві шкіл та університетів, також і в електронному мікроскопі. У поєднанні з сучасними комп'ютерними можливостями пропонується технологія проста у своїй реалізації, а одержуваний матеріал інформативний, наочний і може бути широко використаний у лабораторних і польових умовах на Землі.

Контури зі зворотним зв'язком, що управляють багатополярними магнітними лінзами для зменшення аберацій та інших дефектів зображення, програмувальні вузли позиціонування зразків, а також продуктивні інтерфейси для зв'язку з комп'ютерами і системами зберігання даних – все це лише вершина айсберга цифрової електроніки, яка задіяна в сучасних трансмісійних електронних мікроскопах (ТЕМ).

Донедавна результати роботи ТЕМ фіксувалися винятково за допомогою високочутливих фотоплівки (які доводилося проявляти й сканувати для подальшої комп'ютерної обробки). Сьогодні усе більше досліджень ведеться з використанням ССД-матриць, ключові переваги яких – оперативність та зручність. Плата за комфорт велика: вартість ТЕМ-сумісних 64-мегапіксельних ССД-фотоелементів обчислюється сотнями тисяч доларів. Сьогодні дослідження в даному напрямку продовжують розвиватися в середовищі конкурентів, самим значимим з яких вважається EMAN. Незважаючи на подібність базових принципів названих пакетів (кожний з них одержує на вхід безліч мікрофотографій і видає 3D-модель із більш-менш високою роздільною здатністю), виявлення кращого з них проблематично, оскільки кожна кріо-ЕМ-лабораторія віддає перевагу певному пакету програм, що позначається на всіх аспектах її багаторічної роботи аж до техніки підготовки зразків для фотографування. Головним інструментом кріо-ЕМ слугують традиційні методики ТЕМ.

В якості модельної рослини широко використовують арабідопсис *Arabidopsis thaliana* L. Heynh., яка вирощується в умовах лабораторного аналога оранжереї [3]. Простежена динаміка формування субстратного мікробіоценозу (рис.1) та виявлені бактеріально-грибні асоціації. Нова технологія дозволила зафіксувати міжклітинні контакти мікроорганізмів ценозу з використанням електронної скануючої мікроскопії (рис.2).

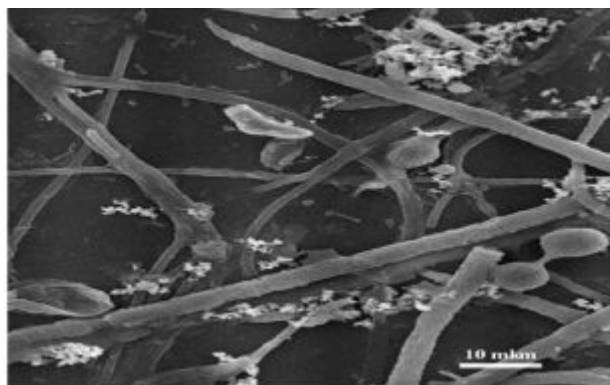


Рис.1 Мікробно-грибна асоціація ризосферної зони рослин арабідопсису (пізня стадія формування)

На протязі всього часу існування технології кріо-ЕМ, мікроскопісти боролися за автоматизацію розпізнавання часток, намагаючись пристосувати до рішення цього завдання чи не кожен з методів, відомих у теорії обробки та сегментації зображень – від клітинних автоматів до нейронних мереж. Донедавна їхні зусилля залишалися марними, і вчені були змушені вказувати положення часток на фотографіях вручну, присвячуючи цій надзвичайно монотонній роботі астрономічну кількість людино-годин (впровадженню технології crowdsourcing перешкоджає відсутність достатнього числа виконавців, знайомих з азами молекулярної біології).



Рис.2. Контакти між представниками різних таксонів мікроорганізмів (ризосферна зона арабідопсису)

Сьогодні рабська праця стала пережитком минулого: провідним лабораторіям світу, що конкурують за лідерство в області кріо-ЕМ, вдалося автоматизувати добір часток за допомогою різних «фірмових» алгоритмів евристичного характеру, а також підвищення стійкості наступних обчислювальних етапів до помилок розпізнавання. Зокрема, нами запропонована керована нелінійна ґратка для обробки зображень. Теоретичною базою відновлення тривимірних структур об'єктів за їх двовірними проєкціями служить також інтегральна геометрія, початок якій закладений роботою австрійського математика Йоганна Радона, в 1917 р. який винайшов так званий метод зворотної проєкції.

4. Оптимізаційний підхід до класифікації зображень ТЕМ

Підхід до обробки зображень трансмісійного електронного мікроскопу базується на системному використанні нелінійних методів фільтрації, класифікації й розпізнавання образів. Використано метод опорних векторів для класифікації наноструктур на основі застосування даних ТЕМ.

Метод опорних векторів (SVM – support vector machines) – це набір схожих алгоритмів виду «навчання із вчителем», що використовуються для завдань класифікації та регресійного аналізу. Цей метод належить до сімейства лінійних класифікаторів. Особливою властивістю методу опорних векторів є безперервне зменшення емпіричної помилки класифікації й збільшення зазору. Тому цей метод також відомий як метод класифікатора з максимальним зазором.

Основна ідея методу опорних векторів – переведення вихідних векторів у простір більш високої розмірності та пошук поділяючої гіперплощини з максимальним зазором у цьому просторі. Дві паралельних гіперплощини будуються по обидва боки гіперплощини, що розділяє наші класи. Поділяюча гіперплощина максимізує відстань до двох відповідних паралельних гіперплощин. Алгоритм працює в припущенні, що чим більше різниця або відстань між цими паралельними гіперплощинами, тим менше буде середня помилка класифікатора.

Знайдено пару гіперплощин, які дають максимальну ширину смуги, шляхом розв'язку наступної задачі оптимізаційної з обмеженнями

$$\min_{\mathbf{w}} \frac{1}{2} \|\mathbf{w}\|^2,$$

при умові

$$z_{j'}(\mathbf{x}_{j'} \cdot \mathbf{w} + b) - 1 \geq 0 \quad \forall j', j' = 1, \dots, J'.$$

5. Класифікації мікробіоценозів

Один з підходів до класифікації зображень ТЕМ на k класів в залежності від структури мікроценозу заснований на методі опорних векторів. Для навчання алгоритма використано еталонні структури. Валідація моделі класифікації проводилась з використанням знань експертів. Після того, як була проведена класифікація зображень, результати порівнювались з результатами класифікації експертами. Якщо результати відрізнялись, пропонувалось заново навчити алгоритм класифікації. Експериментальні дослідження показали на високу ймовірність правильного розпізнавання структури ТЕМ зображення.

6. Висновки

Описано перспективні інформаційні технології дослідження мікробіоценозів в умовах мікрогравітації, запропоновано методи математичного моделювання та класифікації для використання в космічному рослинництві. Представлено методику вивчення й порівняння способів організації мікробіоценозу в коріннях рослини та біля неї, як в умовах Землі, так і в космічних польотах. Проведено аналіз можливостей математичного моделювання архітектури мікробіоценозів з використанням сучасних методів вимірювань та класифікації. Запропоновано використовувати метод опорних векторів для класифікації зображень мікроценозів з урахуванням процедури валідації. Методи дослідження можуть бути використані в різних областях знань, зокрема в екології та сільському господарстві.

Список використаних джерел

1. Дзержинская И.С., Сопрунова О.Б., Шадрин О.И. Специфические формы жизни техногенных водных экосистем // Материалы международной научной конференции «Автотрофные микроорганизмы», посвященной 75-летию со дня рождения академика Е.Н.

- Кондратьевой., Москва, 13-15 декабря 2000 г. Москва, 2000. -С. 69-70.
2. Кордюм Е.Л., Чепмен Д.К. Растения в космосе.- К.: Академперіодика, 2007.- 216 с.
 3. Кордюм В.А., Мошинец Е.В., Цапенко М.В., Адамчук-Чалай Н.И., Иродов Д.М., Андриенко В.И. Микроорганизмы ризосферы – полный мониторинг // Грунтознавство.- 2008, т. 9, № 1-2, С. 53-63.
 4. Adamchuk N.I., Yatsenko V.A. Plants in space: measurement, modeling, and experiments // 9th Ukrainian conference on space research, Kyiv, 2009.-P.102.
 5. Halstead T.W. and Dutcher F.R. Plants in space. // Annu. Rev. Plant Physiol. -1987. №38.-P. 317-345.
 6. Kacena M.A., Merrell G.A., Manfredi B., Smith E.E., Klaus D.M., Todd P. Bacterial growth in space flight: logistic growth course parameters for *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* // Appl. Microbiol. and Biotechnol. - 1999. - 51, 2. - P. 229-234.
 7. Kordyum E.L. Biology of plant cells in microgravity and under clinostating // Int. Rev. Cytol. - 1997. - 171. - P. 1-78.
 8. Kordyum V.A., Manko V.F., Mashinsky A.L., Nechitailo G.S., Popova A.F. Changes in symbiotic and associative interrelations in a higher plant-bacteria system during space flight // Adv. Space Res. - 1983. - 3 (9). - P. 265-269.
 9. Popova A.F. Submicroscopic organization of *Anabaena azollas* Strasb. Cells under space flight conditions. In: Kosmicheskaya Biologiya i Biotekhnologiya (K.M. Sytnik, Ed.). -Kiev: Naukova Dumka. - 1986. - P. 18-22.
 10. Torguik V., Daase F., Sandaa R.-A., Queas L. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments // J. Biotechnol. - 1998. -64, 1. -P. 53-62.
 11. Yatagai F., Saito T., Takahashi A., Fujie A., Nagaoka S., Sato M., Ohmishi T. Mutation induction in the *rspd* gene on an *Escherichia coli* - *Bacillus subtilis* shuttle vector by space flight on MIR // Abstr. 41-st Annu. Meet. Jap. Radiat. Res. Soc. Nagasaki, Dec. 2-4, 1998. Res.- 1998.-39,4.-P. 415.
 - the 75th anniversary of academician E.N. Kondrateva, Moscow, pp. 69-70.
 2. KORDYUM E.L., CHAPMAN D.K. (2007), *Plants in space*, Academperiodyka, 216 pages.
 3. KORDYUM V.A., MOSHINETS E.V. TSAPENKO M.V. ADAMCHUK-CHALA N.I., IRODOV D.M., ANDRIENKO V.I. (2008), *Rhizosphere microorganisms - full monitoring*, Gruntoznavstvo, Vol. 9, № 1-2, pp. 53-63.
 4. ADAMCHUK N.I., YATSENKO V.A. (2009), *Plants in space: measurement, modeling, and experiments*, 9th Ukrainian conference on space research, Kyiv, p.102.
 5. HALSTEAD T.W. and DUTCHER F.R. (1987), *Plants in space*, Annu. Rev. Plant Physiol, #38, pp. 317-345.
 6. KACENA M.A., MERRELL G.A., MANFREDI B., SMITH E.E., KLAUS D.M., TODD P. (1999), *Bacterial growth in space flight: logistic growth course parameters for Escherichia coli and Bacillus subtilis*, Appl. Microbiol. and Biotechnol., 51(2), pp. 229-234.
 7. KORDYUM E.L. (1997), *Biology of plant cells in microgravity and under clinostating*, Int. Rev. Cytol, #171, pp. 1-78.
 8. KORDYUM V.A., MANKO V.F., MASHINSKY A.L., NECHITAILO G.S., POPOVA A.F. (1983), *Changes in symbiotic and associative interrelations in a higher plant-bacteria system during space flight*, Adv. Space Res., #3(9). pp. 265-269.
 9. POPOVA A.F. (1986), *Submicroscopic organization of Anabaena azollas Strasb. Cells under space flight condition*, In Kosmicheskaya Biologiya i Biotekhnologiya (K.M. Sytnik, Ed.), Kiev, Naukova Dumka, pp.18-22.
 10. TORGUIK V., DAASE F., SANDAA R.-A., QUEAS L. (1998), *Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments*, J. Biotechnol, #64(1). pp. 53-62.
 11. YATAGAI F., SAITO T., TAKAHASHI A., FUJIE A., NAGAOKA S., SATO M., OHMISHI T. (1998), *Mutation induction in the rspd gene on an Escherichia coli - Bacillus subtilis shuttle vector by space flight on MIR*, Abstr. 41-st Annu. Meet. Jap. Radiat. Res. Soc. Nagasaki, #39(4), p. 415

References

1. DZERZHINSKAYA I.S., SOPRUNOVA O.B., SHADRINA O.I. (2000), *Specific forms of lives of technogenic water ecosystems*, Proceedings of the International Conference «Autotrophic microorganisms», dedicated to

Надійшла до редколегії 9.07.14