

Міністерство освіти і науки України
Національний університет «Києво-Могилянська академія»
Факультет природничих наук
Кафедра Лабораторної діагностики

Магістерська робота
освітній ступінь – магістр

на тему: **«ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ РІЗНИХ ДОЗ ЦИКЛІЧНИХ
ХЛОРООРГАНІЧНИХ ПЕСТИЦИДІВ ТА ПРОДУКТІВ ЇХ МІКРОБНОЇ
ДЕСТРУКЦІЇ НА КЛІТИНИ І ТКАНИНИ (*LYCOPERSICON
ESCULENTUM MILL.*) В УМОВАХ КУЛЬТИВУВАННЯ *IN VITRO*»**

Виконала студентка 2-го року
навчання

Галузі знань: 09 Біологія

Спеціальності: 091 Біологія

Освітньо-наукової програми:

Лабораторна діагностика біологічних систем

Соколова Наталія Олегівна

Науковий керівник від установи: к.б.н.,
старший науковий співробітник, Шиша О.М.

Науковий керівник від кафедри:

к.х.н., доцент, Антонюк Н.Г.

Рецензент Циганкова В.А.

Магістерська робота захищена
з оцінкою _____

Секретар ЕК Пахаренко М.В.

«01» червня 2022 року

Київ – 2022

ЗМІСТ

Перелік умовних скорочень.....	4
ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	9
1.1. Загальна характеристика томатів.....	9
1.1.2. Особливості культивування <i>in vitro</i> рослин томатів.....	11
1.3. Хлорорганічні пестициди, їх класифікація та вплив.....	14
1.3.1. Характеристика гексахлорбензолу (ГХБ) та гексахлорциклогексану (ГХЦГ).....	18
1.4. Мікроорганізми-деструктори хлорорганічних пестицидів.....	19
1.4.1. Характеристика штаму <i>Bacillus megaterium</i>	25
1.4.2. Характеристика штаму <i>Pseudomonas putide</i>	26
1.4.3. Характеристика штаму <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	26
1.4.4. Характеристика штаму <i>Camamonas testosteroni</i>	27
РОЗДІЛ 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	28
2.1. Матеріали та методи досліджень.....	28
2.1.1. Рослинний матеріал.....	28
2.1.2. Реактиви та обладнання.....	28
2.1.3. Живильні середовища для культивування тканин і рослин томатів <i>in vitro</i>	30
2.1.4. Введення в культуру <i>in vitro</i> <i>Lucopersicon esculentum</i> Mill.....	30
2.1.5. Регенерація томатів.....	31
2.1.6. Укорінення рослин-регенерантів томатів в умовах <i>in vitro</i>	32
2.1.7. Статистична обробка даних.....	32
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	33
3.1. Введення в культуру <i>in vitro</i> та визначення впливу різних доз циклічних хлорорганічних пестицидів та продуктів їх мікробної деструкції на клітини і тканини <i>Lucopersicon esculentum</i> Mill. <i>in vitro</i>	33
3.1.1. Стерилізація насіння та отримання паростків.....	33

3.1.1.2. Вплив гексахлорбензолу та гексахлорциклогексану на пророщування насіння томатів (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill) сорту Лагідний.....	34
3.1.2. Залежність пагоноутворення від складу живильного середовища.....	34
3.1.2.1. Вплив гексахлорбензолу та гексахлорциклогексану на індукцію морфогенезу у культурі <i>in vitro</i> <i>L. esculentum</i> сорту Лагідний.....	36
3.1.2.2. Вплив продуктів деструкції ГХБ та ГХЦГ на морфогенетичний потенціал експлантів гіпокотилів томатів.....	46
3.2. Морфологічні особливості отриманих рослин.....	53
ВИСНОВКИ.....	56
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	57

Перелік умовних скорочень

ГХЦГ – гексахлорциклогексан

ГХБ – гексахлорбензол

МС – живильне середовище Мурасіге і Скуга

ІОК – індоліл-оцтова кислота

Зеа – зеатин

ДДТ – дихлордифенілтрихлоретан

ДДЕ – дихлордифенілдихлоретилен

ДДД – дихлордифенілдихлоретан

ХОП – хлорорганічні пестициди

ФОП – фосфорорганічні пестициди

ЦНС – центральна нервова система

УФ – ультрафіолетове випромінювання

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

РНК – рибонуклеїнова кислота

ОКР – обсессивно- компульсивного розладу

ПАР – поверхнево-активна речовина

ВСТУП

Однією з найсерйозніших проблем сучасності є глобальне хімічне забруднення біосфери, що породжує загрозу техногенних катастроф і може завдати значної шкоди оточуючому середовищу та здоров'ю людей. Особливу небезпеку становлять хімічні сполуки, що потрапляють у довкілля у результаті діяльності великих промислових комплексів, які є потужними джерелами практично всіх видів забруднень: механічних, хімічних, фізичних, біохімічних. Відомо, що засоби хімічного захисту рослин (пестициди), застосовують для боротьби проти збудників захворювань, шкідників та бур'янів. Окрім своєї прямої дії на шкідливі організми, вони є токсичними речовинами, що негативно впливають також на нецільові об'єкти. Більшість цих сполук виявляють мутагенну, канцерогенну, тератогенну і алергенну активності, у зв'язку з чим питання їх трансформації і біодеградації в агроєкосистемах є на сьогодні актуальним [1].

Одними з найбільш небезпечних речовин штучного походження є хлорорганічні пестициди [2]. У природних умовах вони слабо піддаються розпаду через свою високу стійкість до хімічного, біологічного та фотолітичного розкладу. Поширення цих стійких органічних сполук несе шкоду здоров'ю людей та стану біосфери навіть там, де вони не застосовувалися [2]. Поширеними забрудненнями серед хлорорганічних сполук є гексахлорциклогексан (ГХЦГ) та гексахлорбензол (ГХБ).

Гексахлорциклогексан (ГХЦГ) – інсектицид для боротьби із шкідниками зернових культур, садів та лісових насаджень, з паразитами тварин. ГХЦГ є сумішшю α , β , γ , σ , ϵ , ζ , η , θ - ізомерів; γ -ізомер (торгова марка Ліндан) найбільш агресивний з цих токсичних сполук. Ізомери ГХЦГ мають виражені кумулятивні властивості, затримуючись в органах та тканинах організму.

Гексахлорбензол (ГХБ) накопичується у ґрунті після обробки рослин та у вигляді промислового відходу. Крім того, відомо, що хлорбензоли використовують у великих кількостях як хімічні проміжні продукти у виробництві знежирювачів, розчинників та дезодорантів. Гексахлорбензол добре зв'язується з ґрунтом і здатен шляхом розповсюдження часток ґрунту у повітрі поширюватися на значні відстані. При потраплянні в ґрунт ГХБ, як і інші пестициди, включається у фізико-хімічні і біологічні процеси, швидкість перебігу яких зумовлюється комплексом абіотичних і біотичних факторів. До перших відносяться температура, вологість, випаровування, міграція, сорбційно- десорбційні процеси, до других – біохімічні процеси, мікробна деструкція і поглинання вищими рослинами. ГХБ, потрапляючи у навколишнє середовище, порушує стан [3].

На сьогодні застосування цих сполук в Україні та більшості європейських країн заборонене Стокгольмською конвенцією щодо стійких органічних забруднень. Протягом останніх десятиліть у сільському господарстві для хімічного захисту рослин від хвороб і шкідників широко використовували хлорорганічні пестициди, що призвело до їх накопичення у великій кількості у ґрунтах. Зважаючи на це актуальним є питання впливу залишкових кількостей хлорорганічних токсикантів (у тому числі, ГХБ і ГХЦГ) на живі об'єкти екосистем, в першу чергу, на ґрунтову мікробіоту і рослини. Ґрунтові мікроорганізми є активними компонентами екосистем, вони здійснюють ряд важливих біосферних функцій, беручи участь у кругообігу основних біогенних елементів: азоту, вуглецю, фосфору, сірки та ін.

Не менш важливою є їхня функціональна роль у мікробно-рослинних системах: фіксація атмосферного азоту, трансформація важко розчинних фосфатів ґрунту в доступну рослинам форму, антагонізм та індукція стійкості рослин до фітопатогенів і шкідників. Ґрунтові мікроорганізми є основними агентами формування родючості ґрунтів, процесів трансформації гумусу, деструкції різних ксенобіотиків.

Важливого значення у зазначених функціях відіграє біорізноманітність ґрунтового мікробіому. Мікробіоценози ґрунтів реагують на пестицидне навантаження за показниками чисельності мікроорганізмів, загальної мікробної біомаси та співвідношенню функціональних груп мікроорганізмів у біоценозі [4-5]. Враховуючи зазначене вище, можна сказати, що ґрунтові мікроорганізми є чутливими біоіндикаторами хлорорганічного забруднення завдяки здатності швидко реагувати на зміни стану оточуючого середовища. Вивчення реакції ґрунтових мікробних угруповань на забруднення ГХБ заслуговує уваги дослідників. Відомо, що ґрунти різних типів характеризуються певними специфічними умовами, які впливають на формування і функціонування мікробіоти. Стійкість мікробних угруповань ґрунтів різних типів в Україні до забруднень ГХБ залишається мало вивченою [6].

Проблема знешкодження у ґрунтах цих пестицидів є актуальною на сьогоднішній день у зв'язку з їх високою стійкістю до деструкції та негативним впливом на компоненти біологічних систем. Перспективним та економічно вигідним методом детоксикації хлорорганічних забруднень у навколишньому середовищі є біологічний метод. Він полягає у використанні мікроорганізмів як деструкторів ксенобіотиків для перетворення і утилізації залишків пестицидів до екологічно-безпечних сполук без великих економічних витрат [7-8].

Встановлено здатність розкладати хлорорганічні пестициди окремими представниками родів *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Nitrococcus*, *Clostridium*, а також грибами *Trichoderma*, *Penicillium* [9]. У процесі деструкції мікроорганізми можуть використовувати пестициди як ростові або неростові субстрати. Якщо пестициди виступають як неростові субстрати, їх деструкція відбувається при одночасному використанні мікроорганізмами додаткових джерел живлення та енергії, або в присутності сполук, що відіграють роль індукторів ферментів, які необхідні для деградації пестицидів. Мікроорганізми здатні здійснювати перетворення широкого

спектру пестицидів за наявності в середовищі, окрім токсиканту, ростового субстрату. При кометаболізмі пестицидів як ростові субстрати використовують вуглеводи, спирти, органічні кислоти та інші [10].

Актуальним завданням є наукове обґрунтування заходів очищення забруднених ґрунтів біотехнологічними методами із застосуванням мікроорганізмів-деструкторів.

У зв'язку з викладеним, метою проведених робіт було визначення токсичності пестицидів ГХБ, ГХЦГ та їх продуктів деструкції в умовах культивування *in vitro* ізольованих клітин сільськогосподарських рослин. Для цього було поставлено такі задачі:

1. Дослідити вплив гексахлорциклогексану та гексахлорбензолу на процес пророщування насіння та морфогенез у культурі *in vitro* із сегментів гіпокотилів томатів.
2. Визначити вплив продуктів мікробної деструкції гексахлорциклогексану та гексахлорбензолу на морфогенетичний потенціал томату в умовах *in vitro*.
3. Дослідити вплив хлорорганічних пестицидів та продуктів їх мікробної деструкції на морфофізіологічні параметри отриманих ліній томату в умовах *in vitro*. Порівняльний аналіз отриманих ліній.

Об'єктом наукового дослідження виступає реалізація морфогенетичного потенціалу експлантів гіпокотилів за дії хлорорганічних пестицидів та продуктів їх деструкції та особливості морфологічних показників отриманих рослин томатів.

Предметами є представник дводольних рослин (*Lycopersicon esculentum* Mill.) сорту Лагідний, хлорорганічні пестициди – гексахлорциклогексан (ГХЦГ) і гексахлорбензол (ГХБ), продукти мікробної деструкції ГХЦГ, отримані за допомогою життєдіяльності штамів культур *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas putide* 3, *Stenotrophomonas maltophilia* 6 та продукти деструкції ГХБ, отримані за допомогою жттєдіяльності штамів культур *Comamonas testosteroni* УКМ В-400 і *Comamonas testosteroni* УКМ В-401.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика томатів

Томат є однією з комерційно важливих сільськогосподарських рослин та займає друге місце, після картоплі. Томати вирощують у всьому світі, і серед двадцятки світових лідерів Україна займає шосте місце за продукцією томатів. Томат є однією з найбільш широко вирощуваних і споживаних продовольчих культур у світі з щорічним світовим виробництвом близько 170 мільйонів тонн, лише в Україні за 2019 рік було зібрано 2,2 мільйонів тонн [11].

Згідно даних Національної інформаційної бази департаменту сільського господарства США (NAL USA) плоди томатів мають лікувальну цінність і використовується для очищення крові та лікування хвороб травлення, завдяки тому, що томати збагачені мікро- та макро- елементами: калій, кальцій, магній, натрій, фосфор, сірку, хлор, цинк, залізо, мідь та йод. Також вони містять вітаміни: А, Е, групи В (В1, В3 (РР), В5, В6, В7 (Н), В9 (Вс)), але найбільший вміст вітаміну С (25 мг/100 г). Томат вважається захисним продуктом, оскільки він забезпечує біологічно активними речовинами таких як бета-каротин та лікопін – ці дві речовини мають антиалергенні, антимікробні, протизапальні, антитромботичні, але найголовнішими властивостями є антиоксидантні, які відіграють важливу роль при захисті від вільних радикалів клітинних оболонок, протиракові властивості, які перешкоджають росту та розмноженню ракових пухлин, також судинорозширювальні властивості і допомагають людям із серцево-судинними захворюваннями знижувати тиск і запобігають розвитку цих хвороб [11-12].

Ботанічна назва томату *Lucopersicon esculentum* Mill, яка являється однорічною трав'янистою рослиною із розгалуженим стеблом висотою від 30 см до 2 м та розвинутою стрижневою кореневою системою, яка проникає в ґрунт на глибину до 1 м. Листки непарноперисті, розсічені на великі долі.

Рослини томатів дуже вимогливі рослини до світла та до тепла. Оптимальною температурою для неї є 22–27°C, залежно від фази росту й розвитку, інтенсивності освітлення, сортових особливостей тощо. Проростання насіння починається за температури 10-15°C, оптимальною для вегетації є температура 20-25°C. За температури нижче 10°C ріст і розвиток рослин припиняється. За підвищеної температури понад 30°C та низької відносної вологості повітря процес фотосинтезу сповільнюється. Дуже високі, понад 33-35°C, та низькі, нижче 10°C, температури знижують інтенсивність метаболічних процесів [13].

Для інтенсивного росту та плодоношення тривалість світлового дня повинна становити не менше 12 год, бажаний 16 год фотоперіод. Також томат є дуже чутливою культурою до рівня зволоженості ґрунта та повітря. Досягнення високих рівнів зволоженості насіння та врожаю можливе лише при зрошенні, але надмірне зволоження, при надмірному поливі, чи вологості повітря вище 60%, негативно вплине на ростові процеси, ефективність запилення, також це призводить до збільшення кількості хворих рослин [11-13].

За тривалістю періоду досягання плодів розрізняють ранньостиглі (80-100 днів), середньоранні (100-115), середньостиглі (115-125) та пізньостиглі (125-145 днів) томати. В умовах надмірного зволоження, у весняний та осінній період, збільшується вірогідність зараження різними фітопатогенами ранньостиглих, середньоранніх та пізньостиглих сортів томатів [14].

1.1.2. Особливості культивування *in vitro* рослин томатів

Початком культури рослинної тканини є «клітинна теорія», яка була запропонована Маттіасом Шлейденом і Тодером Шванном у 1838 році, яка являє собою теорію, згідно з якою будь-яка рослинна клітина має здатність утворюватися і, таким чином, з клітини можна отримати повне тіло рослини. Готліб Габерландт виділив і асептично розмножив клітини з різних рослинних тканин для отримання ідентичних популяцій рослин. Через кілька років був створений метод культивування калюсу, який міг би продовжувати рости на моркві та тютюні. У 1948 році Скут і його колеги підтвердили, що органогенез можливий в культурі калюсу. Нарешті, в 1965 році з однієї клітини тютюну була отримана повна рослина, і було виявлено, що здатність до стереотипу існує в клітинах рослин [15].

Клітини рослинної тканини мають «тотипотентність», тобто потенціал для регенерації в повну батьківську (оригінальну) рослину на відповідному живильному середовищі [16]. Культура рослинної тканини — це метод культивування, який використовує характерні властивості клітин рослин. Культура рослинної тканини — це отримання цілої рослини шляхом вилучення або виділення частини рослини з клітин, тканин, органів і зародків рослинних тканин в асептичних умовах [17]. Якщо регулятори росту, такі як ауксин, цитокінін і поживні речовини, надходять у стерильну посудину для культивування, більшість рослинних клітин починає ділитися, і одна і та ж особина може вироблятися у великих кількостях [16-18].

Для покращення сортів томатів використовуються сучасні біотехнологічні підходи, а саме мікроклональне розмноження *in vitro*, що дає можливість отримати рослини з генетично ідентичним вихідним матеріалом батьківській формі, що сприяє підтримці генетично однорідного рослинного матеріалу, що важливо для дослідження рослинного матеріалу. Розмноження промислово цінних сортів томатів *in vitro* сприяє отриманню безвірусного рослинного матеріалу та генетичній трансформації для

отримання стійких форм рослин томатів до абіотичних та біотичних факторів [19]. Процес регенерації є основою біотехнологічних підходів до вирощування будь-якої рослини *in vitro*.

Регенерація *in vitro* – це процес, під час якого нові клітини, органи і навіть цілі рослини утворюються з окремих частин рослини при пошкодженні [20]. Процес, за допомогою якого нові тканини та органи утворюються та розвиваються з недиференційованої ділянки на експлантах, називається органогенезом. Органогенез відбувається в результаті дедиференціювання клітин і реорганізації клітинного поділу з утворенням зачатків і меристем органу, а також приєднання нового органу до судинної мережі. Під час регенерації рослинні клітини проходять етапи дедиференціації, трансдиференціації, поділу клітин і загибелі клітини [20].

Щоб отримати цілу рослину, можна використовувати два типи клітин:

1. Ізольована клітина в стані активного поділу з ембріональної, недиференційованої, неспеціалізованої тканини меристеми. Такими тканинами є верхівкові меристеми пазушних або спокійних бруньок ніжки;
2. Ізольовані спеціалізовані тканини, які пройшли процес диференціювання. Такі клітини утворюють мезодермальну та епідермальну тканини експланту. При цьому *in vitro* виникають ініційні меристемоїдні ембріональні клітини, відбувається соматичний ембріогенез, утворюються бруньки або зародки, з яких утворюється рослина, і відбувається процес розмноження рослини.

Етапи мікроклонального розмноження:

1. Відбір рослини-донора, виділення та стерилізація експлантату, створення умов для його зростання на живильному середовищі *in vitro*.
2. Розмноження, яке можливе декількома шляхами:
 - стимуляція розвитку всіх пазушних бруньок експланта в результаті придушення верхівкового домінування як первинного пагона, так і знову з'явилися;
 - мікрорізи пагона із збереженням верхівкового домінування;
 - стимулювання утворення мікро- бульб та цибулин;

- індукція утворення придаткових бруньок тканинами листка, стебла, луски, кореневищ, зачатків суцвіть;

3. Укорінення розмнжених пагонів та пристосування пробірок до посадки *in vivo*.

4. Вирощування рослин і перенесення їх у ґрунт або штучний субстрат у теплиці.

5. Підготовка до продажу або посів на полях.

Відбір експлантів має першорядне значення для успішного мікроклонального розмноження рослин. Найкраще використовувати матеріал із здорових, сильнорослих з оптимальними умовами для зростання рослин. Вибір експлантів залежить від типу біоматеріалу, стадії розвитку рослини та пори року. Незрілі молоді органи завжди більш пластичні, ніж старіючі, зрілі тканини з точки зору їхньої здатності до морфогенезу *in vitro* [20-21].

При відборі експлантів перевагу слід віддавати меристематичним тканинам, оскільки вони швидко адаптуються до умов ізолюваної культури, мають високу швидкість росту та тотипотентність. Розмір експлантату залежить від типу біоматеріалу і коливається від 0,1 мм до 1,0 см. Апікальна меристема являє собою конус росту з активно діляться клітин висотою 0,1 мм і шириною 0,25 мм, який важко відокремити без пошкоджує і викликає ріст. Тому меристема і одно- або дволисткові рослини часто фактично роз'єднуються. Більші експланти краще виживають і швидше збільшують масу рослинної речовини в культурі *in vitro* [22].

Перед виділенням меристем і введенням в ізолювану культуру кінчики пагонів стерилізують спеціальними стерилізаторами, ефективними для певного виду та типу тканин. Виділення меристем проводять у стерильному ламінарному боксі за допомогою біокулярного мікроскопа зі збільшенням від 20х до 40х окуляру. Для відокремлення меристем використовують такі інструменти, як голки для розсічення, леза, пінцети з тонкими наконечниками тощо [22].

Меристему ізолюють, утримуючи верхівки пагонів на столику мікроскопа за допомогою пінцета однією рукою, утримуючи голку іншою рукою та вставляючи натиснувши на неї виділяють прилеглі меристеми листочки та листові примордії, або за допомогою леза виділяють меристему разом з декількома листовими примордіями [22]. Для цього роблять чотири надрізи перпендикулярно до основи меристеми. Ізольований експлант поміщають на поверхню живильного середовища в культуральну пробірку і піддають контрольованим умовам росту.

За мікроклональним розмноженням розрізняють два види клонування: вертикальне і горизонтальне [22]. Тип залежить від спрямованості розвитку і росту біоматеріалу та формування вегетативних бруньок. Вертикальний режим клонування характерний для тканин з ауксиновою природою. Для цього типу тканини в середовище росту додатково вводять високі концентрації ауксинів, які стимулюють розвиток апікальної меристеми та пригнічують утворення бічних пагонів. Матеріал швидко розростається, утворюючи єдине центральне стебло з листям [22].

У фазі 7-10 листків рослину можна клонувати. Його виймають з пробірки і гострим скальпелем поділяють на клони. Кожен клон має частину стебла з листком. Похилий матеріал висаджують на свіже живильне середовище, що стимулює розвиток бічної бруньки, розташованої між стеблом і листовим живцем. Цей вид клонування дозволяє отримати 7-10 клонів з однієї рослини [22-25].

1.2. Хлорорганічні пестициди, їх класифікація та вплив

Відповідно до харчових і сільськогосподарських організацій, термін “пестицид” був визначений як будь-яка речовина або суміш речовини, призначені для запобігання чи боротьби з будь-яким шкідником і включає будь-яку речовину або суміш речовин призначений для використання як

регулятор росту рослин, дефоліант або призначений тваринам для стимуляції їх росту або для модифікації їхньої репродуктивної поведінки [26].

Хлорорганічні пестициди (ХОП) зазвичай класифікуються як хлоровані циклодієни, хлордифенілетани, хлоровані бензоли та циклогексани. Наявність залишків ХОП в харчових продуктах, воді, ґрунті, осадах, сироватці крові і повітря викликало сплеск глобального інтересу. Протягом багатьох десятиліть ХОП застосовуються для знищення шкідників і переносників хвороб у сільському господарстві, побуті та в охороні здоров'я [26-27]. Таким чином, це призвело до високої врожайності та покращення стану здоров'я населення шляхом ліквідації переносників ендемічних хвороб [27]. Однак ХОП викликають серйозні екологічні проблеми, ймовірно, через способи застосування та прямий вплив на цільові та нецільові організми [28]. Вони характерно повсюдно поширені, гідрофобні, стійкі та стійкі до деградації [28-30].

Ліпофільна здатність ХОП дозволяє їм прикріплюватися до жирових тканин тіла тварин і людини. Ця властивість також відповідає за їх стійкість у навколишньому середовищі через накопичення у воді, відкладеннях, ґрунті та рослинах. Накопичення ХОП в тканинах тварин стало проблемою глобальних дебатів з точки зору пов'язаних ризиків для здоров'я. ХОП можуть зосереджуватися безпосередньо в тканинах риби з навколишньої води та раціону, що утрудняє оцінку перенесення забруднюючої речовини через харчовий ланцюг [30]. ХОП стійкі до фізичного, мікробіологічного, хімічного або фотохімічного руйнування [31] та їх транспортування на великі відстані зробили їх забруднювачами локальних, регіональних та глобальних явищ.

Дослідження вказали на їхню присутність в арктичному регіоні внаслідок транспортування на великі відстані [32]. Це переміщення на велику відстань пояснювалося такими властивостями, як хімічна стабільність і напівлетучість [31-32]. У опублікованій літературі повідомлялося про появу ХОП у більш високих широтах Північної півкулі

[32]. Кілька досліджень задокументували залежну від температури реакцію ХОП у високогірних районах. У Південній півкулі було мало даних щодо температурно-залежного перенесення в регіоні. Проте повідомлялося про ХОП у далеко холодних районах Антарктиди [32].

ХОП потрапляють у навколишнє середовище з побутових, промислових та сільськогосподарських джерел. Вони становлять значну загрозу для здоров'я людини та екосистеми через потенціал біоаккумуляції та токсичності в організмах. Проблеми зі здоров'ям, пов'язані з ХОП, включають неврологічні ураження, рак, порушення роботи ендокринної системи, пригнічення імунної системи та смерть. У всьому світі отруєння пестицидами спричиняє щонайменше 220 000 смертей на рік. Незважаючи на заборону виробництва та застосування ХОП у багатьох країнах; вони все ще широко використовуються в багатьох країнах, що розвиваються.

Дослідження показали присутність ХОП у зразках навколишнього середовища у вищій концентрації, ніж фосфорорганічні пестициди (ФОП) у районах, де ХОП постійно використовуються для боротьби зі шкідниками. Останні дослідження повідомили про ХОП у воді, ґрунті, відкладеннях, рослинах, рибах та зразках тварин. Високі рівні ХОП також були виявлені в рідинах організму, включаючи грудне молоко, сечу та сироватку. Повідомлень про дослідження щодо оцінки ризику для здоров'я ХОП мало. Більшість досліджень, проведених на ХОП, були засновані в основному на рівнях і розподілах у зразках навколишнього середовища.

Ці хімічні речовини стійкі до розкладання або деградації, якщо в молекулі не присутні кисень або азот. Екологічно стійкий характер ХОП змусив їх поступово виключити, а потім замінити менш стійкими, фосфорорганічними та карбаматними пестицидами. Три типи хлорорганічних інсектицидів:

1. Дихлордифенілетани, наприклад дикофол (кельтан), дихлордифенілтрихлоретан (ДДТ), дихлордифенілдихлоретилен (ДДЕ), дихлордифенілдихлоретан (ДДД), метлохлор та пертан.

2. Хлоровані циклодиєни, наприклад альдрин, ділдрин, ендрин, хлордан, ендосульфан і гептахлор.

3. Хлоровані бензоли та циклогексани, наприклад хлордекон, гексахлорциклогексан (ГХЦГ), гексахлорбензол (ГХБ), мірекс і токсафен.

Існує багато впливу ХОП на здоров'я, що варіюється від гострих до хронічних захворювань. Важко прив'язати конкретну проблему здоров'я до певного ХОП, коли існує кілька шляхів впливу. Хлорорганічні пестициди знаходяться в тканинах людського організму, де вони повільно розпадаються, накопичуються в жирових тканинах і залишаються в організмі людини протягом тривалого періоду часу. Епідеміологічні дослідження пов'язують хвороби Паркінсона з впливом ХОП.

Агенція з охорони довкілля США (USEPA) класифікувала альдрин і ділдрин як ймовірні канцерогени для людини на основі досліджень на тваринах, тоді як Міжнародне агентство з досліджень раку (IARC) не змогло визначити канцерогенний потенціал цих ХОП.

Повідомлялося, що тривалий вплив помірних рівнів алдрину або ділдрину викликає дратівливість, головні болі, запаморочення, хронічні судоми, блювоту та неконтрольовані рухи м'язів. Прийом високих доз альдрину та ділдрину спричинив судоми чи інші ефекти нервової системи та пошкодження нирок.

Гептахлор був класифікований як можливий канцероген для людини і позначений як клас 2В. Було виявлено, що він викликає пухлини печінки у мишей і щурів. Тварини піддаються впливу гептахлорепоксид під час вагітності та в дитинстві викликав зміни в нервовій системі та імунну дисфункцію. У новонароджених тварин, які зазнали впливу високих доз гептахлору, перед смертю вперше виявлялося зниження маси тіла. Хлордан пов'язують з репродуктивними та імунотоксичними ефектами у дикої природи. Вплив хлорданових сполук на здоров'я включає мігрень, респіраторні інфекції, діабет, тривожність і депресію. Ендосульфан є суперечливим агрохімікатом через його гостру токсичність, потенціал

біоаккумуляції та його роль як ендокринного порушника. З іншого боку, повідомляється, що ДДЕ зв'язує рецептори ендогену у тварин. Вивчення Wolff та ін. (1993) виміряли значно вищу концентрацію ДДЕ у зразках крові пацієнтів з раком молочної залози, ніж у контрольних суб'єктів. Кілька досліджень повідомили про зв'язок між впливом обсесивно-компульсивного розладу (ОКР) і раком молочної залози. Огляд про Бачелет та ін. (2011) продемонстрували роль ХОП в етіології раку молочної залози.

Використання моделей на тваринах показало, що вплив ДДТ/ДДЕ в ранньому віці був пов'язаний зі зниженням когнітивних або поведінкових функцій у подальшому розвитку. Репродуктивний та нейротоксичний потенціал ДДТ був продемонстрований як у хребетних, так і у безхребетних [ВООЗ, 2003]. Була задокументована потужна естрогенна активність ДДТ у ссавців [33]. Рівні глюкози в сироватці крові ДДТ і ДДЕ були пов'язані зі збільшенням поширеності цукрового діабету серед американців мексиканського походження [33].

Хлоровані бензоли в організмі людини можуть викликати захворювання печінки, ураження шкіри, виразки, випадання волосся та пошкодження щитовидної залози [33].

1.2.1. Характеристики гексахлорбензолу (ГХБ) та гексахлорциклогексану (ГХЦГ)

Хлорорганічні пестициди, а саме ГХБ та ГХЦГ мають виражені кумулятивні властивості, затримуючись в органах та тканинах організму. Накопичуються у ґрунті після обробки рослин та у вигляді промислового відходу. Крім того, відомо, що хлорбензоли використовують у великих кількостях як хімічні проміжні продукти у виробництві знежирювачів, розчинників та дезодорантів. Також дані пестициди добре зв'язується з ґрунтом і здатні шляхом розповсюдження часток ґрунту у повітрі поширюватися на значні відстані. При потраплянні в ґрунт ГХБ, як і інші

пестициди, включається у фізико-хімічні і біологічні процеси, швидкість перебігу яких зумовлюється комплексом абіотичних і біотичних факторів.

Хлорні або хлоровані вуглеводневі пестициди в основному поділяють на три групи. Групи які структурно пов'язані з лінданом (γ -гексахлорциклогексаном), з ДДТ і альдрином відносяться до групи хлорованих циклодієнів. Дихлорбензонітрил відноситься до групи галогенованих нітрilів. Загалом, хлорні пестициди надзвичайно хімічно стабільні і лише повільно розкладаються в навколишньому середовищі. Усі хлорні пестициди до певної міри токсичні та екологічно небезпечні. В основному це циклічні хлоровані вуглеводні до інсектицидів (ліндан, ДДТ, Дрин, ендосульфат, метокси- і гептахлор).

Ліндан та ДДТ були відкриті під час Другої світової війни як недорогі, високоефективні інсектициди та поклали початок «підйому» хлорорганічних пестицидів до вісімдесятих років.

Стокгольмська конвенція про СОЗ, згідно з якою гексахлорбензол та гексахлорциклогексан заборонені до використання в усьому світі.

Гексахлорбензол (ГХБ, C_6Cl_6 ; 284,8 г/моль) – безбарвні кристали, нерозчинні у воді, малорозчинні в етанолі і бензолі. Порівняно легко вступає в реакції нуклеофільного заміщення, обмінюючи один атом Cl, наприклад, на групи CH_2OH , OH , SH . Отримують гексахлорбензол хлоруванням бензолу або його хлорпохідних.

Дослідження на людях і тварин показали, що ГХБ, проникаючи через плацентарний бар'єр, накопичується в тканинах плода. Повідомлялося, що ГХГ провокує гематологічні проблеми, такі як анемія, лейкопенія, лейкоцитоз, гранулоцитоз, еозинофілія, моноцитоз і тромбоцитопенія [ВООЗ, 2003]. ГХБ викликав у людей апластичну анемію. Дослідження задокументували апластичну анемію у людини, яка зазнала впливу на шкіру ГХБ під час лікування корости. Вплив великої кількості ліндану може завдати шкоди нервовій системі, викликаючи ряд симптомів від головного болю і запаморочення до судом, судом і смерті. Пренатальний вплив ГХГ

корелює зі зміненим рівнем гормонів щитовидної залози, що може вплинути на розвиток мозку.

Дослідження показали, що всі ізомери гексахлорциклогексану можуть викликати рак у людей [USEPA, 2002]. Дослідження показало, що ХОП викликає антианδροгенні ефекти у чоловіків і естрогенні ефекти у жінок.

Гексахлорциклогексан (ГХЦГ, $C_6H_6Cl_6$; 290,83 г/моль) - білий кристалічний порошок, температура плавлення 112,8С. Розчинність у воді - 10 мг/л. Леткий. Не руйнується сильними кислотами. Стійкий до дії світла та води, вибухонебезпечний. Вперше гексахлорид бензолу був отриманий в 1825 році; інсектицидні властивості були ідентифіковані в 1944 році з γ -ізомером, який приблизно в 1000 разів токсичніший, ніж будь-який з інших діастереомерів.

ГХЦГ один з найбільш широко використовуваних циклічних насичених хлоруглеводневих інсектицидів. Його використовували для захисту посівів, що стоять, від різних сільськогосподарських шкідників. Використання ГХЦГ дійсно принесло переваги, однак незвичне виробництво інсектицидного ізомеру; γ -ГХЦГ (ліндан), завдяки своїй стійкій природі, біоаккумулятивним властивостям, а також токсичності для нецільових організмів, і нерегульована утилізація бруду ГХЦГ створили різноманітні сміттєзвалища по всьому світу, що призвело до серйозних екологічних проблем. Ізомери ГХГ були визнані можливими канцерогенами та ендокринними деструкторами людини з доведеною тератогенною, мутагенною та генотоксичною дією, що робить його дезактивацію обов'язковою.

ГХЦГ отримують шляхом фотохлорування бензолу в присутності ультрафіолетового світла (УФ). Виробництво цієї насиченої циклічної сполуки призводить до утворення кількох ізомерів, що відрізняються просторовим розташуванням атомів хлору навколо циклогексанового кільця. Налічується п'ять стабільних ізомерів, у тому числі, α : 60%–70%, β : 5%–12%, γ : 10%–12%, δ : 6%–10% і ϵ : 3–4 %, які складають технічний ГХЦГ.

Спочатку ГХЦГ використовували як пестицид, але пізніше він був використаний виявили, що тільки γ -ГХЦГ (також відомий як ліндан) володіє інсектицидною активністю.

Стійкість і токсичність цих ізомерів визначаються положенням і орієнтацією атомів хлору навколо циклогексанового кільця. Позиція також визначає різні властивості, наприклад температура кипіння, розчинність тощо. ГХЦГ легко всмоктуються через шлунково-кишковий тракт. Вдихання повітря, забрудненого ізомерами ГХЦГ, також може призвести до системного всмоктування. ГХЦГ також можуть поглинатися шкірою при використанні як лосьйон, крем або шампунь для лікування або боротьби з ектопаразитами. Загалом ізомери ГХЦГ та їх метаболіти можуть тимчасово зберігатися в жировій тканині. Абсорбовані ГХЦГ в основному виводяться із сечею. Менша кількість виділяється з калом.

ГХЦГ є гепатотоксичним і викликає окислювальний стрес, збільшує експресію прозапальних молекул і викликає дегенеративні зміни в гепатоцитах.

Після прийому ГХЦГ є латентний період, що варіюється від приблизно 0,5 години до кількох годин. Ознаки підвищеної дратівливості та збудження центральної нервової системи (ЦНС): блювота, слабкість, тремор, неспокій, м'язові спазми, атаксія, клонічні та тонічні судоми. У немовлят і дітей може виникнути гіперпірексія. Були повідомлення про постіктальну кому різної тривалості, що призводила протягом 24 годин до дихальної недостатності та смерті. Другий напад судом може виникнути після відновлення свідомості. Описана ретроградна амнезія. У смертельно отруєних дітей спостерігався набряк легенів (з ціанозом та задишкою). Іноді виявляли дерматит і кропив'янку.

Повідомлялося про три випадки лейкемії (парамієлобластної та мієломоноцитарної) у чоловіків, які піддавалися впливу ліндану з або без супутнього впливу інших хімічних речовин. Багато випадків апластичної анемії також були пов'язані з впливом гексахлорциклогексану або ліндану,

а смертність від раку легенів зросла серед сільськогосподарських працівників, які використовували гексахлорциклогексан та ряд інших пестицидів і гербіцидів.

Усі ізомери ГХЦГ викликали дозозалежні цитотоксичні ефекти, найбільш токсичним є ліндан. Цей ізомер також був здатний викликати значне збільшення частоти мікроядер. Генотоксичний тест β -ГХЦГ показав позитивну індукцію мікроядра при 100 мкг/л і значну цитотоксичність при 50 мкг/л. α -ГХЦГ не зміг викликати будь-яке значне збільшення частоти мікроядер, що підтверджує, що α -ГХЦГ не є генотоксичним агентом. ГХЦГ є нейротоксичним у гострих дозах і викликає дегенеративні ефекти при хронічному впливі.

Помітну індукцію та інгібування антиоксидантних ферментів, особливо в корі та різною мірою в інших областях мозку, спостерігали у щурів, які отримували ГХЦГ. Оральний вплив ГХЦГ технічного класу або окремих ізомерів викликав у гризунів пухлини на двох різних ділянках тканин. Харчове введення ГХЦГ технічного класу (66,5% α -ізомеру, 11,4% β -ізомеру, 15,2% ліндану (γ -ізомеру), 6,4% δ -ізомеру та 0,5% інших ізомерів), ліндану, α - або β -гексахлорциклогексану, або суміші різних ізомерів викликали пухлини печінки в обох статей кількох штамів мишей. Крім того, вплив ГХЦГ технічного рівня з їжею викликав пухлини лімфоретикулярної системи у мишей обох статей.

Показано, що α -, γ - і дельта-гексахлорциклогексан, але не β -ізомер, є потужними стимулами для виробництва супероксид-аніона (O_2^-) і вивільнення кальцію в поліморфно-ядерних лейкоцитах людини. α -ГХГ викликає фрагментацію ДНК у первинних культурах гепатоцитів людини.

1.3. Мікроорганізми-деструктори хлорорганічних пестицидів

Біоремедіація – це галузь біотехнології, яка використовує переважно мікроорганізми, рослини або мікробні чи рослинні ферменти для детоксикації забруднюючих речовин у ґрунті та інших середовищах [34-35].

Біодеградація – це процес перетворення складних речовин за допомогою ферментативної активності [36]. Широке поняття біодеградації включає:

1. трансформацію, або незначні зміни молекули;
2. фрагментацію, або розклад складної молекули на більш прості;
3. мінералізацію, або перетворення складної речовини в простіші.

У розкладанні (деструкції) того чи іншого субстрату беруть участь різні види мікроорганізмів, що входять до групи об'єднаних тільки цією функцією і становлять поняття екологотрофічної індикаторної групи.

Деякі типи мікроорганізмів здатні виділяти ферменти, які можуть боротися зі шкідливими забруднювачами із забруднених місць. Біоремедіація може проводитися *ex situ* або *in situ*, залежно від вартості, особливостей ділянки, типів і концентрації забруднюючих речовин тощо. Найважливішим кроком до успішної біоремедіації є визначення характеристик ділянки, яка встановлює найбільш підходящі та ефективні методи біоремедіації (*ex situ* або *in situ*) [37-39].

Мікроорганізми здатні утилізувати всі наявні в природі органічні речовини. Причому необхідні для цього ферменти є індукцибельні, тобто синтезуються в їхніх клітинах у міру необхідності. Завдяки цьому мікроорганізми швидко реагують на присутність в середовищі нових хімічних сполук природного або антропогенного походження.

Бактерій роду *Pseudomonas* здатні до деградації фенолів, п-нітроаніліну, бензолу, толуолу, продуктів деструкції фосфорорганічних токсичних речовин, поверхнево-активних речовин (ПАР), нафталіну, метану, етану, пропану, н-бутану, використовують - капролактам,

додецилсульфат як джерело азоту та вуглецю. Встановлена здатність бактерій *Pseudomonas* до утилізації - деяких ізомерів ГХЦГ в ґрунті. Штам *P.aeruginosa* 640х є деструктором ДДТ в умовах кометаболізму. При внесенні в ґрунт штаму *P.aeruginosa* BS827 спостерігається розклад акарициду кельтану, *P.putida* MK55 розкладає ДМЕ в ґрунті. Представники роду *Pseudomonas* можуть утилізувати іпрадин і делапон [40].

Проведені дослідження підтверджують спроможність бактерій цього роду в лабораторних умовах здатні розкладати хлоровані аліфатичні кислоти, похідні сечовини, галоїдзамісні похідні пропіонової та оцтової кислот, дихлорацетат. При внесенні *P.putida*, *P.fluorescens* прискорювалась деструкція фозалона [40].

1.3.1. Характеристика штаму *Bacillus megaterium*

Вперше грампозитивна бактерія *Bacillus megaterium* була описана де Баррі більше століття тому [41] розміром 1,5 х 4 мкм, цей мікроорганізм відноситься до більших бактерій. У 1960-х роках, до *Bacillus subtilis*, *B. megaterium* був «модельним» організмом для інтенсивних досліджень спороношення.

В основному це ґрунтова бактерія, *B. megaterium* також зустрічається в різних середовищах рисових полів, морської води, риби, нормальної флори і навіть у бджолиному меді. Таксономічно *B. megaterium* належить до групи *B. subtilis* *Bacilli* [41], хоча існує лише низький рівень асоціації між *B. megaterium* та *B. subtilis* у структурі геному.

B. megaterium представляє загальнопромисловий інтерес завдяки використанню у виробництві кількох біотехнологічних речовин. Він абсолютно патогенний. На відміну від грамнегативних мікроорганізмів, таких як кишкова паличка, вони не виробляють асоційовані ендотоксини із зовнішньою мембраною. Ці властивості роблять *B. megaterium* корисним в їжу і також у фармацевтичній промисловості [41-42].

Використання різних джерел вуглецю дозволяє мікроорганізму рости на недорогих речовинах. *B. megaterium* не має видимої лужної протеази, яка руйнує продукти рекомбінантних генів. Отже, велика кількість інтактних функціональних білків отримують з невеликою кількістю продуктів розпаду або без них. Це ще одна причина, яка сприяє поширенню штамів *B. megaterium*, які продукують рекомбінантні білки. Ще однією перевагою є його здатність виділяти білки безпосередньо в середовище для росту [42]. Якщо назвати лише деякі продукти високої промислової цінності, *B. megaterium* використовується для виробництва кількох альфа- та бета-амілаз, які використовуються для модифікації крохмалю в хлібопекарській промисловості.

Крім того, *B. megaterium* використовується для виробництва пеніциліноацилаз, які необхідні для синтезу нових β -лактамних антибіотиків. Крім того, *B. megaterium* відомий своєю здатністю синтезувати вітамін B12 аеробно та анаеробно [42-43].

1.3.2. Характеристика штаму *Pseudomonas putida*

Pseudomonas putida (*P. putida*) - це бактерія, яка зазвичай живе у воді. Це грамнегативна бактерія, як кишкова паличка, але зазвичай використовується в екологічних дослідженнях, оскільки вона здатна розкласти багато ароматичних сполук [44].

P. putida є метаболічно універсальною бактерією, яка вирощується в різних середовищах існування, які були інтенсивно вивчені з точки зору її потенціалу виробляти різноманітні продукти промислового значення [45]. Завдяки своїм особливим характеристикам, таким як міцний метаболізм, широка толерантність до токсичних сполук і окисного стресу, а також легкість генетичної модифікації, ця бактерія стає ефективною для мікробів фабрикаю клітин для багатьох природних продуктів з різноманітними біологічними функціями [46-49].

Катетерна бактеріємія є однією з найпоширеніших інфекцій. Інші інфекції включають холангіт, пов'язаний з жовчовивідними дренажами, холецистит, пневмонію, інфекції сечовивідних шляхів і бойові поранення. Інфекції переважно виникають у хазяїв з ослабленим імунітетом, хоча були опубліковані повідомлення про випадки захворювання серед здорових людей. Більшість інфекцій виліковуються за допомогою відповідної антимікробної терапії та видалення інвазивних пристроїв [51-52]. Смертність коливається від 8% до 40% [53].

1.3.3. Характеристика штаму *Stenotrophomonas maltophilia*

Stenotrophomonas maltophilia (*S. maltophilia*) — це грамнегативна паличка, вперше виділена в 1960 році і названа *Pseudomonas maltophilia*, потім, аналіз цистрону рРНК визначив, що її більш правильно і тоді паличка була класифікована як *Xanthomonas*, а в 1983 році і *Stenotrophomonas* в 1993 році [54]. Тривають дискусії щодо номенклатури. Дослідження гібридизації ДНК - рРНК, а також секвенування та картування ПЛР-ампліфікованих генів 16S рРНК привели до класифікації та іменування *X. maltophilia* як *S. Maltophilia* [55]. *S. maltophilia* — це один із умовно-патогенних збудників внутрішньолікарняних інфекцій, що викликає такі серйозні інфекції у пацієнтів з ослабленим імунітетом, як пневмонія, септицемія, а також інфекції шкіри та м'яких тканин, хірургічних ран та сечовивідних шляхів. Смертність дітей від бактеріємії *S. maltophilia* становить від 6% до 40% [56-58].

Завдяки аміноглікозид-ацетилтрансферазі та ферментам, які інактивують еритроміцин, та генам, що кодують ефлюксні насоси. Штами *S. maltophilia* по своїй суті стійкі до різних антибіотиків. Тому вибір відповідної антимікробної схеми для лікування інфекції *S. maltophilia* є проблемою для клініцистів [59].

1.3.4. Характеристика штаму *Comamonas testosteroni*

Comamonas testosteroni (*C. testosteroni*) - це аеробна грамнегативна паличка, яка є оксидазопозитивною, рухлива, не утворює спори, не ферментує глюкозу, і розташована окремо або попарно. Його перейменували на *C. testosteroni*, оскільки, як відомо, він використовує тестостерон як єдине джерело вуглецю для їхнього росту [60].

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 2.

ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали та методи досліджень

2.1.1. Рослинний матеріал

У дослідження було використано насіння томату (*Lucopersicon esculentum* Mill.) сорту Лагідний, що належить українській селекції.

2.1.2. Реактиви та обладнання

В роботі використовували реактиви виробництва компаній:

1. «Serva» (Німеччина): індоліл-оцтова кислота (ІОК), зеатин (Зеа).
2. «Sigma» (США): тіамін-НСІ (Вітамін В1), піридоксин-НСІ (вітамін В6), нікотинова кислота (вітамін РР), мезо-інозитол, Твін-80.
3. «Merck» (Німеччина): D-сахароза, мікробіологічний агар.
4. «Duchefa» (Німеччина): солі МС [Murashige T., Skoog F., 1962]

Усі інші реактиви, які використовували в дослідженнях, були вироблені в Україні і мали кваліфікацію ч.д.а і о.с.ч.

1. Хлорид кальцію
2. Монофосфат калію
3. Сульфат магнію
4. Нітрат амонію
5. Молібдат натрія
6. Борна кислота
7. Сульфат марганцю
8. Сульфат цинку
9. Йодид калію
10. Хлорид кобальту
11. Купрум сульфат

12. Fe-хелат
13. Сульфат заліза
14. 70% - етанол
15. 5% - водний розчин гіпохлориту натрію
16. 30% - пероксид водню

Всі біотехнологічні прийоми і досліди проводили за допомогою:

1. Сляні пляшки та бутлі для реактивів з поліпропіленовою гвинтовою кришкою
2. Колби конічні вузькогорлі та широкогорлі та колби лабораторні плоскодонні
3. Вимірювальні циліндри
4. Біологічні пробірки та пробірки для реактивів з гвинтовою кришкою
5. Сляну баночки
6. Чашки Петрі сляні
7. Автоматична піпетка-дозатор
8. Ємності для зважування з полістиролу
9. Пінцети гострокінцеві та тупокінцеві
10. Скальпелі лабораторні
11. Ножиці хірургічні
12. Лезо
13. Йорж для колб
14. Ламінарний бокс
15. Витяжна шафа
16. Стелажі з лампами
17. Автоклав
18. Плитки лабораторні електричні
19. Магнітна мішалка з підігрівом
20. Перемішувальний стрижень для магнітних мішалок
21. Ваги лабораторні
22. РН – метр

23. Спиртівка
24. Холодильна камера

2.1.3. Живильні середовища для культивування тканин і рослин томатів *in vitro*

Для маніпуляцій з насінням і рослинними тканинами використовували агаризоване поживне середовище за прописом Мурасіге-Скуга (МС) [90], в склад якого входили базові мінеральні солі МС (4,3 г/л), 100 мг/л міо-інозиту, 0,5 мг/л нікотинової кислоти, 0,5 мг/л піридоксину, 1 мг/л тіаміну, 2 мг/л гліцину, 30 г/л сахарози та 8 г/л агару, рН всіх середовищ становив 5,8.

Для дослідження морфогенетичних відповідей клітин і тканин на дію різних доз хлорорганічних пестицидів - ГХЦГ і ГХБ (1, 2.5, 5, 10 та 20 мг/л), а також продуктів їх мікробної деструкції отриманих за допомогою культур *Pseudo-monas putide* 3, *Stenotrophomonas maltophilia* 6 і *Bacillus megaterium* та *Comamonas testosteroni* УКМ И-400 і *Comamonas testosteroni* УКМ И-401 відпо-відно, використовували живильне середовище МСТІ до складу якого входили регулятори росту ІОК та Зеа в концентраціях: 1 мг/л [61,62] .

2.1.4. Введення в культуру *in vitro* *Lucopersicon esculentum* Mill.

Стерилізація і умови культивування насіння. Насіння томату стерилізували в 70%-му етиловому спирті протягом 1-2 хв, далі 15 хв у 5%-му водному роз-чині гіпохлориту натрію (NaOCl) з додаванням 2-ох крапель детергенту Твін-80 для кращого занурення насіння у розчин стерилізуючого агенту. Після насіння відмивали стерильною дистильованою водою тричі по 30 с і 2 рази по 10 хв. Стерилізацію проводили при кімнатній температурі (22-24 С) в ла-мінарному боксі, при постійному перемішуванні з

використанням магнітної мішалки. Пророщування насіння проходило в культуральній кімнаті протягом 10-14-ти діб при 16-ти годинному фотоперіоді і за температури 24 С. З отриманих проростків за допомогою стерильного скальпеля ізолювали сегменти гіпокотилів, які використовували для подальших досліджень.

Ефективність пророщування насіння оцінювали на 10-ту добу після проведення його стерилізації, як співвідношення кількості отриманих стерильних проростків до загальної кількості взятих насінин.

Для визначення впливу на пророщування насіння хлорорганічних пестицидів живильне середовище доповнювали гексахлорбензолом або гексахлорцикло-гексаном в наступних концентраціях: 1, 2,5, 5, 10 та 20 мг/л.

2.1.5. Регенерація томатів

Для регенерації пагонів у живильне агаризоване середовище після автоклавування, попередньо простерилізувавши за допомогою стерильних мембранних фільтрів (Mielex-GP, з діаметром пор 0,22 мкм), додавали регулятори росту – ІОК (1 мг/л) та Зеа (1 мг/л). Експлантами, в досліді для регенерації пагонів, слугували сегменти гіпокотилі довжиною 5-8 мм 10-14-ти денних проростків, які розміщували горизонтально на поверхні живильно-го середовища в кількості 16-18 шт. на одну чашку Петрі, d=9 см, що містила 35-40 мл живильного середовища. Через кожні 3 тижні (тривалість одного пасажу) експланти переносили на свіжо приготовані середовища.

Визначення потенціалу морфогенетичних реакцій. Частоту регенерації оцінювали через 3 тижні після початку культивування вихідних експлантів як співвідношення кількості експлантів з регенераційними структурами до загальної кількості висаджених експлантів. Ефективність регенерації визначали через 5-6 тижнів після початку культивування експлантів гіпокотилів як на контрольному середовищі (М+1 мг/л ІОК+1

мг/л Зеа), так і на всіх варіантах досліджуваних середовищ, тобто з пестицидами (ГХБ та ГХЦГ) в концентраціях 1, 2,5, 5, 10 та 20 мг/л, та з продуктами їх мікробної деструкції, які наносили поверхнево в об'ємі 1 мл на 35-40 мл агаризованого живильного середовища.

Для оцінки результату експерименту використовували не менше 50-ти експлантів кожного сорту з трьохкратним повтором. Середні значення і достовірність їх відмін визначали для кожного дослідження окремо.

2.1.6. Укорінення рослин-регенерантів томатів в умовах *in vitro*

Укорінення отриманих регенерантів проводили на середовищі МС з додаванням гексахлорбензолу або гексахлорциклогексану в концентрації 20 мг/л в об'ємі 1мл поверхнево на 35-40 мл середовища. Продукти деструкції хлорорганічних пестицидів аналогічно вносили на поверхню середовища.

2.1.7. Статистична обробка даних

Статистичну оцінку отриманих результатів виконували шляхом розрахунку довірчих інтервалів і стандартної відносної помилки для альтернативного розподілу з використанням критерія Стю'дента для 5%-ного рівня вірогідності. Побудову діаграм здійснювали за допомогою програми Microcal TM Origin TM (Version 8.0), Microcal Software, Inc.

РОЗДІЛ 3.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Введення в культуру *in vitro* та визначення впливу різних доз циклічних хлорорганічних пестицидів та продуктів їх мікробної деструкції на клітини і тканини *Lucopersicon esculentum* Mill. *in vitro*

Для ефективної регенерації пагонів в умовах *in vitro* та зясування можливостей їх укорінення [63-65] необхідна розробка та виконання наступних етапів:

- підібрати умови введення досліджуваної рослини в культуру *in vitro*;
- визначити кращий тип експланту та його вік;
- підібрати склад живильного середовища та його фітогормональний склад;
- з'ясувати умови культивування експлантів і регенованих рослин;
- встановити умови укорінення пагонів.

3.1.1. Стерилізація насіння та отримання паростків

Для отримання асептичних культур застосовують різноманітний рослинний матеріал та стерлізуючі агенти. Насьогодні для більшості рослин розроблено методи введення в культуру *in vitro* [66-72]. Відносно *Lucopersicon esculentum* Mill, то в більшості повідомлень, цю рослину вводять в культуру *in vitro* шляхом стерилізації насіння [73-76], здебільшого застосовуючи розчин гіпохлориту натрію або комерційний відбілювач. Потрібно зауважити, що різні сорти, хоча і незначно, але можуть відрізнятись за розміром і формою насінин, а тому це може вплинути на умови його стерилізації та подальшого проростання, а тому для кожного сорту необхідно розроблювати або оптимізовувати вже існуючі протоколи. Для *Lucopersicon esculentum* Mill сорту Лагідний існує методика введення в культуру *in vitro* [61], яка була використана в роботі з деякими модифікація-

ми. В 70 %-му етанолі витримували 1-2 хв, в стерілізуючий агент додавали дві краплі детергенту Твін-80 для кращого занурення насіння. Відмивали насіння стерильною дистильованою водою тричі по 30 с і 2 рази по 10 хв, а не 3 рази по 10 хв.

В нашій роботі стерилізацію насіння досліджуваного сорту томату проводили з метою одержання експлантів гіпокотилів для визначення впливу хлорорганічних пестицидів та продуктів їх мікробної деструкції на процес регенерації із них пагонів.

3.1.1.2. Вплив гексахлорбензолу та гексахлорциклогексану на пророщування насіння томатів (*Lycopersicon esculentum* Mill) сорту Лагідний

У результаті проведених досліджень було встановлено, що ГХЦГ та ГХБ в концентраціях 1, 2.5 та 5 мг/л істотно не чинять негативного впливу на процес пророщування насіння. Ефективність проростання насіння за їх використання сягає майже 100%, як і у контролі. При додаванні до живильного середовища МС 10 мг/л чи 20 мг/л ГХБ або ГХЦГ показник ефективності пророщування знижувався у середньому на 15- 20% відповідно (Рис.1 та 2)

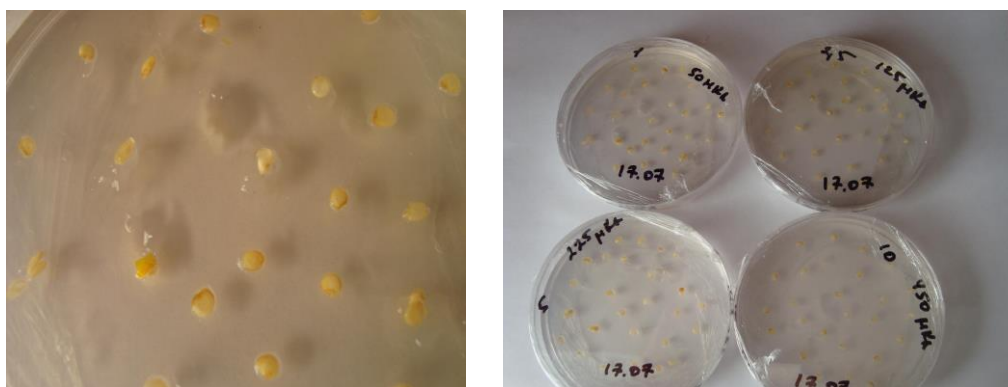


Рис.1. Вигляд насіння на початок експерименту: А — контроль; Б. — середовища з ГХБ

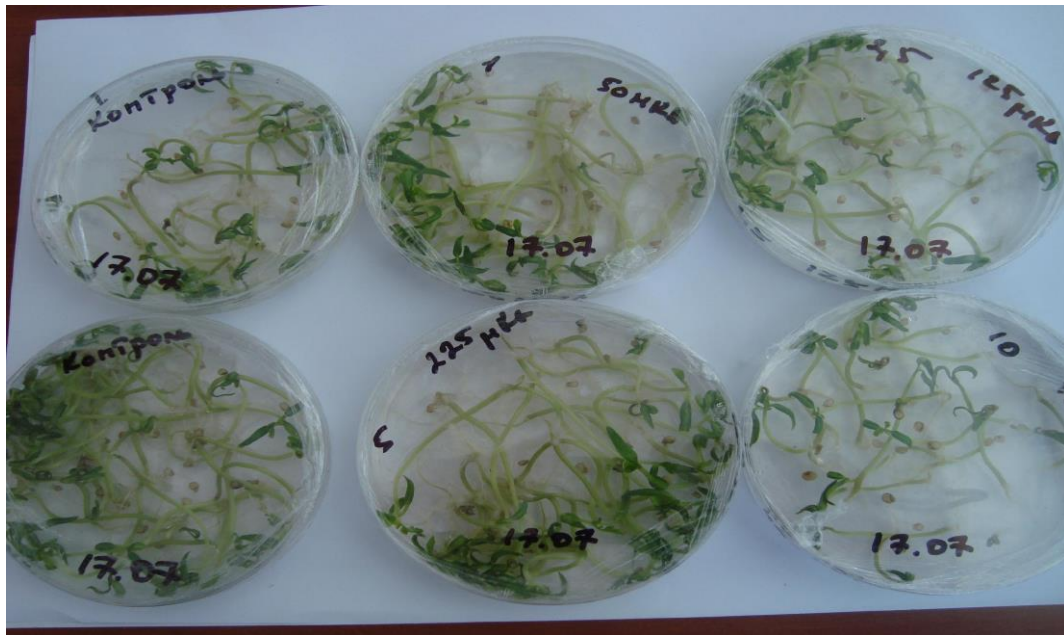


Рис.1. Результати впливу 1, 2.5, 5 та 10 мг/л ГХБ на пророщування насіння рослин томатів (*Lycopersicon esculentum* Mill) сорту Лагідний в умовах *in vitro*: стандартний контроль і 4-ри варіанти концентрацій ГХБ (вигляд експерименту на 12-ий день)

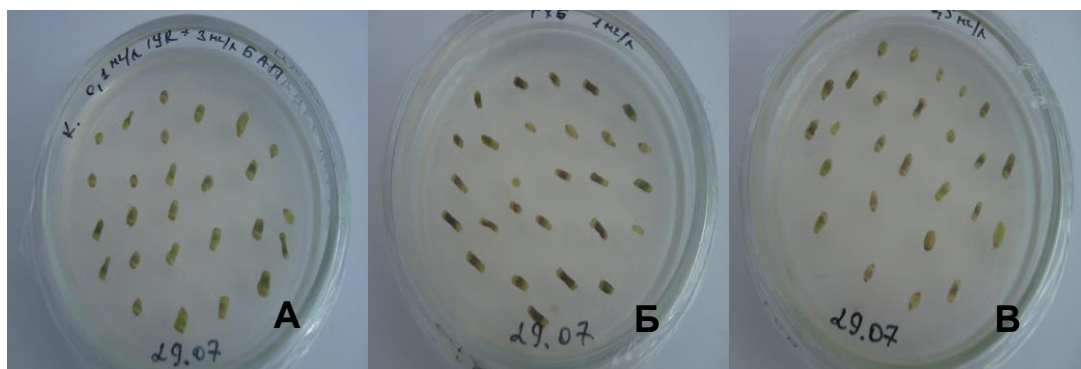
3.1.2. Залежність пагоноутворення від складу живильного середовища та типу експланту

Для багатьох видів рослин в культурі *in vitro* детально описано склад живильних середовищ для регенерації пагонів та їх подальшого культивування [77]. В багатьох оглядах показано, що для кожного виду рослин, а також для окремо взятого генотипу чи сорту, необхідно розробляти чи оптимізовувати вже існуючі протоколи індукції різних типів морфогенезу рослинних тканин в умовах *in vitro* як за вмістом макро- та мікросолей, вітамінів, амінокислот, цукрів так і за регуляторами росту так і за типом експланту [78], зокрема і для культури томатів в умовах *in vitro* [79-84].

Із запропонованих середовищ для індукції пагонів із сегментів гіпокотилів *Lycopersicon esculentum* Mill сорту Лагідний [61] в роботу було взято середо-вище, на якому було показано найбільшу ефективність регенерації, а саме живильне середовище з основою по МС, що містило 1 мг/л ІОК та 1 мг/л Зеа.

3.1.2.1. Вплив гексахлорбензолу та гексахлорциклогексану на індукцію морфогенезу у культурі *in vitro* *L. esculentum* сорту Лагідний

В дослідях по вивченню впливу ГХБ та ГХЦГ на морфогенетичний потенціал томатів сорту Лагідний в умовах *in vitro* як експланти використовували сегменти гіпокотилів довжиною 5–8 мм 10-14-ти добових проростків. Сегменти гіпокотилів пасували на чашки Петрі (d=9см), що містили 35-40 мл середовища з основою МС та регуляторами росту ауксинової та цитокінінової природи, а саме ІОК (1 мг/л) та Зеа (1 мг/л) (контроль) та досліджувані хлорорганічні пестициди в концентраціях: 1, 2.5, 5, 10 та 20 (мг/л). ГХБ та ГХЦГ рівномірно наносили на поверхню агаризованих середовищ в концентрації 1 мл за допомогою стерильного шпателя. Через кожні три тижні рослинний матеріал пасували на свіжо приготовані середовища



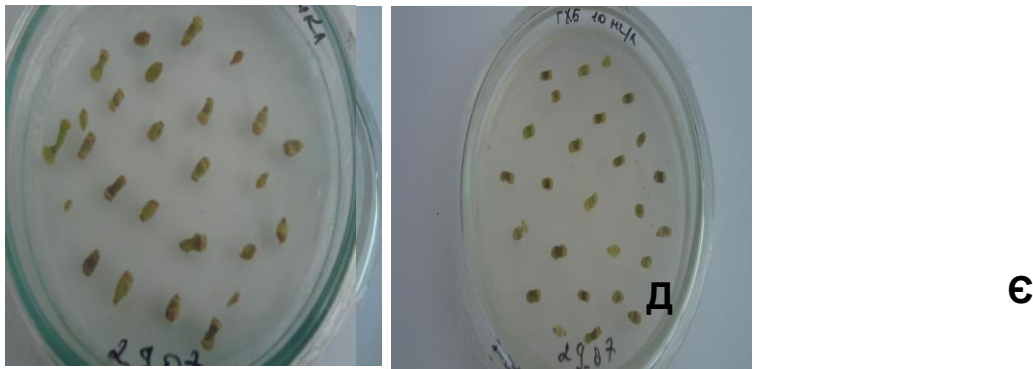
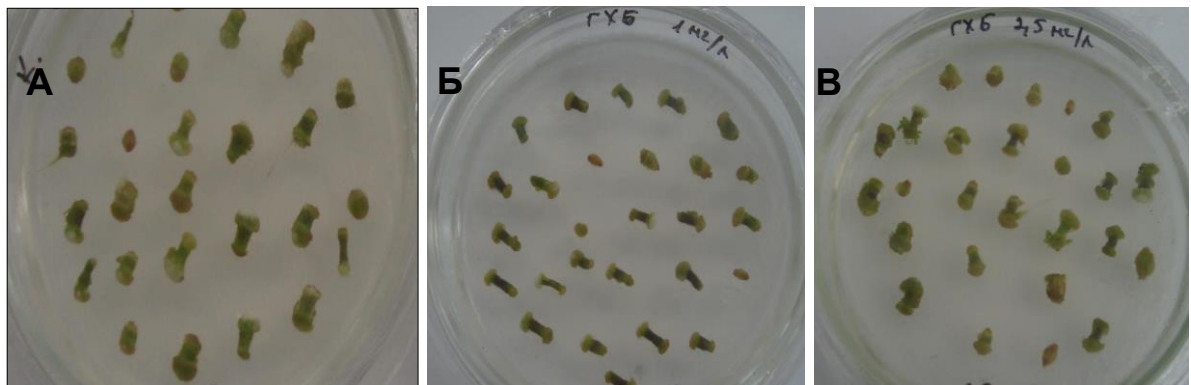


Рис.3. Формування калюсу на експлантах гіпокотилів томатів на п'ятий день культивування на живильних середовищах: А – контроль; Б - 1 мг/л ГХБ; В – 2,5 мг/л ГХБ; Г – 5 мг/л ГХБ; Д – 10 мг/л ГХБ

У результаті було встановлено, що на п'ятий-шостий день відбувалось формування калюсу на сегментах гіпокотилів на середовищі МС, що містило 1 мг/л ІОК та 1 мг/л Зеа (контроль), тоді як на середовищі з досліджуваними концентраціями (1, 2, 2,5, 5, 10 та 20 мг/л) ГХБ та ГХЦГ спостерігали пригнічення або відсутність формування калюсу на поверхні експлантів (Рис.3).

Через два тижня спостерігали формування калюсних клітин в усіх варіантах експерименту. При цьому калюс, сформований за контрольних умов, а також на середовищах, що містили ГХБ та ГХЦГ в концентраціях 1 та 2,5 мг/л був більш пухкий, ніж в інших варіантах проведених досліджень (Рис.4).



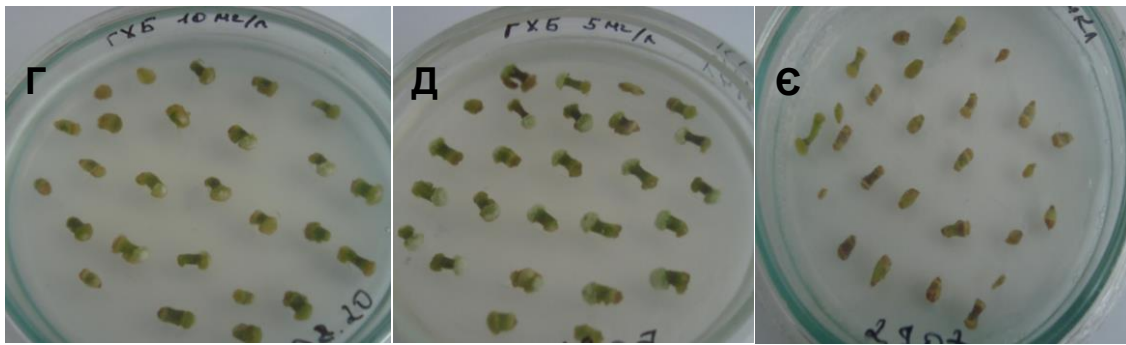


Рис.4. Калусоутворення на експлантах томатів через два тижні культивування на живильних середовищах: контроль та - 1 мг/л ГХБ; 2.5 мг/л ГХБ; 5 мг/л ГХБ; 10 мг/л ГХБ та 20 мг/л ГХБ

Формування пагонів спостерігали на 3-4 тиждень на середовищі МС, що містило 1 мг/л ІОК та 1 мг/л Зеа (контроль), а також на середовищах з 1 та 2,5 мг/л гексахлорбензолу (Рис.5) та гексахлорциклогексану. Незначне формування пагонів на середовищах, що містили 5, 10 та 20 мг/л досліджуваних хлорорганічних пестицидів спостерігалось на 5-6 тиждень.

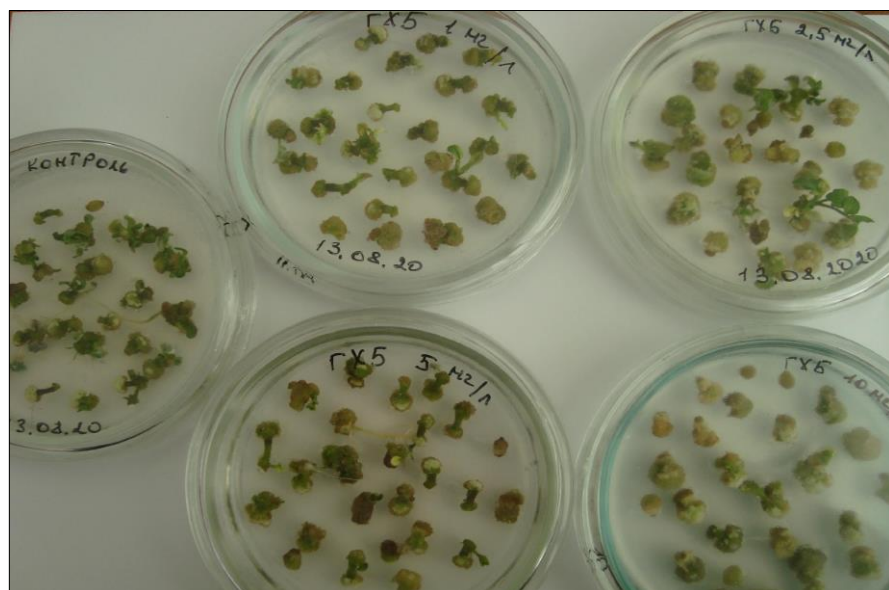


Рис. 5. Регенерація пагонів на експлантах томатів через чотири тижні на живильних середовищах: контроль і 4-ри варіанти концентрацій ГХБ

Отже, за результатами дослідження впливу ГХБ та ГХЦГ на індукцію морфогенезу у культурі ізольованих клітин та тканин рослин *L. esculentum* сорту Лагідний в умовах *in vitro* було встановлено, що додавання до середовища 5 мг/л ГХБ сповільнювало формування пагонів, а додавання 10 та 20 мг/л пригнічувало процес регенерації рослин *L.esculentum in vitro*.

За результатами дослідів було розраховано ефективність регенерації пагонів через 6 тижнів після початку культивування експлантів гіпокотилів на різних варіантах середовищ по співвідношенню кількості регенерованих пагонів (більше 3 мм завдовжки) до загальної кількості експлантів (Рис.6) та (Рис.7) для ГХЦГ та ГХБ відповідно. В таблицях (1 – 11) представлено розрахунки цих досліджень.

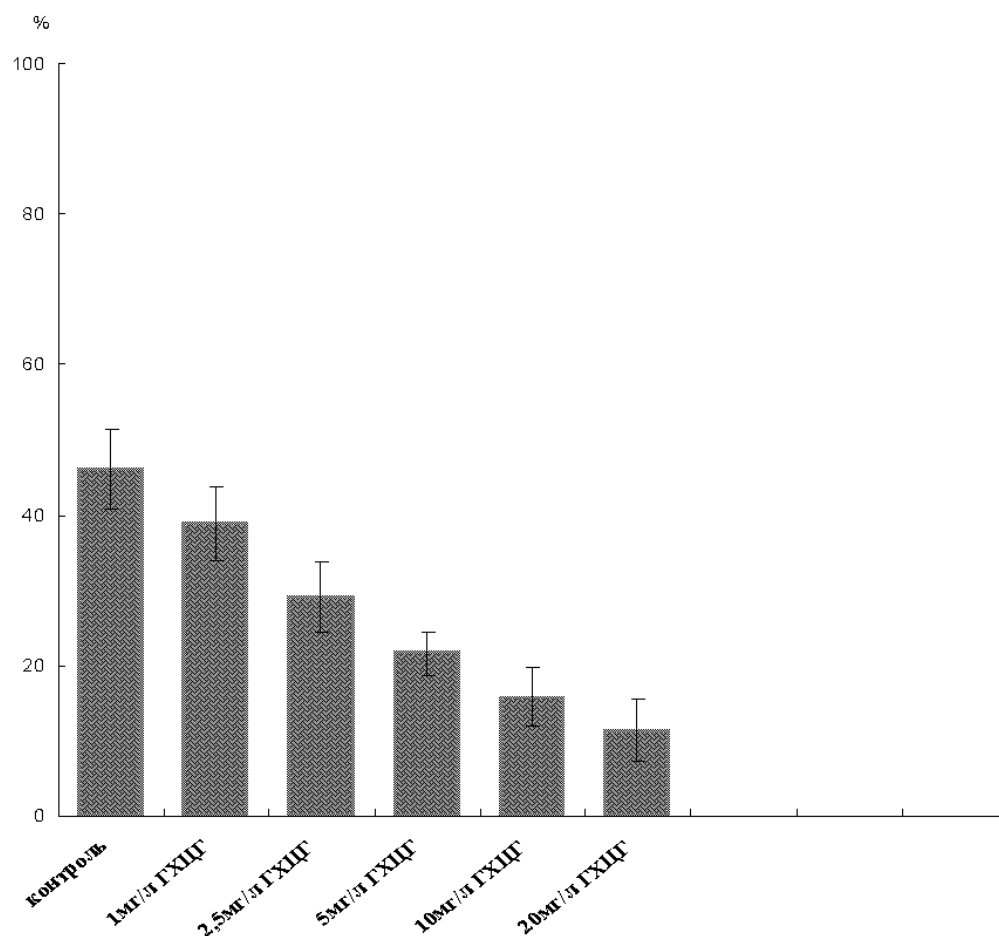


Рис.6. Залежність ефективності регенерації пагонів від різних концентрацій ГХЦГ в живильному середовищі МС + 1 мг/л ІОК + 1 мг/л Зеа: ОХ – досліджувані концентрації ГХЦГ (мг/л); ОУ – ефективність регенерації (%)

Таблиця. 1.

Ефективність регенерації пагонів томату сорту Лагідний на середовищі МС + 1 мг/л ІОК + 1 мг/л Зеа (контроль)

№	Кількість експлантів (гіпокотилі) шт.	Кількість отриманих пагонів	Ефективність регенерації (%)	Загальна ефективність	Середнє статистичне
---	---------------------------------------	-----------------------------	------------------------------	-----------------------	---------------------

				регенерації (%)	відхиленн я
1	50	20	40	46,00	5,29
2	50	25	50		
3	50	24	48		

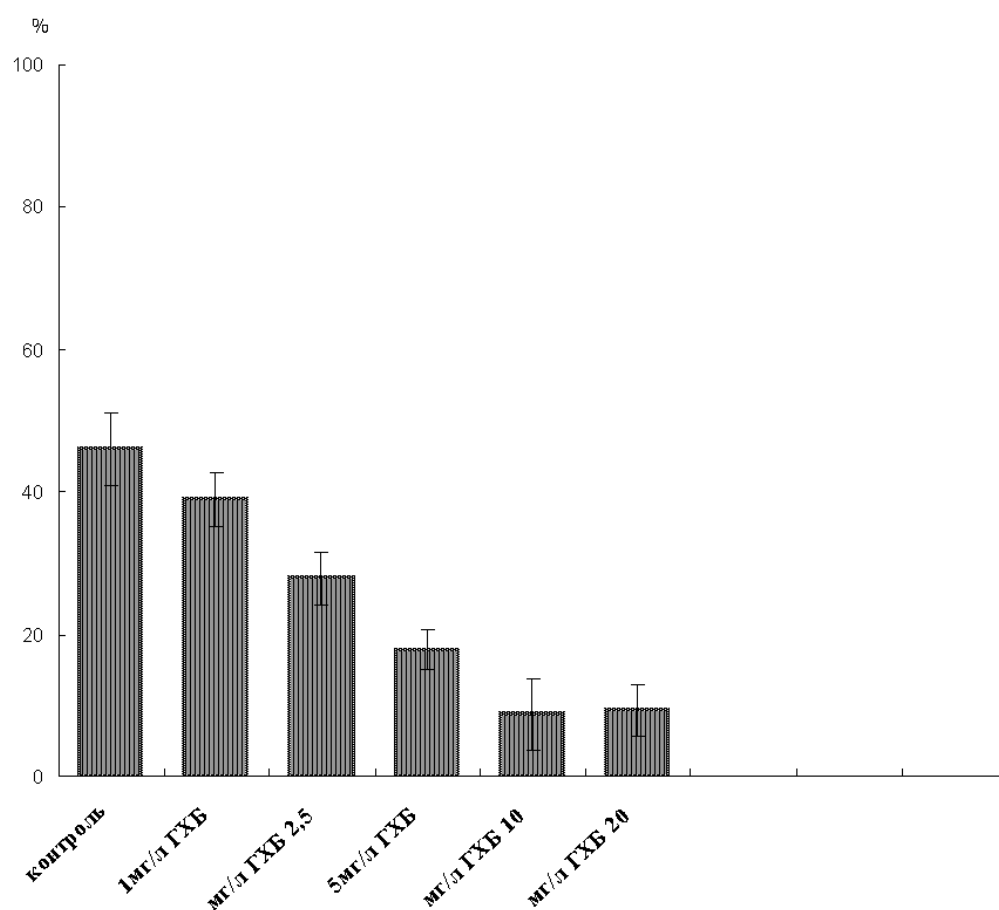


Рис.7. Залежність ефективності регенерації пагонів від різних концентрацій ГХБ в живильному середовищі МС + 1 мг/л ІОК + 1 мг/л Зеа: ОХ – досліджувані концентрації ГХБ (мг/л); ОУ – ефективність регенерації (%)

Таблиця. 2.

Ефективність регенерації пагонів томату сорту Лагідний на середовищі МС
+ 1 мг/л ІОК + 1 мг/л Зеа з додаванням ГХЦГ в концентрації 1мг/л

№	Кількість експлантів (гіпокотилі) шт.	Кількість отриманих пагонів	Ефективність регенерації (%)	Загальна ефективність регенерації (%)	Середнє статистичне відхилення
1	54	20	37,04	38,89	4,90
2	54	24	44,44		
3	54	19	35,19		

Таблиця. 3.

Ефективність регенерації пагонів томату сорту Лагідний на середовищі МС
+ 1 мг/л ІОК + 1 мг/л Зеа з додаванням ГХЦГ в концентрації 2,5 мг/л

№	Кількість експлантів в (гіпокотилі) шт.	Кількість отриманих пагонів	Ефективність регенерації (%)	Загальна Ефективність регенерації (%)	Середнє статистичне відхилення

1	54	18	33,33	29,01	4,66
2	54	13	24,07		
3	54	16	29,63		

Таблиця. 4

Ефективність регенерації пагонів томату сорту Лагідний на середовищі МС
+ 1 мг/л ІОК + 1 мг/л Зеа з додаванням ГХЦГ в концентрації 5мг/л

№	Кількість експлантів (гіпокотилі) шт.	Кількість отриманих пагонів	Ефективність регенерації (%)	Загальна ефективність регенерації (%)	Середнє статистичне відхилення
1	54	10	18,52	21,6	2,83
2	54	13	24,07		
3	54	12	22,22		

Таблиця. 5.

Ефективність регенерації пагонів томату сорту Лагідний на середовищі МС
+ 1 мг/л ІОК + 1 мг/л Зеа з додаванням ГХЦГ в концентрації 10мг/л

№	Кількість експлантів (гіпокотилі) шт.	Кількість отриманих пагонів	Ефективність регенерації (%)	Загальна ефективність регенерації (%)	Середнє статистичне відхилення

1	54	7	12,96	15,74	3,93
2	54	10	18,52		
3	54	8	14,81		

Таблиця. 6.

Ефективність регенерації пагонів томату сорту Лагідний на середовищі МС
+ 1 мг/л ІОК + 1 мг/л Зеа з додаванням ГХЦГ в концентрації 20мг/л

№	Кількість експлантів (гіпокотилі) шт.	Кількість отриманих пагонів	Ефективність регенерації (%)	Загальна ефективність регенерації (%)	Середнє статистичне відхилення
1	50	8	16	11,33	4.16
2	50	5	10		
3	50	4	8		

Таблиця. 7.

Ефективність регенерації пагонів томату сорту Лагідний на середовищі МС
+ 1 мг/л ІОК + 1 мг/л Зеа з додаванням ГХБ в концентрації 1мг/л

№	Кількість експлантів (гіпокотилі) шт.	Кількість отриманих пагонів	Ефективність регенерації (%)	Загальна ефективність регенерації (%)	Середнє статистичне відхилення
---	---------------------------------------	-----------------------------	------------------------------	---------------------------------------	--------------------------------

1	54	21	38,9	38,9	3,7
2	54	19	35,2		
3	54	23	42,6		

Таблиця. 8

Ефективність регенерації пагонів томату сорту Лагідний на середовищі МС
+ 1 мг/л ІОК + 1 мг/л Зеа з додаванням ГХБ в концентрації 2,5 мг/л

№	Кількість експлантів (гіпокотилі) шт.	Кількість отриманих пагонів	Ефективність регенерації (%)	Загальна ефективність регенерації (%)	Середнє статистичне відхилення
1	54	15	27,8	27,8	3,7
2	54	13	24,1		
3	54	17	31,5		

Таблиця. 9

Ефективність регенерації пагонів томату сорту Лагідний на середовищі МС
+ 1 мг/л ІОК + 1 мг/л Зеа з додаванням ГХБ в концентрації 5мг/л

№	Кількість експлантів (гіпокотилі) шт.	Кількість отриманих пагонів	Ефективність регенерації (%)	Загальна ефективність регенерації (%)	Середнє статистичне відхилення

1	54	8	14,8	17,9	2,85
2	54	11	20,4		
3	54	10	18,5		

Таблиця. 10.

Ефективність регенерації пагонів томату сорту Лагідний на середовищі МС
+ 1 мг/л ІОК + 1 мг/л Зеа з додаванням ГХБ в концентрації 10мг/л

№	Кількість експлантів в (гіпокотилі) шт.	Кількість отриманих пагонів	Ефективність регенерації (%)	Загальна Ефективність регенерації (%)	Середнє статистичне відхилення
1	50	4	8	8,67	5,03
2	50	7	14		
3	50	2	4		

Таблиця. 11.

Ефективність регенерації пагонів томату сорту Лагідний на середовищі МС
+ 1 мг/л ІОК + 1 мг/л Зеа з додаванням ГХБ в концентрації 20мг/л

№	Кількість експлантів (гіпокотилі) шт.	Кількість отриманих пагонів	Ефективність регенерації (%)
1	54	5	9,26

Отримані дані по ефективності регенерації пагонів із експлантів гіпокоти-лів томату на середовищах з хлорорганічними пестицидами свідчать, що при збільшенні концентрацій ГХЦГ та ГХБ до 10 або 20 мг/л морфогенетичні процеси пригнічуються.

3.1.2.2. Вплив продуктів деструкції ГХБ та ГХЦГ на морфогенетичний потенціал експлантів гіпокотилів томатів

Для дослідження впливу продуктів мікробної деструкції циклічних хлорорганічних пестицидів ГХЦГ та ГХБ, отриманих за допомогою життєдіяльності штамів культур *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas putide* 3, *Stenotrophomonas maltophilia* 6 та *Comamonas testosteroni* УКМ В-400 і *Comamonas testosteroni* УКМ В-401, відповідно, на морфогенетичний потенціал клітин і тканин томатів в умовах *in vitro* слугували гіпокотилі із паростків томатів сорту Лагідний. Сегменти гіпокотилів пасували на середовища, що містили продукти деструкції ГХЦГ. Частину матеріалу пасували на середовище, що містило досліджувані пестициди – ГХЦГ та ГХБ і це детально описано в пункті 3.1.2.. Як контроль були використані середовища, що не містили досліджуваних речовин - продуктів деструкції і ГХЦГ.

Продукти деструкції ГХЦГ та ГХБ, як і самі пестициди, наносили на поверхню агаризованих живильних середовищ в об'ємі 1 мл. Кожні три тижні досліджуваний рослинний матеріал пасували на свіжо приготовані середовища. з основою по МС доповнені 1 мг/л ІУК та 1 мг/л Зеа .

При проведенні аналізу впливу продуктів мікробної деструкції циклічного хлорорганічного пестициду – ГХЦГ на морфогенетичний потенціал томату сорту Лагідний було показано, що продукти деструкції ГХЦГ культурами *Pseudomonas putide* 3, *Stenotrophomonas maltophilia* 6 та *Bacillus megaterium* не проявляють негативного впливу на морфогенетичні процеси, що відбуваються в культурі тканин *Lucopersicon esculentum* Mill.,

за вирощування в культурі *in vitro*. Через тиждень культивування на живильному середовищі МС з додаванням: ауксину - 1 мг/л ІОК, цитокініну – 1 мг/л Зеа та продуктів деструкції ГХЦГ спостерігалось формування первинного калюсу на ділянках зрізу гіпокотилів (Рис.8).

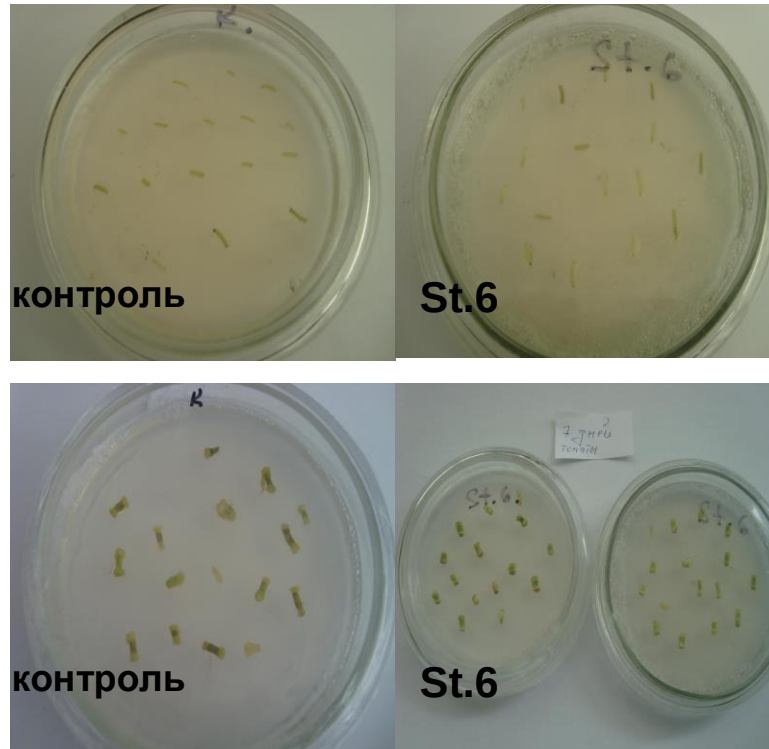


Рис.8. Культивування сегментів гіпокотилів *Lucopersicon esculentum* Mill. сорту Лагідний на контрольному середовищі МС + 1 мг/л Зеа + 1 мг/л ІОК - та з додаванням в середовище продуктів деструкції ГХЦГ культурою *S. maltophilia* 6: верхній ряд - початок експерименту; нижній ряд – 7-ий день.

На третій тиждень з'являлись перші пагони (Рис.9). Отримані результати досліджень були співставними або перевищували такі в контрольних зразках.

Зокрема, встановлено, що ефективність регенерації на середовищах, що містили досліджувані деструктори була вищою за контроль (Рис. 10 та 11) та (табл.12-14).

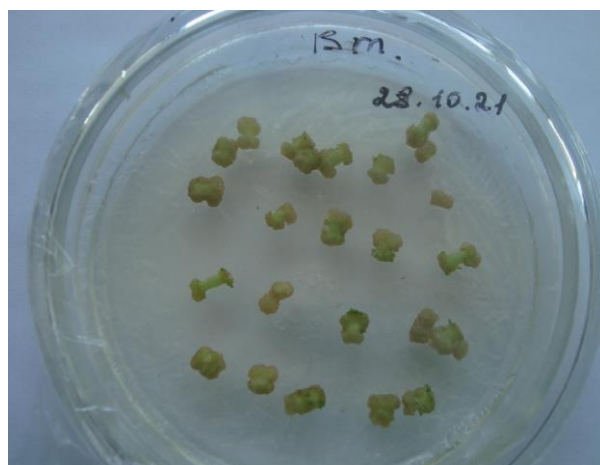


Рис.9. Формування пагонів на 3-ій тиждень культивування на середовищі МС + 1 мг/л Зеа та 1 мг/л ІОК з додаванням продуктів деструкції ГХЦГ культурою *B. megaterium*

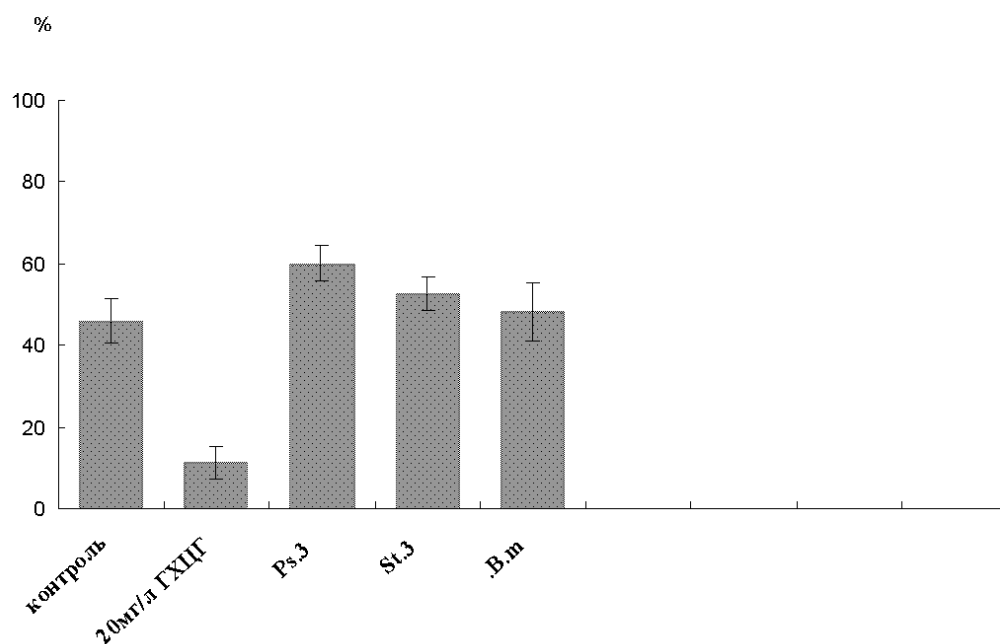


Рис.10.Залежність ефективності регенерації пагонів томату с.Лагідний на середовищі МС + 1 мг/л ІОК + 1 мг/л Зеа (контроль) та з додаванням ГХЦГ (20 мг/л) або продуктів його деструкції

Таблиця 12

Ефективність регенерації пагонів томату сорту Лагідний на середовищі МС + 1 мг/л ІОК + 1 мг/л Зеа з додаванням продуктів деструкції ГХЦГ, отриманих за допомогою діяльності штаму культури *Pseudomonas putide*

№	Кількість експлантів в (гіпокотилі) шт.	Кількість отриманих пагонів	Ефективність регенерації (%)	Загальна Ефективність регенерації (%)	Середнє статистичне відхилення
1	54	35	64,81	60,07	4,12
2	50	29	58,00		
3	54	31	57,41		

Таблиця 13

Ефективність регенерації пагонів томату сорту Лагідний на середовищі МС + 1 мг/л ІОК + 1 мг/л Зеа з додаванням продуктів деструкції ГХЦГ, отриманих за допомогою діяльності штаму культури *Strenotrophomonas maltophila* 6

№	Кількість експлантів (гіпокотилі) шт.	Кількість отриманих пагонів	Ефективність регенерації (%)	Загальна ефективність регенерації (%)	Середнє статистичне відхилення

1	50	24	48,00	52,67	4,16
2	50	28	56,00		
3	50	27	54,00		

Таблиця 14

Ефективність регенерації пагонів томату сорту Лагідний на середовищі МС + 1 мг/л ІОК + 1 мг/л Зеа з додаванням продуктів деструкції ГХЦГ, отриманих за допомогою діяльності штаму культури *Bacillus megaterium*

№	Кількість експлантів (гіпокотилі) шт.	Кількість отриманих пагонів	Ефективність регенерації (%)	Загальна ефективність регенерації (%)	Середнє статистичне відхилення
1	50	27	54,00	48,00	7,21
2	50	20	40,00		
3	50	25	50,00		

При дослідженні впливу продуктів деструкції ГХБ на процеси морфогенезу клітин і тканин томатів в культурі *in vitro* було виявлено, що вони викликають співставні ефекти з продуктами деструкції ГХЦГ (табл.15-16) та (Рис.11).

Таблиця 15

Ефективність регенерації пагонів томату сорту Лагідний на середовищі МС + 1 мг/л ІОК + 1 мг/л Зеа з додаванням продуктів деструкції ГХБ, отриманих

за допомогою діяльності штаму культури *Comamonas testosterone* УКМ В-400

№	Кількість експлантів (гіпокотилі) шт.	Кількість отриманих пагонів	Ефективність регенерації (%)
1	54	26	48,15

Таблиця 16

Ефективність регенерації пагонів томату сорту Лагідний на середовищі МС + 1 мг/л ІОК + 1 мг/л Зеа з додаванням продуктів деструкції ГХБ, отриманих за допомогою діяльності штаму культури *Comamonas testosterone* УКМ В-401

№	Кількість експлантів (гіпокотилі) шт.	Кількість отриманих пагонів	Ефективність регенерації (%)
1	54	23	42,59

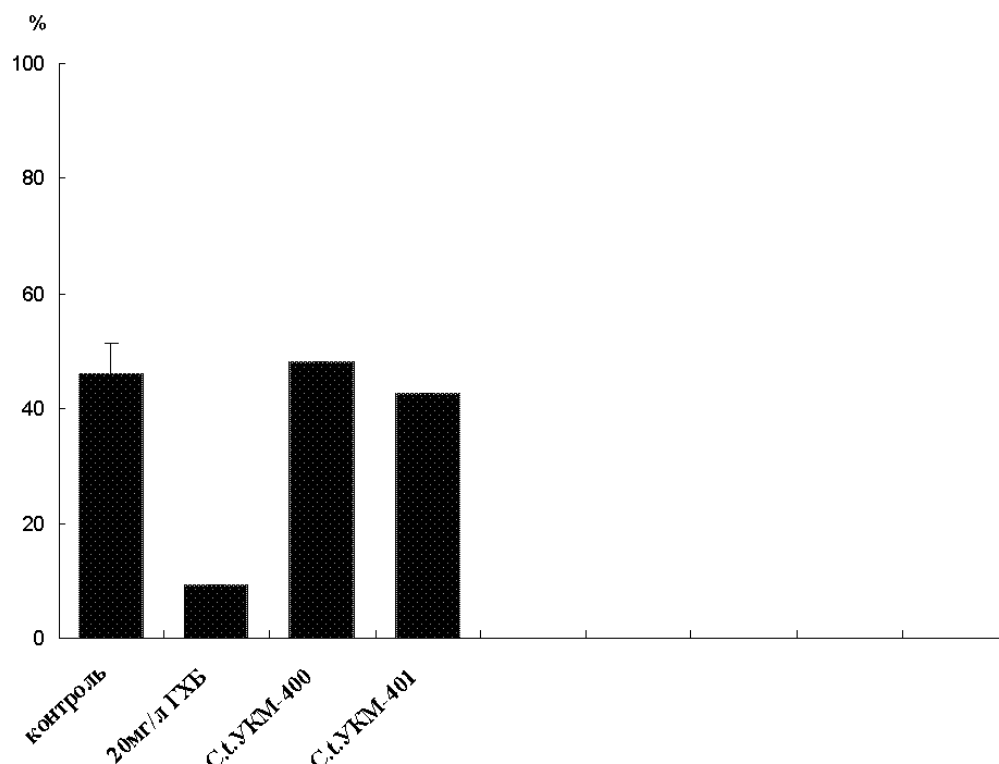


Рис.11.Залежність ефективності регенерації пагонів томату с.Лагідний на середовищі МС + 1 мг/л ІОК + 1 мг/л Зеа (контроль) та з додаванням ГХБ (20 мг/л) або продуктів його деструкції

Необхідно зауважити, що даних про генетичну активність проміжних продуктів деградації циклічних хлорорганічних пестицидів для біологічних об'єктів недостатньо, а тому з'ясування їх дії на клітини і тканини рослин є достатньо цікавою і необхідною задачею. Тобто питання про мутагенність чи безпеку продуктів мікробної деструкції хлорорганічних пестицидів є вельми актуальним, як і ефективність самої деструкції. Це пояснюється значним накопиченням в оточуючому середовищі великої кількості генетично шкідливих речовин, які пагубно діють на здоров'є людини [85, 86].

В свою чергу моделювання процесу дії продуктів деструкції на клітини і тканини сільськогосподарських рослин в умовах *in vitro* дозволить значно прискорити час для з'ясування їх впливу на досліджувані об'єкти.

3.2. Морфологічні особливості отриманих рослин та їх укорінення

В подальшому отримані пагони висаджували на середовище МС на поверхню якого наносили продукти деструкції пестицидів ГХЦГ (20 мг/л) або ГХБ (20 мг/л) в об'ємі 1 мл. або за їх відсутності (контроль). Отримані лінії рослин томатів на середовищах, що містили продукти деструкції ГХЦГ або ГХБ морфологічно не відрізнялись від контрольних зразків але у більшості було пригнічено процес ризогенезу (Рис.12).

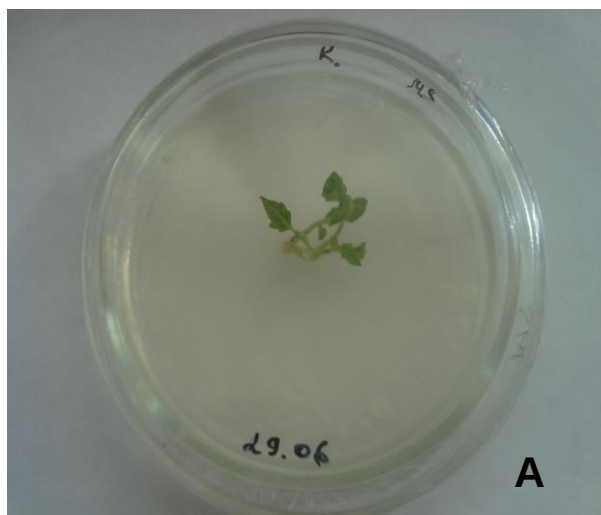
**Б**

Рис.12. Пагони *L. esculentum* Mill. сорту Лагідний отримані на середовищі МС+ 1 мг/л Зеа + 1 мг/л ІОК: А – контроль ; Б – з додаванням продуктів деструкції культури Ps.3

Додавання до живильних середовищ ГХЦГ або ГХБ в концентрації 20 мг/л пригнічувало формування пагонів *L. esculentum* Mill., а сформовані мали химерний вигляд – потовщені стебла та листя. При подальшому культивуванні цих пагонів на середовищі МС з додаванням 1 мл ГХЦГ або ГХБ в концентрації 20 мг/л ці пагони набували коричневого забарвлення, що свідчило про некроз їхніх тканин (Рис.13).

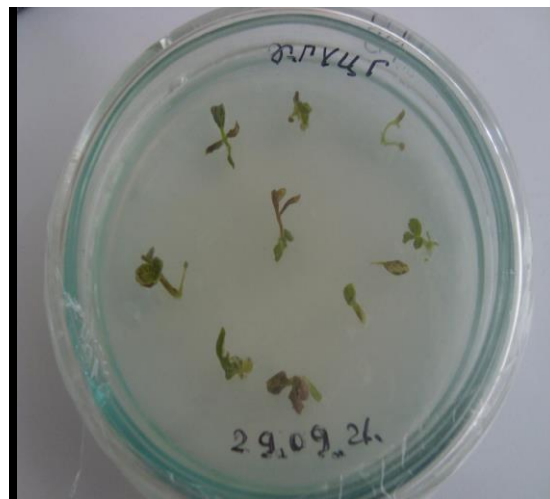


Рис.13. Пагони *L. esculentum* Mill. сорту Зимоярка отримані на середовищі МС + 1 мг/л Зеа + 1 мг/л ІОК, що було доповнено 1 мл ГХЦГ в концентрації 20 мг/л (поверхнево)

Отже досліджувані продукти деструкції ГХЦГ та ГХБ стимулюють процес регенерації пагонів але стримують процес індукції коренеутворення, а внесення пестицидів ГХЦГ та ГХБ в живильні середовища пригнічує формування пагонів та провакує в подальшому морфофізіологічні зміни у отриманих *in vitro* рослин томатів.

Враховуючі результати розрахунків ефективності регенерації пагонів на різних варіантах середовищ, можемо з впевненістю сказати, що нам

вдалось змодельовати процес негативного впливу циклічних хлорорганічних пестицидів на клітини і тканини рослин навіть в умовах *in vitro* і припустити, що продукти деструкції досліджуваних пестицидів (ГХЦГ та ГХБ) отримані за допомогою життєдіяльності штамів культур *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas putide* 3, *Stenotrophomonas maltophilia* 6 та *Comamonas testosteroni* УКМ В-400 і *Comamonas testosteroni* УКМ В-401 відповідно не проявляють токсичного впливу на клітини і тканини томатів.

ВИСНОВКИ

1. Показано виражений негативний вплив гексахлорциклогексану та гексахлорбензолу на морфогенетичні реакції експлантів рослин томатів (*Lycopersicon esculentum* Mill.) сорту Лагідний у культурі *in vitro*. Для високих концентрацій: 5, 10 та 20 мг/л, ефективність регенерації складала для ГХБ: 17,9 ($\pm 2,85$), 8,67 ($\pm 5,03$) та 9,26%; Для ГХЦГ ефективність регенерації за відповідних концентрацій складала: 21,6 ($\pm 2,83$), 15,74 ($\pm 3,93$) та 11,33% (4,16) відповідно, коли 46% ($\pm 5,29$) ефективності було спостережено на контрольних середовищах.
2. Було з'ясовано, що досліджувані продукти деструкції ГХБ не виявили негативного впливу на морфогенез експлантів томату, ефективність у порівнянні з контролем становила 42,59% для штаму *Comamonas testosterone* УКМ В-401 та 48,15% для штаму *Comamonas testosterone* УКМ В-400. Натомість продукти деструкції ГХЦГ виявили кращий вплив. Найбільш ефективною регенерація була на середовищі, що містило продукти деструкції отриманих за допомогою діяльності штаму *Pseudomonas putide*, яка складає 60,07% ($\pm 4,12$), також іншими штамами було показано, що ефективність регенерації більша за контроль: для штаму *Strenotrophomonas maltophilia* б ефективність регенерації становить 52,57% ($\pm 4,16$), для штаму *Bacillus megaterium* становить 48% ($\pm 7,21$).
3. Отримані рослини томату на середовищах, що містили гербіциди, морфологічно відрізнялись від контрольних – спостерігались потовщені і укорочені стебла, а також потовщене листя.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Frank den Hond, Peter Groenegewegen, Nico M. van Sraalen. Pesticides: Problems, Improvements, Alternatives. –Blackwell: Science, 2003.–273 p
2. Javaraj et al., 2016; .Javaraj, Megna P, Sreedev P.Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment.InterdiscipToxicol. 2016; Vol. 9(3–4): 90–100
3. Nakata et al, 2002 . Nakata H., Kawazoe M., Arizono K., Abe S., Kitano T, Shimada H et al.Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyl residues in foodstuffs and human tissues from China: status of contamination, historical trend, and dietary exposure //Arch. Environ. Contam. Toxicol.–2002. –v.43.–P.473–480.
4. Gill H., Garg , 2014.Gill H., Garg H. Pesticides: Environmental Impacts and Management Strategies. Pesticides–ToxicAspects. 2014
5. Roberts, J.R. and Karr, C.J. (2015). Council On Environmental Health Crit Rev Toxicol, 45(10), pp. 813–36.
6. Liangetal., 2016
7. Nagasawa, 1993; Nagasawa S., Kikuchi R., Nagata Y., Takagi M and Matsuo M. Aerobic mineralization of gamma-HCH by Pseudomona spaucimobilis UT26.- 1993//Chemosphere. – 1993 – v.26. – P.1719 – 1728.
8. Philips, 2005] Philips T. M. Biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH) by microorganisms / Philips T. M., Seech A. G., Hung L., Trevors J. // Biodegradation. – 2005. – V. 16. – P.363 – 392.
9. Micu, 1997; .Micu A. Biochemical aspects of double-nucleus pesticides degradation caused by the culture Penicillium funiculosum Thome CNM- FP-01 //Roumanian Biotechnological Letters . – 1997. –2, N 4. –P. 297 – 304
10. Ленёва Н.А., Коломыцева М.П., Баскунов Б.П., Головлёва Л.А. Деградация фенантрена и антрацена бактериями рода *Rhodococcus* // Прикл. биохим. и микробиол --2009. – 45,№2. – С.188 – 194.

11. Gerszberg, A., Hnatuszko–Konka, K., Kowalczyk, T. and Kononowicz, A.K. (2015). Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the service of biotechnology. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 120, pp. 881–902.
12. Agarwal, S. and Rao, A.V. (2000). Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *CMAJ. Canadian Medical Association Journal*, 163(6), pp. 739–744.
13. Basu, A. and Imrhan, V. (2007). Tomatoes versus lycopene in oxidative stress and carcinogenesis: conclusions from clinical trials. *European journal of clinical nutrition*, 61(3), pp. 295–303.
14. Hwang, E.S. and Bowen, P.E. (2002). Can the consumption of tomatoes or lycopene reduce cancer risk? *Integrative cancer therapies*, 1(2), pp. 121–132.
15. Oboh, G., Bakare, O.O., Ademosun, A.O., Akinyemi, A.J. and Olasehinde, T.A. (2015). Inhibition of Cholinesterases and Some Pro–Oxidant induced Oxidative Stress in Rats Brain by Two Tomato (*Lycopersicon Esculentum*) Varieties. *International Journal of Biomedical Science*, 11(1), pp. 48–53.
16. Snape, J.W. and Pánková, K. (2013). *Triticum Aestivum* L (Wheat). *Wiley*, 45(3), pp. 18–24.
17. Shiferaw, B., Smale, M., Braun, H.J., Duveiller, E., Reynolds, M. and Muricho, G. (2013). Crops that feed the world. 10. Past successes and future challenges to the role played by wheat in global food security. *Food Sec*, 5(30), pp. 291–317).
18. Reynolds, M., Bonnett, D., Chapman, S., Furbank, R., Mane`, Ya., Mather, D. and Parry M. (2011). Raising yield potential of wheat. I. Overview of a consortium approach and breeding strategies. *J Exp Bot*, 62, pp. 439–452.
19. Faltermaier, A., Waters, D., Becker, T., Arendt, E. and Gastl, M. (2014) Common wheat (*Triticum aestivum* L.) and its use as a brewing cereal – a review. *J. Inst. Brew*, 120, pp. 1–15.
20. Buziashvili, A., Cherednichenko, L., Kropyvko, S. and Yemets A. (2020). Transgenic tomato lines expressing human lactoferrin show increased resistance

to bacterial and fungal pathogens. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 25, pp.25–37.

21. Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Phys. Plant*, 15(3), pp. 473–497.

22. Mahmood, I., Razzaq, A., Khan, Z.U.D., Hafiz, I.A., and Kaleem S. (2012). Evaluation of tissue culture responses of promising wheat (*Triticumaestivum*L.) cultivars and development of efficient regeneration system. *Pak. J.Bot*, 44, pp. 277–284.

23. Smith, A.E. and Secoy, D.M. (1975). Forerunners of Pesticides in Classical Greece and Rome. *Ag. Food Chem*, 23(6), pp. 1050–1061. 38

24. Bradman, A.S., Schwartz, J.M., Fenster, L., Barr, D.B., Holland, N.T. and Eskenazi, B. (2007). Factors predicting organochlorine pesticide levels in pregnant Latina women living in a United States agricultural area. *J Expo Sci Environ Epidemiol*, 17, pp. 388–399.

25.

26. Schwartz, J.M. and Chevrier, J. (2002) Toxicological Profile for DDT, DDE, DDD. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, City

27. Schwartz, J.M. and Chevrier, J. (2009) Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals online. City, 27(12), pp. 16–24.

28. Gaines, T.B. (1969). Acute toxicity of pesticides. *Toxicol Appl Pharmacol*, 14, pp. 515–533.

29. Cueto, C. Jr., Durham, W.F. and Hayes, W.J. (1956). The effect of known repeated oral doses of chlorophenothane (DDT) in man. *J Am Med Assoc*, 162, pp. 890–897.

30. Morgan, D.P. and Roan, C.C. (1971). Absorption, storage, and metabolic conversion of ingested DDT and DDT metabolites in man. *Arch Environ Health*, 22, pp. 301–308.

31. Eskenazi, B., Chevrier, J., Rosas, L.G., Anderson, H.A., Bornman, M.S., Bouwman, H., Chen, A., Cohn, B.A., de Jager, C. and Henshel, D.S. (2009). The

Pine River statement: human health consequences of DDT use. *Environ Health Perspect*, 117, pp. 1359–1367.

32. Rogan, W.J. and Chen, A. (2005). Health risks and benefits of bis(4-chlorophenyl) –1,1,1–trichloroethane (DDT). *Lancet*, 366, pp. 763–773. 39

33. Misra, U.K., Nag, D. and Murti, C.R. (1984). A study of cognitive functions in DDT sprayers. *Ind Health*, 22, pp. 199–206.

34. Verma JP, Jaiswal DK. Book review: Advances in biodegradation and bioremediation of industrial waste. *Frontiers in Microbiology*. 2016;6:1-2. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01555

35. 2.Prescott LM, Harley JP, Klein DA. *Microbiology*. 5th ed. New York: McGraw Hill; 2002. pp. 10-14

36. 3.Singh R, Singh P, Sharma R. Microorganism as a tool of bioremediation technology for cleaning environment: A review. *International Academy of Ecology and Environmental Science*. 2014;4(1):1-6

36. 4.El Fantroussi S, Agathos SN. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Current Opinion in Microbiology*. 2005;8:268-275. Available at: <https://goo.gl/y6kLsc>

38. 5.Madhavi GN, Mohini DD. Review paper on parameters affecting bioremediation. *International Journal of Life Science and Pharma Research*. 2012;2:77-80. Available at: <https://goo.gl/tBP2C6>

39. 6.Boopathy R. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*. 2000;74:63-67. Available at: <https://goo.gl/eQhPh7>

40. 7.Adams GO, Fufeyin PT, Okoro SE, Ehinomen I. Bioremediation, biostimulation and bioaugmentation: A review. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*. 2015;3:28-39. Available at: <https://goo.gl/9XY7ni>

41. Ash, C., Farrow, J. A. E., Walbanks, S. & Collins, M. D. (1991). Phylogenetic Heterogeneity of the Genus *Bacillus* Revealed by Comparative Analysis of SmallSubunit-Ribosomal RNA Sequences. *Lett. Appl. Microbiol.* 13, 202-206.

42. Barg, H. (2000). Vitamin B12-Produktion durch *Bacillus megaterium*. Diplomarbeit, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br., Deutschland.
43. Barker, H. A., Weissbach, H. & Smyth, R. D. (1958). A Coenzyme Containing Pseudovitamin B12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 44, 1093-1097.
44. Adam, D., Doerr, H. W., Link, H., & Lode, H. (Hrsg.) (2004) *Die Infektiologie*. Springer, BerlinHeidelberg.
45. Yoshino, Y., Kitazawa, T., Kamimura, M., Tatsuno, K., Ota, Y. & Yotsuyanagi, H. (2011) *Pseudomonas putida* bacteremia in adult patients: five case reports and a review of the literature. *J. Infect. Chemother.* 17: 278-282.
46. Pliego, C., Cazorla, F. M., Gonz  les-Sánchez, M. A., Pérez-Jiménez, R. M., de Vicente, A. & Ramos, C. (2007) Selection for biocontrol bacteria antagonistic toward *Rosellinia necatrix* by enrichment of competitive avocado root tip colonizers. *Res. Microbiol.* 158 (5): 463-470.
47. Bouallegue, O., Mzoughi, R., Weil, F. X., Mahdhaoui, N., Salem, B. Y., Sboui, H., Grimont, K. & Grimont, P. A. (2004) Outbreak of *Pseudomonas putida* bacteraemia in a neonatal intensive care unit. *J. Hosp. Infect.* 57: 88-91.
48. Dervisoglu, E., Dundar, D. O., Yegenaga, I. & Willke, A. (2008) Peritonitis due to *Pseudomonas putida* in a patient receiving automated peritoneal dialysis. *Infection* 36 (4): 379-380.
49. Bator I., Kubicki S. (2020). Construction of bacterial cell factories for heterologous rhamnolipid production. 7. BioSC Spotlight-Modular Biotransformations in a Circular Bioeconomy. Aachen/DE, 2020-02-07. Kubicki S., Bator I., Bollinger A., Molitor R., Linden S., Tiso T., Loeschcke A., Jaeger K.-E., Thies S., (2019). Recombinant bacterial cell factories for discovery, tailoring, and production of biosurfactants. 2 nd Synthetic Biology for Natural Products Conference. Puerto Vallarta/MX, 2019-06-03.
51. John E. Bennett MD, in Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 2020
52. Kunapuli T. Madhusudhan, John R. Sokatch, in Methods in Enzymology, 2000

53. David P. Clark, Nanette J. Pazdernik, in *Biotechnology* (Second Edition), 2016
54. Brooke JS. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2012;25:2–41.
55. Palioura S, Gibbons A, Miller D, et al. Clinical features, antibiotic susceptibility profile, and outcomes of infectious keratitis caused by *Stenotrophomonas maltophilia*. *Cornea* 2018;37:326–30.
56. Sumida K, Chong Y, Miyake N, et al. Risk factors associated with *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia: a matched case-control study. *PloS One* 2015;10:e0133731.
57. Wang CH, Lin JC, Lin HA, et al. Comparisons between patients with trimethoprim-sulfamethoxazole-susceptible and trimethoprim-sulfamethoxazole-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* monomicrobial bacteremia: a 10-year retrospective study. *J Microbiol Immunol Infect* 2016;49:378–86.
58. Ebara H, Hagiya H, Haruki Y, et al. Clinical characteristics of *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia: a regional report and a review of a Japanese case series. *Intern Med* 2017;56:137–42.
59. Murdoch DR, O'Brien KL, Driscoll AJ, et al. Laboratory methods for determining pneumonia etiology in children. *Clin Infect Dis* 2012;54 Suppl 2:S146–52.
60. Farshad S, Norouzi F, Aminshahidi M, Heidari B, Alborzi A. Two cases of bacteremia due to an unusual pathogen, *Comamonas testosteroni* in Iran and a review literature. *J Infect Dev Ctries*. 2012;6:521–5
61. Brady TB, Marcon MJ. Less commonly encountered nonenteric Gram-negative bacilli. In: Long SS, Pickering LK, Prober CG, editors. *Principles and Practise of Pediatric Infectious Diseases*. Churchill Livingstone; 2008. pp. 828–831.
60. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Phys. Plant.** 1962, V.15, N 3, p. 473–497.

61. Бузіашвілі А.Ю., Ємець А.І. Аналіз впливу різних комбінацій регуляторів росту на регенерацію пагонів цінних сортів *Lucopersicon esculentum* Mill. В умовах *in vitro*. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2016. Т.19., С.88-92
62. Buziashvili A., Cherednichenko L., Kropyvko S., Yemets A. Transgenic tomato lines expressing human lactoferrin show increased resistance to bacterial and fungal pathogens. **Biocatalysis Agricult. Biotechnol.**, 2020, V. 25: 101602, p. 1-8 doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101602
63. Бутенко Р.Г. Культура изолированных растительных тканей и физиология морфогенеза растений / Р.Г. Бутенко // М.: Наука, - 1964. – 272 с.
64. Бутенко Р.Г. Изменчивость генома растительной клетки при культивировании в условиях *in vitro* / Р.Г. Бутенко, С.А. Гостимский // Биотехнология. 1985. – С.79-85.
65. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе / Р.Г. Бутенко / М.: ФБК-ПРЕСС. -1999. – 157с.
66. Білоус С.Ю. Біотехнологічні аспекти введення в культуру *in vitro* дуба Максима Залізняка / С.Ю. Білоус, Ю.В. Коломієць // Інтродукція рослин, збереження та збагачення біорізноманіття в ботанічних садах та дендропарках: Матеріали міжнародної наукової конференції присвяченої 75-річчю заснування Національного ботанічного саду ім. М.М. Гришка НАН України. – Київ: Фітосоціоцентр. – 2010. – С.583-587.
67. Черевченко Т.М. Методи насіннєвого та клонального мікророзмноження ендема о. Мадагаскар – *Angraecum eburneum* bory (Orchidaceae juss.) // Т.М. Черевченко, А.І. Буюн, А.М. Лаврентьєва, Р.В.Іванніков // Інтродукція рослин. – 2011. - №3. –С.3-9.
68. Калинин Ф.А. Технология микрклонального размножения растений / Ф.А. Калинин, В.В. Сарнацкая // К.: Наукова думка. – 1992. – 232 с.

69. Черевченко Т.М. Биотехнология тропических и субтропических растений *in vitro* / Т.М. Черевченко, А.М. Лаврентьева, Р.В.Іванніков // К.: Наукова думка. – 2008. – 560 с.
70. Mineo L. Plant tissue culture techniques / L. Mineo // ABLE. – 1990. – Vol. 11. – P. 151-174.
101. Sangwan R.S. *In vitro* techniques and plant morphogenesis: fundamental aspects and practical application / R.S. Sangwan, B.S. Sangwan-Noreel, H. Harada // Plant Biotechnology. – 1997. – Vol. 14. – 2. – P. 93-100
71. Sidy Ya. *In vitro* micropropagation of medical plants by tissue culture // Ya.Sidy // The Polumouth Student Scientist. – 2010. – Vol. 4. - №1, - P. 423-449.
72. Chaudhry Z, Abbas S, Yasmin A, Rashid H, Ahmed H, Anjum MA (2010) Tissue culture studies in tomato (*Lycopersicon esculentum*) var. Moneymaker. Pak J Bot 42: 155-163
73. Gerszberg A, Hnatuszko-Konka K, Kowalczyk T, Kononowicz AK (2016) Efficient *in vitro* callus induction and plant regeneration protocol for different Polish tomato cultivars. Not Bot Horti Agrobo 44: 452-8. <https://doi.org/10.15835/nbha44210530>
74. Hanur VS, Krishnareddy B. (2016) In-vitro organogenesis in tomato (*Solanum Lycopersicum*) using kinetin. Adv Plants Agric Res 4: 00155. <https://doi.org/10.15406/apar.2016.04.00158>
75. Genesia F.O. Thidiazuron and explant type effects on high-frequency *in vitro* mass propagation of cherry tomato // F.O. Genesia // Hortscience Journal Canal University. – 2019. V.8(1). – P. 23-33.
76. Skoog F. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro* / F.Skoog, C. Miller // Inc: The biological action of growth substances (ed. porter h.k.) Academic Press, N.Y. – 1957. – 11. – P. 118-131.
77. Bhojwani S.S. Plant tissue culture: theory and practice, a revised edition // S.S. Bhojwani, M.K. Razdan // - Elsevier, Amsterdam. – 1996. – 767p.

78. Gubiš J, Lajchová Z., Faragó J, Jureková Z (2003) Effect of genotype and explant type on shoot regeneration in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) *in vitro*. *Czech J Gen Plant Breed* 39: 9-14. <https://doi.org/10.17221/3715-CJGPB>
79. Gubiš J, Lajchová Z, Klčova L., Jureková Z (2005) Influence of growth regulators on plant regeneration in tomato. *Hort Sci (Prague)* 32: 118-122
80. Plana D, Fuentes A, Alvarez M, Lara RM, Alvarez F, Pujol M (2006) A new approach for *in vitro* regeneration of tomato plants devoid of exogenous plant growth hormones. *Biotech J* 1: 1153-1157. <https://doi.org/10.1002/biot.200500042>
81. Vinoth S., Gurusaravanan P., Jayabalan N (2012) Effect of seaweed extracts and plant growth regulators on high-frequency *in vitro* mass propagation of *Lycopersicon esculentum* L (tomato) through double cotyledonary nodal explant. *J Appl Phycol* 24: 1329-1337. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9717-9>
82. Liza LN, Nasar ANM, Zinnah KMA, Chowdhury MAN, Ashrafuzzaman M (2013) *In vitro* growth media effect for regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum*) and evaluation of the salt tolerance activity of callus. *J Agricult Sust* 3: 132-143.
83. Hanur VS, Krishnareddy B. (2016) In-vitro organogenesis in tomato (*Solanum Lycopersicum*) using kinetin. *Adv Plants Agric Res* 4: 00155. <https://doi.org/10.15406/apar.2016.04.00158>
84. Gerszberg A, Hnatuszko-Konka K, Kowalczyk T, Kononowicz AK (2016) Efficient *in vitro* callus induction and plant regeneration protocol for different Polish tomato cultivars. *Not Bot Horti Agrobo* 44: 452-8. <https://doi.org/10.15835/nbha44210530>
85. Іутинська Г.О., Ямборко Н.А., Піндрус А.А., Мельничук С.Д., Лоханська В.Й., Баранов Ю.С., Самкова О.П. Мікробна деструкція похідних циклічних вуглеводнів (альфа-, бета-, гамма- гексахлорциклогексані) у ґрунті // Наукові доповіді НАУ. – 2007. -1(6). С. 1-13.

86. Ямборко Н.А., Пиндрус А.А. Токсическое и мутагенное действие гексахлорциклогексана и продуктов его микробной деструкции на микробный ценоз почвы // Мікробіол.журн., 2011, Т.73, №6. С. 50-57.