

Biological treatment is the most common way to remove organic matter from urban wastewater. Biological treatment plants constitute about 55 % of the total number of treatment facilities. In recent decades the tendency to changing the qualitative composition of the urban wastewater has been observed due to increased the proportion of nitrogen and phosphorus-containing organic compounds, presence of high concentrations of heavy metals, synthetic surfactants and other substances. Many biological treatment facilities were designed in the 1950s and met the environmental standards of that period, but currently due to technical reasons are not able to ensure the adherence to the present day norms of allowable discharges of pollutants into natural water reservoirs, including biogenic elements.

Therefore, the development of the techniques aimed at reducing the content of biogenic elements in the biological treatment of urban wastewater has become an urgent task. According to the literature data, the effective method of biogenic elements removal is the use of higher water plants (HWP). There is evidence of the use of certain hydrophytes in the process of biological treatment of municipal wastewater.

Higher water plants significantly affect the chemical properties of water and acts as a biological filter in the process of natural self-purification of water reservoirs. Under the conditions of Polissia region in Ukraine, a number of these plants have been grown for further purifying agricultural and residential wastewater. However, environmental, biological and economic properties of hydrobionts have been insufficiently studied under the conditions of Zhytomyr region. Therefore, the study of hydrophyte application presents a considerable economic interest.

The study was aimed at testing the hydrophytic wastewater treatment, defining the water purification effect in model laboratory systems, and identifying the most promising hydrobionts, suitable for these purposes.

During the research all the indicators showed improvement. In particular, the water transparency rate before loading into the bioreactor was determined as "muddy". In 10-day period its muddiness decreased and the wastewater was characterized as "slightly muddy". Within next fortnight the study showed further improvement of its quality by this indicator and at the end of the study, the water was characterized as "transparent".

The content of suspended particles over the entire period of the research tended to reduce. The amount of suspended particles decreased by approximately one-third in the samples with water plants. The reduction of suspended particles was not recorded in the control sample (within 3 %). Under the conditions of the study, the pH of water during all period of the study amounted to 7.0-7.9. The analysis of nitrogen metabolism was performed taking into consideration possible transformation processes of nitrogen forms, because during the whole research period they tended to vary considerably, which is typical of biological treatment facilities. Obviously, this can be explained by the high content of ammonia nitrogen (0.79-0.83 mg/l) at the beginning of the research and its transformation into nitrite later. The reduction of ammonia content was clearly observed in case of aquatic organism cultivation, during the research period it decreased by one third of the total content, while in the control sample the ammonia content remained practically unchanged.

The similar increased nitrate amount in all the samples was observed for about a month; later the content began to reduce, which meant that the oxidized forms were assimilated by the hydrobionts.

The appearance of oxidized forms of nitrogen indicates a profound process, as their increase with the overall reduction of BOD suggests that carbonaceous compounds are being oxidized.

Phosphate consumption by hydrophytes was quite rapid. The phosphate removal comprised about 80-90 %. In the control sample the phosphates fluctuated slightly and their content decreased by 7 %.

COD and BOD rates reduced by approximately half with hydrobiont-containing samples, and in the control sample the reduction was 10 %.

Iron content in all samples under hydrophytic wastewater treatment also decreased by half. In the control sample iron concentration changed slightly.

In the process of hydrophytic treatment, the decrease of the total mineralization of water was rather slow. At the end of the study the reduction of solids in all samples of hydrophytic treatment was approximately at the same level and amounted to 11-12 %, in the control sample this indicator has changed by only 3 %, which is 7-8 % less than in the samples of hydrophytic treatment.

The best treatment for anionic surfactants was observed in the sample with plants of E species – 60 %, in other samples it was 40-44 %. The reduction of this indicator in the control sample was not observed.

Water hydrophytic treatment techniques, macrophytes of the *Pistia stratiotes* L. and *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms cultivation, which are resistant to aggressive pollutants contribute to our knowledge of water plants use in wastewater rehabilitation in Zhytomyr region.

Key words: biological treatment, pollution hydrophytes, sewage.

Надійшла 15.04.2016 р.

УДК 631.527:577.2:634.21:634.23

ПОЛІЩУК В.В., д-р с.-г. наук

ЩЕРБА І.В., аспірант

Уманський національний університет садівництва

СТЕРИЛІЗАЦІЯ СОМАТИЧНИХ БРУНЬОК ВИХІДНИХ ФОРМ САКУРИ *PRUNUS SERRULATA* L. ДЛЯ ВВЕДЕННЯ *IN VITRO*

Наведено результати досліджень з оптимізації техніки підготовки соматичних бруньок вихідних форм сакури (*Prunus serrulata* L.) для введення *in vitro*, а також підбору стерилізатора, його концентрації, експозиції обробки та інших параметрів проведення ефективної стерилізації. Встановлено особливості застосування загальноновживаних і нових стерилізаторів та підібрано оптимальні режими для ефективної стерилізації соматичних бруньок вихідних форм сакури (*Prunus serrulata* L.).

Доведено, що найефективнішим стерилізатором соматичних бруньок вихідних форм сакури (*Prunus serrulata L.*) є 15 % розчин хлораміну за експозиції 15 хвилин – 90 % стерильного матеріалу.

Ключові слова: вихідний матеріал, сакура, селекція, експлант, стерилізація, *in vitro*, вишня, біотехнологія, інтродукція, квітвання, класифікація, морфологічні ознаки.

Постановка проблеми. Методи культури ізольованих верхівкових меристем успішно використовуються як для оздоровлення рослинного матеріалу від вірусної і грибової інфекцій та нематод, так і для прискореного розмноження цінних генотипів [1].

Технології прискореного розмноження ґрунтуються на тому, що хімічні сполуки групи цитокінінів здатні знімати апікальне домінування і стимулювати закладання й швидкий розвиток бічних пагонів. Мікроклонування *in vitro* дає змогу отримувати в пробірках з живильним розчином велику кількість рослин-регенерантів. Однак кількість загиблих пробіркових рослин після перенесення їх у нестерильні умови залишається для багатьох культур досить великою [2]. В основі методу лежить унікальна здатність рослинної клітини реалізовувати властиву їй тотипотентність. Згідно із науковою термінологією клонування передбачає одержання генетично ідентичних організмів з цілісного організму. Цей метод має низку переваг над існуючими традиційними способами розмноження:

- одержання генетично однорідного садивного матеріалу;
- звільнення рослин від вірусів за рахунок використання меристемної культури;
- високий коефіцієнт розмноження (105–106 – для трав'янистих, квіткових рослин, 104–105 – для кущових та деревних рослин і 104 – для хвойних);
- скорочення тривалості селекційного процесу;
- пришвидшення переходу рослин від ювенільної до репродуктивної фази розвитку;
- розмноження рослин, які важко розмножуються традиційними способами;
- можливість проведення робіт протягом всього року;
- можливість автоматизації процесу вирощування [3].

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Зазвичай, вчені як первинний експлантат використовують верхівкові меристеми трав'янистих рослин: гвоздики, хризантеми, соняшнику, гороху, кукурудзи і т.д. У колишньому Радянському Союзі роботи з клонального мікророзмноження було розпочато в 30-х роках. Під керівництвом Р.Г. Бутенко було вивчено мікророзмноження картоплі, буряку цукрового, гвоздики, гербери та інших рослин і запропоновано промислові технології. В подальшому дослідження з клонального мікророзмноження охопили і деревні рослини [1].

Однак, перші роботи з культури тканин деревних рослин було опубліковано в середині 20-х років ХХ століття, стосовно камбіальних тканин деяких рослин, що здатні до калюсогенезу *in vitro*. Відомо, що деревні, і особливо хвойні рослини характеризуються повільним ростом, складно вкорінюються, містять велику кількість вторинних сполук (феноли, терпени і т.д.), які в ізольованих тканинах активуються. Окислені феноли зазвичай інгібують поділ і ріст клітин, що призводить до загибелі первинного експланту або зменшення здатності тканин деревних рослин до регенерації адвентивних бруньок, яка з віком рослини-донора зникає практично повністю. Нині, не зважаючи на складності, нараховується більше 200 видів деревних рослин із 40 родин, які були розмножені *in vitro* (каштан, дуб, береза, клен, сосна, ялина, секвоя та ін.) [3].

Протягом останніх десятиріч методи біотехнології знаходять все більше застосування в селекції рослин [1–6, 10, 11]. Прискорене розмноження дефіцитних генотипів *in vitro* має сенс лише тоді, коли в процесі мікроклонування спадковість розмножуваної особини залишається недоторканою [5]. Розмноження *in vitro* найбільш вдало поєднує переваги щодо збереження спадковості певних ознак розмножуваних генотипів, зокрема чоловічу стерильність та інші господарчо цінні ознаки, з підвищеними коефіцієнтами розмноження.

У культуру *in vitro* можуть бути введені експланти, заготовлені з різних частин рослини (коренів, пагонів, листків, апікальних меристем тощо), однак кращі результати дає стартовий матеріал зі швидкими темпами росту і розвитку [5, 11]. Процес мікроклонального розмноження, незалежно від типу експлантів, можна умовно розділити на чотири головні етапи: стерилізація рослинного матеріалу і введення експлантів на живильне середовище; проліферація (швидке розмноження); гемо- і ризогенез (індукування розвитку мікропагонів і коренів) та адаптація до нестерильних умов *ex vitro* [11].

Сакура (або вишня дрібнопильчата – *Prunus serrulata* L.) є символом Японії. Цей різновид вишні належить до родини Розових (*Rosaceae* L.). Квітування сакури триває лише сім днів, однак навіть за цей невеличкий проміжок часу японці встигають провести так звані ханами – свята милування квітами [12].

Квітує білими і рожевими квітами в кінці березня, до того як розпускається листя. Період квітування короткий. Найстійкіші квіти тримаються всього тиждень. Потім рослина нічим себе не виділяє. Однак саме в цей тиждень, коли квітує сакура людину переповнюють почуття прекрасного і світлого [12] (рис. 1).

Стерилізація належить до найважливіших компонентів технології розмноження *in vitro*. На поверхні вегетуючої рослини і її частин, листків, бруньок, проростків та інших джерел експлантів, знаходиться велика кількість різноманітних мікроорганізмів.



Рис. 1. Квітування сакури *Prunus serrulata* L.

Ці мікроорганізми здатні рости і розмножуватись на живильному середовищі. У процесі свого росту й розвитку гриби і бактерії не тільки поглинають поживні речовини живильного середовища, а також гальмують ростові процеси в експлантах і в наступному, якщо рослина не загинула, всі біологічні процеси рослини. Тому від якості стерилізації залежить успіх подальшого культивування [1, 4, 11].

У процесі вибору технології стерилізації і власне стерилізатора біотехнолог намагається звільнити поверхню рослинного матеріалу від будь-яких мікроорганізмів, мінімізуючи небезпеку пошкодження експлантів стерилізатором, до складу кожного з яких входять досить токсичні речовини [4, 5, 11].

Метою досліджень було підбір умов стерилізації, як одного з найбільш відповідальних етапів мікроклонального розмноження, та поставлено завдання з'ясувати особливості застосування загальноживаних і нових стерилізаторів та підібрати оптимальні режими для ефективної стерилізації соматичних бруньок вихідних форм сакури (*Prunus serrulata* L.).

Методика досліджень. За експланти використовували соматичні бруньки, які в ламінар-боксі зрізали пропареним за 180–200 °С скальпелем і негайно переносили простерилізованим (разом зі скальпелем) пінцетом на живильне середовище, приготуване за прописом Мурасіге і Скуга [5], яке було модифіковане нами 6-бензиламінопурином (6-БАП) – 1 мг/л. Як стерилізатори використовували хлорамін, дихлорид ртуті (сулему) та септодор-форте з різною концентрацією робочого розчину. Перед стерилізацією експлантів (*Prunus serrulata* L.) проводили промивання рослинного матеріалу милом і стерильною водою 15–20 хвилин, щоб з їхньої поверхні змити зовнішні грибково-бактеріальні інфекції.

Кількість висадженого матеріалу становила 50 штук для всіх видів стерилізації. Решту маніпуляцій з рослинним матеріалом виконували за загальноживаними методиками [1–5, 10].

Результати досліджень та їх обговорення. Дослідженнями встановлено, що за експозиції стерилізації до однієї хвилини вихід стерильних живців не перевищував нуля (табл. 1).

У разі збільшення експозиції від однієї до десяти хвилин майже на одному рівні були стерилізатори дихлорид ртуті 0,05 % і септодор-форте, вихід стерильних–життєздатних експлантів становив близько 50–58 %, а стерилізація рослинного матеріалу хлораміном з концентрацією 10 % давала найменший вихід живців — від 14 до 20 % (рис. 2).



Рис. 2. Розвиток рослин регенерантів сакури *Prunus serrulata* L.

Таблиця 1 – Ефективність стерилізації рослинного матеріалу (*Prunus serrulata* L.) залежно від типу стерилізатора і експозиції, (2014–2015 рр.)

Стерилізатор	Концентрація стерилізатора, %	Експозиція стерилізації, хв	Кількість неінфікованого матеріалу, %	Некроз експланта, %
Хлорамін	5	10	30	–
		15	44	–
		20	26	24
Хлорамін	10	10	14	–
		15	18	–
		20	20	26
Хлорамін	15	10	78	–
		15	90	–
		20	50	–
Дихлорид ртуті (сулема)	0,01	10	12	–
		15	19	–
		20	13	7
Дихлорид ртуті (сулема)	0,05	10	58	–
		15	56	4
		20	4	9
Дихлорид ртуті (сулема)	0,1	10	54	–
		15	46	2
		20	52	4
Септодор-форте	5	10	49	–
		15	58	4
		20	36	8

Найефективнішою стерилізуючою речовиною для введення соматичних бруньок в ізолювану культуру визначено 15 % розчин хлораміну за експозиції 15 хвилин. Вихід стерильних–життєздатних експлантів у цьому варіанті дослідження в середньому складає 90 %.

Також відмічено, що за збільшення експозиції до 20 хвилин, як і у варіанті з сулемою з концентрацією 0,01 %, тканини рослин не витримували навантаження і гинули (рис. 3).



Рис. 3. Некроз експланта *Prunus serrulata* L.

Некроз експланта виявлено в усіх варіантах досліджень, однак найбільшу кількість загиблих живців встановлено для стерилізатора хлорамін 5–10 % за експозиції 20 хвилин.

Висновки. У результаті досліджень доведено, що найефективнішим стерилізатором соматичних бруньок вихідних форм сакури (*Prunus serrulata* L.) є 15 % розчин хлораміну за експозиції 15 хвилин – 90 % стерильного матеріалу.

Збільшення експозиції стерилізації більш як 20 хвилин забезпечувало вихід неінфікованого матеріалу в межах 20–25 %, однак рослини виявилися не життєздатними.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учеб. пособие / Р.Г. Бутенко. – М.: ФБК-Пресс, 1999. – 160 с.
2. Бутенко Р.Г. Культуры изолированных тканей и физиология морфогенеза растений / Р.Г. Бутенко. – М.: Наука, 1964. – 272 с.
3. Катаева Н.В. Клональное микроразмножение растений / Н.В. Катаева, Р.Г. Бутенко. – М.: Наука, 1983. – 93 с.
4. Кунах В.А. Биотехнология лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи / В.А. Кунах. – К.: Логос, 2005. – 730 с.
5. Опалко А.І. Використання методів біотехнології / А.І. Опалко, О.А. Опалко // Селекція плодкових і овочевих культур: навч. посіб.: Ч. 1.: Загальні основи селекції городніх рослин / за ред. А.І. Опалка. – Умань: НДП «Софіївка» НАН України, 2012. – С. 201–233.
6. Сельскохозяйственная биотехнология / В.С. Шевелуха, Е.А. Калашникова, С.В. Дегтярёв и др. – М.: Высш. школа, 1998. – 416 с.
7. Jha T.B. Plant tissue culture: Basic and applied / T.B. Jha, B. Ghosha. – Hyderabad: Universities Press, 2005. – 206 p.
8. Kutas E. The influence of sterilizing compounds on the yield of viable explants of *Rhododendron* L. (Ericaceae) / E. Kutas, L. Ogorodnik // International journal of biodiversity and conservation. – 2011. – Vol. 3, №1. – P. 24–26.
9. Miedema P. Vegetative propagation of *Beta vulgaris* by leaf cuttings / P. Miedema, P.J. Groot, J.N.M. Ziudgeest // *Euphytica*. – 1980. – Vol. 29, № 2 – P. 425–432.
10. Saunders W. A Flexible *in vitro* shoot culture propagation system for sugarbeet that includes rapid floral induction of ramets 1, 2 / J.W. Saunders // Crop science. – 1982. – Vol. 22, № 6. – P. 1102–1105.
11. Singh M.P. Plant tissue culture / M.P. Singh, S. Kumar. – New Delhi: APH Publishing, 2009. – 286 p.
12. Щерба І.В. Морфолого-біологічні особливості вирощування видів *Prunus Serrulata* LINDL. / І.В. Щерба, В.В. Поліщук // Матер. Всеукр. наук. конф. мол. вчених. – Умань, 2015. – 137 с.

REFERENCES

1. Butenko R.G. Biologija kletok vysshih rastenij *in vitro* i biotehnologii na ih osnove: ucheb. posobie / R.G. Butenko. – М.: FBK-Press, 1999. – 160 s.
2. Butenko R.G. Kul'tury izolirovannyh tkanej i fiziologija morfogeneza rastenij / R.G. Butenko. – М.: Nauka, 1964. – 272 s.
3. Kataeva N.V. Klonal'noe mikrorazmnozhenie rastenij / N.V. Kataeva, R.G. Butenko. – М.: Nauka, 1983. – 93 s.
4. Kunah V.A. Biotehnologija likars'kyh roslyn. Genetychni ta fiziologo-biohimichni osnovy / V.A. Kunah. – К.: Logos, 2005. – 730 s.
5. Opalko A.I. Vykorystannja metodiv biotehnologii' / A.I. Opalko, O.A. Opalko // Selekcija plodovyh i ovochevyh kul'tur: navch. posib.: Ch. 1.: Zagal'ni osnovy selekcii' gorodnih roslyn / za red. A.I. Opalka. – Uman': NDP «Sofii'vka» NAN Ukrainy, 2012. – S. 201–233.
6. Sel'skohozijs'tvennaja biotehnologija / V.S. Sheveluha, E.A. Kalashnikova, S.V. Degtjarjov i dr. – М.: Vyssh. shkola, 1998. – 416 s.

7. Jha T.B. Plant tissue culture: Basic and applied / T.B. Jha, B. Ghosha. – Hyderabad: Universities Press, 2005. – 206 p.
8. Kutas E. The influence of sterilizing compounds on the yield of viable explants of *Rhododendron L.* (Ericaceae) / E. Kutas, L. Ogorodnik // International journal of biodiversity and conservation. – 2011. – Vol. 3, №1. – P. 24–26.
9. Miedema P. Vegetative propagation of *Beta vulgaris* by leaf cuttings / P. Miedema, P.J. Groot, J.N.M. Ziudgeest // Euphytica. – 1980. – Vol. 29, № 2 – P. 425–432.
10. Saunders W. A Flexible *in vitro* shoot culture propagation system for sugarbeet that includes rapid floral induction of ramets 1, 2 / J.W. Saunders // Crop science. – 1982. – Vol. 22, № 6. – P. 1102–1105.
11. Singh M.P. Plant tissue culture / M.P. Singh, S. Kumar. – New Delhi: APH Publishing, 2009. – 286 p.
12. Shherba I.V. Morfologo-biologichni osoblyvosti vyroshhuvannya vydiv *Prunus Serrulata LINDL.* / I.V. Shherba, V.V. Polishchuk // Mater. Vseukr. nauk. konf. mol. vchenyh. – Uman', 2015. – 137 s.

Стерилизация соматических почек исходных форм сакуры *Prunus serrulata L.* для введения *in vitro*

В.В. Полищук, И.В. Щербя

Приведены результаты исследований по оптимизации техники подготовки соматических почек исходных форм сакуры (*Prunus serrulata L.*) для ввода *in vitro*, а также подбор стерилизатора, его концентрации, экспозиции обработки и других параметров проведения эффективной стерилизации. Установлены особенности применения общепользуемых и новых стерилизаторов и подобраны оптимальные режимы для эффективной стерилизации соматических почек исходных форм сакуры (*Prunus serrulata L.*).

Доказано, что наиболее эффективным стерилизатором соматических почек выходных форм сакуры (*Prunus serrulata L.*) является 15 % раствор хлорамина при экспозиции 15 минут – 90 % стерильного материала.

Ключевые слова: исходный материал, сакура, селекция, эксплант, стерилизация, *in vitro*, вишня, биотехнология, интродукция, цветение, классификация, морфологические признаки.

Sterilisation of somatic buds of *Sacura Prunus Serrulata L.* initial material for *in vitro* introduction

V. Polishchuk, I. Shcherba

The article presents the results of research on the optimization of the techniques of preparing somatic buds of cherry (*Prunus serrulata L.*) initial forms for introduction *in vitro*, as well as the sterilizer selection, its concentration, processing exposure time and other parameters to perform an effective sterilization. The authors give a description of commonly used and novel sterilizers and their characteristics and describe the optimum conditions for effective sterilization of the initial forms of cherry (*Prunus serrulata L.*) somatic buds.

While selecting a sterilization technique and a sterilizer, a biotechnologist attempts to clear the surface of the plant material from any present microorganisms, minimizing the explants damage risk caused by sterilizers, which contain toxic substances.

The main goal of this research was to tailor the conditions of sterilization, which present one of the most important stages of microclonal propagation as well as to elicit the characteristics of commonly used and novel sterilizers, and to select the optimum conditions for performing the effective sterilization of somatic buds of cherry initial forms (*Prunus serrulata L.*).

Explants were represented by somatic buds of cherry which were cut in the laminar box with a scalpel steamed at 180–200 °C and immediately transferred with sterilized tweezers to a growing medium. The growing medium was prepared according to Murashige and Skoog medium protocol modified with 6-benzyl-aminopurine (6-BAP), 1 mg/ml. The sterilizers used in this research were chloramine, biochloride of mercury and septodor forte of different solution concentration. Prior to sterilization the explants of *Prunus serrulata L.* were treated with soap and pure water for 15–20 min in order to remove surface fungal and/or bacterial contamination.

The amount of the bedded material counted 50 units for all modes of sterilization. The rest of the manipulations with plant material were performed in compliance with the standard procedures.

This research has shown that the sterilization exposure time up to one minute provides no sterile cuttings. With exposure increase from one to ten minutes sterile viable explants output was almost equal for 0.05 % mercury dichloride and septodor forte and amounted about 50–58 %, and sterilization of plant material with 10 % chloramine gave the lowest yield of cuttings varying from 14 % to 20 %.

It has also been noted that exposure time increase up to 20 minutes, as well as 0.01 % mercuric chloride application resulted in plant tissue failure as they could not withstood the load.

Explants necrosis was recorded in all the research variants, but the largest number of dead cuttings demonstrated 5–10 % chloramine sterilizer with 20-minute exposition.

The studies prove that the most effective sterilizer of somatic buds of cherry (*Prunus serrulata L.*) initial forms is a 15 % chloramine solution with 15-minute exposition that allows 90 % output of the sterile material.

Sterilization time increasing up to more than 20 minutes ensured 20–25 % output of non-infected material, but the plants were not viable.

Key words: initial plant material, cherry, plant breeding, explants, sterilization, *in vitro*, biotechnology, introduction, morphological characteristics.

Надійшла 25.04.2016 p.