МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ФАКУЛЬТЕТ ЕКОЛОГІЧНОЇ БЕЗПЕКИ, ІНЖЕНЕРІЇ ТА ТЕХНОЛОГІЙ
КАФЕДРА БІОТЕХНОЛОГІЇ

ДОПУСТИТИ ДО ЗАХИСТУ
Завідувач випускової кафедри
_____М. М. Барановський
«__»_____2020 р.

ДИПЛОМНА РОБОТА

(ПОЯСНЮВАЛЬНА ЗАПИСКА)
ВИПУСКНИКА ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА
ЗА СПЕЦІАЛЬНІСТЮ 162 «БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА БІОІНЖЕНЕРІЯ»

Тема: «Фармакологічний потенціал мікроміцетів ґрунтів і ризосфери Кінського каштану (*Aesculus hippocastanum*)»

Виконавець: студентка 205-м ФЕБІТ Теряєва Н.П.

Керівник: к.б.н., доцент кафедри біотехнології Андріанова Т.В.

Консультант розділу «Охорона праці» : Павлиш В.Д.

Консультант розділу
«Охорона навколишнього середовища» : Рябчевський О.В.

Нормоконтролер: Дражнікова А.В.

КИЇВ 2020

НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет екологічної безпеки, інженерії та технологій

Кафедра біотехнології

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач випускової кафедри
_____М.М.Барановський
«___»_____2020 р

ЗАВДАННЯ

на виконання дипломної роботи

Теряєвої Наталії Петрівни

1. Тема дипломної роботи: «Фармакологічний потенціал мікроміцетів ґрунтів і ризосфери Кінського каштану (*Aesculus hippocastanum*)» затверджена наказом ректора від «15» вересня 2020 р. № 1657/ст.
2. Термін виконання роботи: з 5 жовтня по 23 грудня 2020 р.
3. Вихідні дані роботи: власні експериментальні дані, зроблені на базі лабораторії кафедри біотехнології НАУ; ґрунт із ризосфери *Aesculus hippocastanum* (зібраний в м. Київ); літературні джерела щодо біологічно активних речовин рослин та грибів.
4. Зміст пояснювальної записки: ВСТУП; РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД; РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ; РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ; РОЗДІЛ 4. ОХОРОНА ПРАЦІ; РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА; ВИСНОВКИ; СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.
5. Перелік обов’язкового графічного (ілюстративного) матеріалу: 8 таблиць, 14 рисунки.
6. Календарний план-графік

№	Завдання	Термін виконання
1	Літературний огляд за темою дипломної роботи: «Фармакологічний потенціал мікроміцетів ґрунтів і ризосфери Кінського каштану (*Aesculus hippocastanum*)».	01.09.20-15.09.20
2	Складання схеми виконання дипломної роботи.	16.09.20-18.09.20
3	Ознайомлення з методикою постановки експерименту на базі проходження переддипломної практики.	20.09.20-22.09.20
4	Проведення експерименту на базі проходження переддипломної практики.	22.09.20-20.10.20
5	Аналіз та обробка отриманих даних.	21.10.20-25.10.20
6	Оформлення практичної частини дипломної роботи на основі отриманих результатів.	25.10.20-31.10.20
7	Написання розділів «Охорона праці» та «Охорона навколишнього середовища»	01.11.20-12.11.20
8	Формулювання висновків та рекомендацій.	13.11.20-20.11.20
9	Перевірка дипломної роботи керівником.	28.11.19-05.12.20
10	Попередній захист дипломної роботи.	10.12.20
11	Захист дипломної роботи.	23.12.20

7. Консультація з окремого(мих) розділу(ів):

Назва розділу	Консультант (посада, П.І.Б.)	Дата, підпис	
		Завдання видав	Завдання прийняв
Охорона праці	Павлиш В.Д.		
Охорона навколишнього середовища	Рябчевський О.В.		

8. Дата видачі завдання: «_____»_____2020 р.

Керівник дипломної роботи _____ Андріанова Т.В.

Завдання прийняла до виконання_____ Теряєва Н.П.

РЕФЕРАТ

Пояснювальна записка до дипломної роботи «Фармакологічний потенціал мікроміцетів ґрунтів і ризосфери Кінського каштану (*Aesculus hippocastanum*)»: 80 с., 14 рис., 8 табл., 52 літературних джерел.

Об'єкт дослідження – аналіз кількісного і якісного вмісту фармакологічно потенційних речовин мікроміцетів ґрунтів і ризосфери кінського каштану (*Aesculus hippocastanum* L.).

Предмет дослідження – мікроміцети ризосфери кінського каштану (*Aesculus hippocastanum* L.).

Мета дипломної роботи – вивчити мікроміцети ґрунтів і ризосфери *Aesculus hippocastanum* L., а також визначити вміст фармакологічно потенційних речовин з отриманих культур мікроміцетів.

Методи дослідження – мікробіологічні, фізико–хімічні, аналітичні, статистичні методи обрахунку отриманих результатів.

РИЗОСФЕРА, МІКРОМІЦЕТИ, АЛКАЛОЇДИ, ФЛАВОНОЇДИ, ЕНДОФІТНІ СПІВТОВАРИСТВА, СПЕКТРОФОТОМЕТР, ПРОДУЦЕНТ

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ, ТЕРМІНІВ 7
ВСТУП 8
РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД 12
1.1. Короткі теоретичні відомості про ризосферу 12
1.2. Ботаніко – фармакологічна характеристика *Aesculus hippocastanum* L. 19
1.3. Ґрунтові гриби 24
1.4. Біологічно активні речовини грибів 27
1.5. Висновки до розділу 32
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ 33
2.1. Виділення грибів із ґрунту 33
2.2. Методи визначення флавоноїдів 38
2.3. Методи визначення алкалоїдів 40
2.4. Висновки до розділу 43
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ 44
3.1. Результати виділення грибів 44
3.2. Вміст алкалоїдів та флавоноїдів 46
3.3. Висновки до розділу 51
РОЗДІЛ 4. ОХОРОНА ПРАЦІ 52
4.1. Небезпечні та шкідливі виробничі фактори при дослідженні ґрунтових грибів 52
4.2. Технічні та організаційні заходи для зменшення рівня впливу небезпечних та шкідливих виробничих факторів при дослідженні ґрунтових грибів 54
4.3. Забезпечення пожежної та вибухової безпеки при дослідженні ґрунтових грибів 62
4.4. Висновки до розділу 64
РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА 65
5.1. Ґрунт, ґрунтова флора та фауна, їх значення та функції 65

5.2. Фактори впливу антропогенної діяльності на стан ґрунтів та ґрунтової флори і фауни 68
5.3. Висновки до розділу 74
ВИСНОВКИ 75
СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ 75

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ, ТЕРМІНІВ

БАР – біологічно активні речовини

КГА – картопляно-глюкозний агар

ЛЗ – лікарський засіб

D – оптична густина

ГДК – гранично допустима кількість

УФ – ультрафіолетове випромінювання

СЗ – стандартний зразок

ВСТУП

Актуальність теми. Розробка нових лікарський засобів включає в себе, перш за все, пошук нових фармакологічно активних речовин, наступним етапом є вивчення їх лікарських властивостей. Проблема пошуку нових високоефективних фармакологічних речовин донині не втрачає своєї актуальності. Причиною цього є низька ефективність або відсутність такої у відомих лікарських препаратів, що застосовуються для профілактики і терапії ряду патологічних станів, а також наявність побічних реакцій, що викликають дискомфортні відчуття у пацієнтів під час лікування.

Фармацевтична розробка лікарських препаравіт здійснюється з біологічно активних речовин отриманих природним шляхом або синтитичним. За статистикою ВООЗ, до 80 % населення планети віддають перевагу препаратам природного походження. Препарати з використанням біологічно активних речовин природного походження мають ряд переваг над препаратами створеними шляхом хімічного синтезу. Головними перевагами даних препаратів є – широкий спектр дії, понижену токсичність і здатність не накопичуватись в організмі, що зумовлює можливість їх тривалого застосування.

Найбільш доступним об’єктом для отримання біологічно активних речовини природного походження є рослинна сировина. Хоча відомо, що гриби також є продуцентами біологічно активних речовин, проте в порівнянні з рослинами – гриби вивченні менше.

Рослини добре відомі як джерела біологічно активних сполук, на які існує постійний попит, завдяки їхнім природним властивостям. Виробництво рослинами біологічно активних речовин залежить як від генотипу, так і умов навколишнього середовища. На ріст, якість та стан лікарських рослин має потужний вплив та контроль їх мікробіоти шляхом взаємного обміну метаболітами з цими партнерами. Лікарські рослини характеризуються особливим угрупуванням мікроорганізмів,

завдяки їх унікальним та структурно відмінним біологічно активним вторинним метаболітам, які є причиною високої специфічності асоційованих мікроорганізмів.

Відомо, що мікроорганізми, в томи числі гриби є постійним супутником рослини. Принципово важливими для живлення рослин, стимуляції ростових процесів є мікроорганізми, асоційовані з кореневою системою рослини. Вони поселяються і ведуть активний спосіб життя як на поверхні, так і всередині зелених частин рослин, їх коріння, насіння, плодів. Перебуваючи в тісному контакті з рослинами, мікроорганізми роблять на них як корисну дію, забезпечуючи мінеральними елементами живлення і активаторами росту, так і шкідливе, викликаючи різні захворювання. Рослини в свою чергу також впливають на своїх супутників. Ступінь взаємного впливу виражається тим сильніше, чим більше контакт між даними організмами. Активне виділення корінням рослин в навколишнє середовище різних органічних сполук забезпечує поживними речовинами ґрунтові мікроорганізми, що створює сприятливі умови для їх існування в зонах ризосфери. Багатьох дослідників все більше привертають увагу до структури та функцій ризосферних угруповань.

Отримавши активний розвиток у другій половині минулого століття мікробіологічні дослідження ґрунту були орієнтовані насамперед на досягнення практичних цілей. Розроблялися такі питання, як мікроорганізми і родючість ґрунту, мікроорганізми як основа біологічних методів боротьби із захворюваннями рослин, мікроорганізми як джерела біологічно активних речовин [1, 2].

У процесі вивчення мікробіоценозу прикореневої зони рослин (ризосфери) були отримані принципово нові дані про рослинно-мікробних взаємодій, які не втратили свою актуальність і вданий час. Отримання біологічно активних речовин з мікроміцетів ґрунтів і ризосфери – може стати матеріальною базою для створення лікарських засобів природного походження, що зумовлює актуальність пошуку і впровадження в медичну практику нових сучасних і ефективних технологій і лікарських субстанцій.

Мета роботи: вивчити мікроміцети ґрунтів і ризосфери *Aesculus hippocastanum* L., а також визначити вміст фармакологічно потенційних речовин в отриманих культур мікроміцетів.

Для досягнення поставленої мети необхідно вирішити наступні **завдання:**

1. Проаналізувати стан досліджень мікроміцетів ґрунтів і ризосфери.
2. Виділити мікроміцети в чисту культуру з ризосфери *Aesculus hippocastanum.*
3. Дослідити вміст фармакологічно потенційних речовин в виділених грибах.

Об'єкт дослідження: аналіз кількісного і якісного вмісту фармакологічно потенційних речовин мікроміцетів ґрунтів і ризосфери кінського каштану (*Aesculus hippocastanum*).

Предмет дослідження: мікроміцети ризосфери кінського каштану (*Aesculus hippocastanum*).

Методи дослідження: мікробіологічні, фізико–хімічні, аналітичні, статистичні методи обрахунку отриманих результатів.

Наукова новизна отриманих результатів. Запропоновано нове джерело отримання біологічно активних речовин, а саме, алкалоїдів та флавоноїдів з мікроміцетів ґрунтів і ризосфери *Aesculus hippocastanum*, які в подальшому можуть бути використані при розробці фармацевтичних препаратів. Ефективність виробництва біологічно активних речовин може бути підвищена експериментально на основі сучасних біотехнологій.

Практичне значення отриманих результатів. Так як більшість лікарських препаратів створюється на основі речовин, що створені синтетичним шляхом запропоновано використовувати біологічно активні речовини природного походження з мікроміцетів ґрунтів і ризосфери Кінського каштану (*Aesculus hippocastanum*).

Матеріали дипломної роботи рекомендується використовувати під час проведення наукових досліджень і в практичній діяльності біотехнологів, як один із способів отримання біологічно активних речовин природного походження, які є

потенційно – перспективними при створенні нових високоефективних лікарських препаратів.

Особистий внесок випускника. Дипломна робота була виконана на базі лабораторії кафедри біотехнології Національного авіаційного університету під керівництвом к.б.н., доцента Т.В. Андріанової. Весь обсяг експериментальних досліджень за темою дипломної роботи, аналіз літературних даних, обробка результатів, їх опис та аналіз виконані випускником особисто.

РОЗДІЛ 1
ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1. Короткі теоретичні відомості про ризосферу

Перша згадка про ризосферу відноситься до 1904 року, коли німецький вчений Лоренц Гільтнер методом посіву виявив підвищений вміст мікроорганізмів в прикореневій зоні ряду трав'янистих рослин і висловив припущення про зв'язок цього явища з життєдіяльністю коренів. Гільтнер запропонував термін ризосфера (від грец. *rhiza* – корінь) для позначення тієї частини ґрунту, яка безпосередньо примикає до коріння рослини і в якій концентруються мікроорганізми [3].

Виявлення в 1926 р російським вченим С.П. Костичевим азотобактерій в прикореневій зоні тютюну [3], а також публікацію 1938 року про вплив вищих рослин на мікроорганізми ризосфери – можна розглядати як одні з перших робіт в області вивчення ризосфери [1].

Однак систематичні дослідження по взаємодії рослин з ґрунтовими мікроорганізмами отримали розвиток в 50-70 ті роки двадцятого століття. У міру поступового накопичення даних формувалися уявлення про рослинно-мікробні взаємодіях в прикореневій зоні [4], що не втратили і донині своєї актуальності, як не втратили її і отримані в 70-80 і роки принципово нові дані про таких вельми значущих аспектах життєдіяльності ґрунтових мікроорганізмів, як біологічна фіксація азоту та взаємовідносини з вищими рослинами [5].

Коренева система рослин розвивається, проникаючи вглиб ґрунту, вступає у взаємодію з ґрунтовими мікроорганізмами, тваринами і корінням інших рослин. Навколо кореня формується особливий екзосімбіоз – так звана ризосфера.

Ризосфера – (від грец. ρίζα – корінь і σφα.ῖρα – м'яч, куля) тонкий шар ґрунту, що прилягає до коріння рослини і потрапляє під безпосереднє дію кореневих виділень і ґрунтових мікроорганізмів, товщиною близько 2-5 мм [6]. Схематичне зображення ділянки ризосфери наведено на рис.1.1 [7].

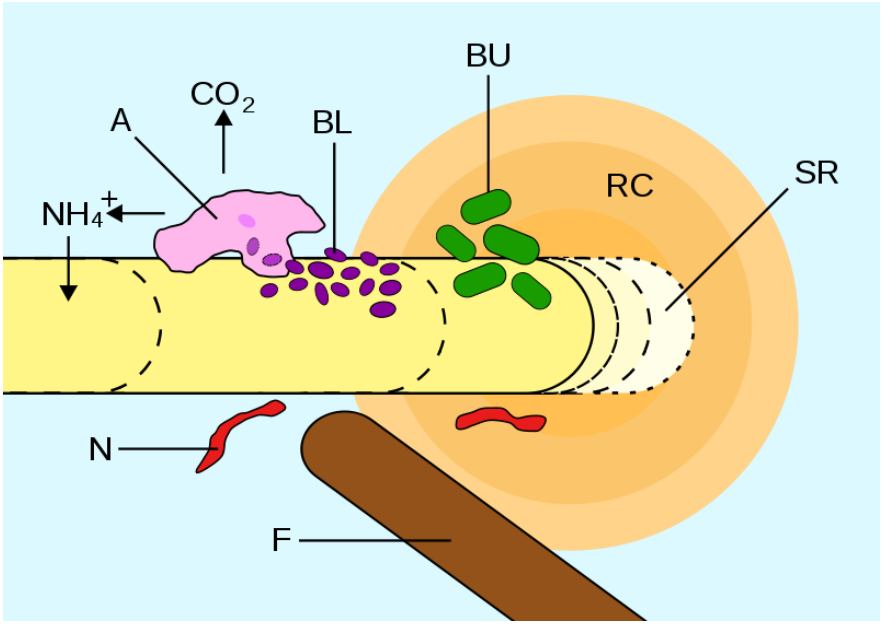


Рис.1.1. Ділянка ризосфери: *A* – амеба, що поїдає бактерій; *BL* – малоактивні бактерії; *BU* – активні бактерії; *RC* – одержаний коренем вуглець; *SR* – відмерлі кореневі волоски; *F* – гіфа гриба; *N* – нематода

Мікроорганізми ризосфери, що впливають на ріст та розвиток рослин, виділяють в окрему групу ґрунтових мікроорганізмів – PGPR (plant growth-promoting rhizobacteria). *Rhizobium*, *Pseudomonas* і мікроміцети є найвідомішими мешканцями ризосфери, які постачають рослинам необхідні поживні речовини [8].

Кожен з органів вищих рослин являє собою особливу екологічну нішу, заселену мікроорганізмами. Для позначення цих ніш прийняті терміни: філлосфера (надземні частини рослин), філлоплана (поверхня надземних вегетативних органів рослин), ризосфера (вузька зона ґрунту, яка безпосередньо оточує коріння рослин) і ризоплан (поверхня коренів рослин), спермосфера (насіння). Існування мікроорганізмів в даних екологічних нішах обумовлено прижиттєвими виділеннями рослин, які використовуються мікроорганізмами в якості поживних субстратів (наприклад, стебла і листя виділяють вуглеводи і органічні кислоти). При цьому мікроорганізми поселяються на поверхні різних органів рослин, утворюючи епіфітное співтовариство і впроваджуються в тканини рослин, утворюючи ендофітні співтовариства. Таким чином, в процесі росту і розвитку рослини виступають як центри формування мікробних угруповань [1, 9, 10].

У сучасній літературі, поряд з раніше прийнятими термінами («ризосфера», «ризоплана»), зустрічається і дещо інший підхід до визначення ризосфери, яку поділяють на більш вузькі верстви: ендоризосферу (внутрішні тканини кореня), ризоплану (поверхня коренів рослин) і екторизосферу (зона ґрунту з зовнішнього боку кореня) (рис.1.2) [11, 12].

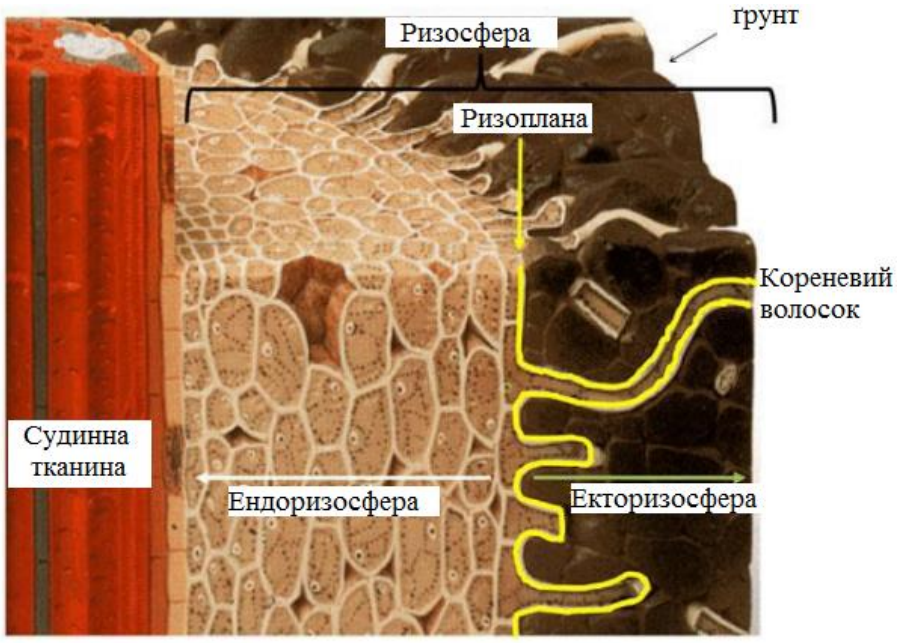


Рис.1.2. Схематичне зображення ризосфери

Активне виділення корінням рослин в навколишнє середовище різних органічних сполук забезпечує поживними речовинами ґрунтові мікроорганізми, що створює сприятливі умови для їх існування в зонах ризосфери і ризоплани. Кореневі виділення, або кореневі ексудати, являють собою низькомолекулярні органічні речовини, які є продуктами фотосинтезу і метаболізму рослин: цукор, органічні кислоти, амінокислоти, спирти, а також фізіологічно активні речовини – вітаміни, ферменти, гормони, алкалоїди, глюкозиди, флавоноїди і ін. Загалом харчування мікроорганізмів в ризосфері забезпечують кореневі ризодипозити, які включають, крім кореневих ексудатів, високополімерні слизи полісахаридної і білкової природи, втрачені частини рослини (кореневий чохлик, кореневі волоски, відмерлі ділянки кореня) [13, 14]. Ексудати, такі як органічні кислоти, змінюють хімічну структуру ризосфери в порівнянні з основною масою ґрунту. Концентрації органічних кислот і

вуглеводів впливають на здатність рослини поглинати фосфор, азот, калій і воду через корені, а також на загальну доступність заліза для рослини і його сусідів. Здатність рослини впливати на доступність заліза та інших мінералів для своїх сусідів, надаючи певні транспортні білки, впливає на склад співтовариства і пристосованість.

Рослини виділяють в ризосферу безліч речовин, що виконують різні функції. Стріголактон, рослинний гормон, який впливає на мікоризного гриба, стимулює проростання спор і породжує зміни, що дозволяють грибу обплести корінь рослини і утворити мікоризу. Симбіотичні азотофіксуючі бактерії, такі як представники роду *Rhizobium*, розпізнають невідому речовину, що виділяється корінням рослин сімейства *Fabaceae* і виділяють Nod-фактор, який повідомляє рослині про присутність в довколишньому ґрунті цих бактерій. Після цього на коренях рослини утворюються кореневі бульби, в яких поселяються бактерії, що забезпечуються поживними речовинами, переводять азот в форму, яку може засвоїти рослина. Несимбіотичні азотофіксуючі бактерії поселяються в ризосфері, але тільки зовні від коренів декількох рослин і схожим чином «фіксують» азот в багатій азотом ризосфері рослини. Хоча вважається, що ці бактерії в своєму місцезнаходженні не мають міцного зв'язку з рослинами, вони сильно відповідають на стан рослини.

Феномен більш високої щільності мікроорганізмів в прикореневій зоні за рахунок споживання кореневих ексудатів і ризодипозитів отримав назву ризосферного ефекту. У ризосфері і ризоплані в значних кількостях концентруються бактерії, актинобактерії, мікроміцети, істотно підвищуючи вміст цих же організмів у вільних від коренів ґрунтах. Заселеність ризосфери мікроорганізмами характеризується відношенням R/S (*rhizosphere/soil* – ризосфера/ґрунт), яке розраховують для різних видів, родів і сімейств мешканців ризосфери. Величина R/S показує, у скільки разів кількість мікроорганізмів певної таксономічної групи в ризосфері даної рослини перевищує кількість цих мікроорганізмів в ґрунті. Для бактерій дана величина варіює в межах від 10 до 100 [15].

Для мікрофлори ризосфери характерна наявність грамнегативних бактерій родів *Azospirillum, Azotobacter, Agrobacterium, Enterobacter, Klebsiella, Pseudomonas,*

Xantomonas і ін., Грампозитивних бактерій роду *Bacillus,* актинобактерій родів *Nocardia, Micromonospora, Streptomyces* і ін., мікроскопічних грибів родів *Penicillium, Gliocladium, Talaromyces, Humicola* і ін. [10].

Особливості асоціацій мікроорганізмів в ризосфері в плані їх відносин з рослинами:

1. Взаємодія цих мікроорганізмів з рослинами не призводить до утворення на коренях рослин будь-яких спеціалізованих структур, однак має місце утворення специфічних бактеріальних з'єднань, що сприяють прикріплення мікроорганізмів до коріння.

2. Формування асоціацій є багатостадійним процесом і включає переміщення мікроорганізмів (за рахунок хемотаксиса) до коріння і прикріплення до них, утворення мікроколоній на поверхні коренів, а також проникнення мікроорганізмів всередину кореня і колонізацію міжклітинного простору [16]. Локалізовані на поверхні коренів мікроколонії бактерій покриті слизовим шаром полісахаридної природи, який захищає клітини і колонію в цілому від несприятливих умов навколишнього середовища.

Асоціативні рослинно-мікробні відносини послугували відправною точкою для розвитку концепції асоціативного симбіозу, згідно з якою рослина-господар (макросимбіонт) і асоційовані з ним мікроорганізми (мікросимбіонти) утворюють багатокомпонентну інтегральну систему з новими властивостями, детермінованими взаємодією партнерів [17].

В даний час організм рослини або тварини все частіше розглядають в сукупності з усіма асоційованими з ним мікроорганізмами. Для цього запропоновані термін голобіонт (*holobiont*) і гологеномна (*hologenome*) теорія еволюції, яка розглядає голобіонт в якості одиниці відбору в еволюції. Відповідно до цієї теорії генетичну різноманітність мікробних симбіонтів може відігравати важливу роль як в адаптації, так і в еволюції вищих організмів [18]. Функціонування рослинного голобіонта досліджується в світлі екологічних і еволюційних теорій. Передбачається, що рослина може модулювати свою мікрофлору, динамічно адаптуючи її до навколишнього середовища. Більш повне розуміння взаємодії

генома самого рослини і генома його мікробіоти необхідно для більш повного використання потенціалу культурних рослин [19]. Таким чином, мікробіом рослин визнається як додатковий фактор в селекції культурних рослин [20].

Симбіоз рослин і мікроорганізмів призводить до більш складним взаємодій, які впливають на ріст рослин та конкуренцію за ресурси. Велика частина кругообігу поживних речовин і придушення хвороб за допомогою антибіотиків, необхідних рослинам, відбувається безпосередньо поруч з корінням через кореневі ексудати і продукти метаболізму симбіотичних і патогенних спільнот мікроорганізмів. Ризосфера також надає простір для виробництва аллелохімічних речовин, які контролюють сусідів. Петля зворотного зв'язку рослина-ґрунт та інші фізичні фактори, що виникають на кордоні розділу рослина-ґрунт, є важливими факторами селективного тиску для спільнот і зростання в ризосфері і ризоплані.

Різноманітність ризосферних мікробних спільнот визначається як якісним і кількісним складом кореневих виділень, які залежать від виду, віку і умов вирощування рослин, так і ґрунтово-кліматичними умовами [1, 10]. В процесі вегетації рослини спостерігається закономірна зміна бактеріальних компонентів ризосфери. Розвиток рослин супроводжується змінами складу кореневих ексудатів і кореневих ризодипозитів, що відбивається на ризосферних мікроорганізмах. У кореневій зоні молодих рослин домінують грамнегативні бактерії родів *Pseudomonas, Flavobacterium, Azotobacter* і ін., Які в міру старіння рослин змінюються грампозитивними – бактеріями роду *Bacillus* та актинобактерий родів *Mycobacterium, Streptomyces*. По суті, бактерії, що харчуються кореневими ексудату, замінюються на бактерії-гідроліти (утворюють гідролітичні ферменти), які розкладають кореневий опад, старі корені, мікробну біомасу. Що стосується кількісного вмісту бактерій, то ризосферний ефект збільшується після проростання насіння і досягає максимуму в період цвітіння і плодоношення рослин. Відзначається, що в межах одного кореня мікроорганізми розподілені нерівномірно: їх різноманітність наростає в області молодих верхівкових коренів, де відбувається максимальне виділення розчинних органічних сполук [1].

Протягом останніх двадцяти років питання про механізми позитивного впливу ризобактерій на рослини залишається в центрі уваги фахівців, що вивчають рослинно-мікробні асоціації. Виходячи з даних літератури, основні механізми позитивного впливу ризобактерій на життєдіяльність рослин, можна умовно розділити на два типи:

- пряма або безпосередня стимуляція росту рослин за рахунок синтезу стимуляторів росту (фітогормонів та інших метаболітів) і поліпшення живлення рослин;
- опосередкована стимуляція росту рослин за рахунок витіснення і придушення розвитку ґрунтових фітопатогенних мікроорганізмів [21].

Утворення мікроорганізмами фітогормонів, вітамінів та інших біологічно активних речовин відноситься до найважливіших механізмів взаємодії в рослинно-бактеріальних асоціаціях. Синтез фітогормонів притаманний ризосферним, епіфітним і симбіотичним мікроорганізмам, які стимулюють, і покращують ріст та розвиток рослин. У той же час, фітогормони синтезуються також і патогенними мікроорганізми, причому у кількостях, що значно перевищують потреби рослин. Мікроміцети, що належать до родів *Fusarium, Rhizoctonia, Rhizopus, Absidia, Aspergillus, Penicillium, Monilia, Phoma, Pythium, Trichoderma, Actinomucor, Amanita* можуть утворювати ауксини, зокрема, індоліл-3-оцтову кислоту. Здатність до біосинтезу гіберелінів виявлена серед представників усіх груп мікроорганізмів, але найактивнішими продуцентами є мікроміцети роду *Phaeosphaeria* і *Gibberella fujikuroi,* які здатні утворювати більш, ніж 1000 мг/л гіберелової кислоти [22].

В основі механізмів опосередкованої стимуляції росту рослин лежать антагоністичні стосунки PGPR-бактерій і фітопатогенних мікроорганізмів – мікроскопічних грибів і бактерій [23]. Корисні, нейтральні та шкідливі для рослини мікроорганізми, які населяють ризосферу, конкурують один з одним за загальні харчові субстрати і місця проживання. При успішній конкуренції PGPR-бактерії пригнічують ріст і розвиток ґрунтових фітопатогенів, витісняють їх із зони впливу на рослини. Як наслідок, обмежуються інфікування і захворюваність рослин, що

сприяє їх нормальному росту і розвитку. Таким чином, в процесі своєї життєдіяльності ризобактерій здатні здійснювати функцію біологічного контролю. Під біологічним контролем розуміють використання живих організмів для обмеження зростання і розвитку фітопатогенних мікроорганізмів [24].

1.2. Ботаніко-фармакологічна характеристика *Aesculus hippocastanum* L.

Гіркокаштан звичайний, або кінський каштан звичайний (*Aesculus hippocastanum* L.*)* – отруйна багаторічна рослина родини *Sapindales*, біологічна класифікація представлена у табл. 1.1. Народними назвами рослини є: каштан дикий, каштан білий, горіх кінський. Розповсюджена лікарська, медоносна та декоративна культура [25].

Таблиця 1.1

Біологічна класифікація *Aesculus hippocastanum*

Домен:	Ядерні *(Eukaryota)*
Царство:	Зелені рослини *(Viridiplantae)*
Відділ:	Вищі рослини *(Streptophyta)*
Підклас:	Розиди (*Rosids*)
Порядок:	Сапіндоцвіті (*Sapindales*)
Родина:	Сапіндові (*Sapindaceae*)
Рід:	Гіркокаштан (*Aesculus*)
Вид:	Гіркокаштан звичайний *(Aesculus hippocastanum)*

Гіркокаштан звичайний – листопадне дерево, висотою до 36 м. з низько опущеною розлогою широкоовальною куполоподібною кроною. Стовбур правильної циліндричної форми з темно-коричневою пластинчастою корою. Листки супротивні, великі, пальчасто-складні з 5-7 листочками; довжина листка від 13 до 30 см., 3-10 см. в ширину, обернено-яйцеподібний, до основи клиновидно-звужений (див. рис.1.3). Середній листок крупніше бічних, черешку характерна значна довжина, 15-20 см.

Суцвіття – прямостоячі, пірамідальні або циліндрична волоть. Квітки білого кольору, не правильної форми, з червоними плямочками, зібрані в прямостоячі, пірамідальні волоті. Плід – коробочка, в недозрілому стані зелена, а потім коричнева, вкрита великими шипами. При дозріванні плід розкривається трьома стулками; містить один, інколи 2-3 сімені [26].

Рис.1.3. Кінський каштан

Насіння велике, дещо плескате, з блискучою темно-коричневою шкіркою. Рослина зацвітає в травні після розпускання листя, у вересні каштан дозріває [26]. Розмноження відбувається насінням. Коренева система потужна, з стрижневим головним коренем і сильно розвиненими бічними корінням, що дає змогу дереву бути достатньо вітростійким. Додатково в кореневих волосках кінського каштану розміщені бактерії, що поглинають азот, тому ця культура непримхлива і може успішно функціонувати на бідних на азот ґрунтах.

Культура родом із Греції, на території України зустрічається повсюди, висаджена у парках (алеях) та садах як декоративне дерево.

Для приготування лікарських препаратів, зазвичай, використовують кору молодих гілок (*Cortex A. hippocastani*), листя (*Folia A. hippocastani*), квітки (*Flores A. hippocastani*) і плоди (*Fructus A. hippocastani*).

Методи та час (період) збору залежить напряму від основного компоненту для виготовлення ліків. Кору отримують навесні, використовують молоді гілки, розрізають на шматочки і сушать одразу після збирання на відкритому повітрі або в приміщенні, яке добре провітрюється. Вихід сухої кори становить близько 50 % від свіжозрізаної.

Збір квіток відбувається у травні, їх отримують з грубого загального суцвіття і починають сушити у перший же день на сонці після збору, а потім – під наметом або в приміщенні, яке добре провітрюється. Вихід сухої сировини становить 16-17 %.

Збір листя гіркокаштана звичайного відбувається при цвітінні рослини, тобто у травень. Листя зрізають без черешків. Аналогічно до процесу сушіння відбувається сушка листя на свіжому повітрі під наметом або в приміщенні, яке добре провітрюється, однак важливо розмістити листя тонким шаром 2-3 см. Вихід сухої сировини – 20-22 %.

Збір плодів відбувається, коли вони повністю спілі, в момент, коли вони починають опадати, кінець вересня. Сушка плодів відбувається в добре провітрюваному приміщення, обов’язково при температурі до 25°С. Вихід сухої сировини аналогічно до виходу кори молодих гілок до 50 %. Зберігати готові висушені плоди необхідно в сухому приміщенні [26].

Фармакологічна активність плодів каштана кінського пов'язана з утриманням кумаринового глікозиду ескуліну (ескулозид) і його аглиікона ескулетин (есцінола), оксикумаринового глікозиду фраксин і його аглікона фраксетина, а також тритерпенового сапонінового глікозиду β-амірінового типу есцину (вміст до 13%).

Насіння містить катехінові таніни, глікозиди кверцетину і кемпферолу, флавонолові глікозиди (спіреозид,3,4′-диглюкозидо-3′,5,7-тригідроксифлавон, кемпферол-3-диглюкозид, кверцетин-3-диглюкозид, кверцетин-3-глюкозид, кверцетин-3-глюкорамнозид, кверцетин-3-ксилодиглюкозид, юглан, кемпферол-3-О-α-L-арабінопіранозид), тритерпенові глікозиди – есцин (сума із 14 глікозидів

есцигеніну, баринтогенолу D, протоесцигеніну, баринтогенолу C) – 5-7%, жирну олію (5-7 %), білкові речовини (до 10 %), амінокислоти, вітаміни (тіамін), крохмаль (до 50 %), дубильні речовини (близько 1 %). У корі є ескулін (3%) і його агликон ескулетин, фраксин, есцин, дубильні речовини (зокрема, катехиновий димер проантоціанідіни-А2), фітостероли (стигмастерол, α-спінастерол, β-ситостерол), аскорбінова кислота, філохінон.

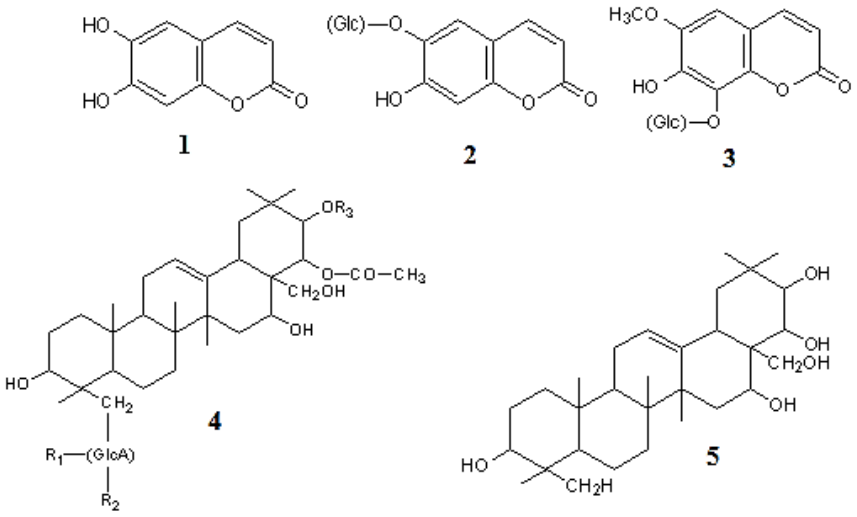


Рис.1.4. Структурні формули: 1– ескулетин; 2 – ескулін; 3 – фраксин; 4 – есцин; 5 – баринтогенол С

У листках – глікозиди (3-монозиди кемпферолу і кверцетину), каротиноїди (лютеїн і віолаксантин), пектинові речовини, речовини катехінової групи. Квітки багаті на флавоноїди (астрагалін, кемпферолу-3-α-L-арабінопіранозид, нікотифлорин, кверцетин, ізокверцитрин, рутин); похідні пурину (сечову кислоту, аденін, гуанін, аденозин); амінокислоти (аспарагінову кислоту, треонін, серин, глутамінову кислоту, пролін, гліцин, аланін, валін, метіонін, ізолейцин, лейцин, тирозин, фенілаланін, гістидин, лізин, аргінін), дубильні й пектинові речовини та слиз [27].

Фармакологічні властивості і використання. Терапевтична дія препаратів *A. hippocastanum* зумовлена наявністю в них ескуліну, фраксину та есцину, серед яких найбільш важливим елементом є есцин, оскільки він демонструє найбільшу біологічну активність. Інші сполуки також проявляють позитивне значення, однак,

активність чистого есцину в 5 раз нижча за активність есцину в суміші з флавоноїдним комплексом із кінського каштану.

Серед галенових препаратів, виготовлених з різних частин рослини кінського каштану, найкращу активність (при відносно невисокій гострій токсичності) виявляє спиртовий екстракт плодів. При проведенні досліджень та експериментів було визначено, що екстракт плодів каштану виявляє протизапальну і протинабрякову дію, зменшує в'язкість крові, має капілярозміцнюючі властивості, знижує артеріальний тиск, нормалізує вміст холестерину і лецитину в крові, зменшує ліпоїдоз аорти і печінки. Доведено також вазотонічну, судинозвужуючу і знеболюючу здатність рослини. Під час вивчення механізму протизапальної та протинабрякової дії есцину встановлено, що глікозид знижує лімфоток і одночасно збільшує вміст сухого залишку лімфи, знижує проникність плазмолімфатіческого бар'єру. Наявність у есцину капіллярозміцнюючих властивостей підтверджує припущення про його переважному впливі на першу фазу запалення, коли має місце порушення судинної проникності. Крім того, при внутрішньовенному введенні есцину зменшується вміст адреналіну в наднирниках і підвищується артеріальний тиск, а при перфузії ізольованих наднирників спостерігається судинозвужувальну дію.

A. hippocastanum використовується як у вітчизняній, так у зарубіжній медицині для виготовлення ліків, які застосовують переважно при різноманітних судинних захворюваннях та деяких інших хворобах. До переліку захворювань належать: беласкузин, вазотонін, веногал, дескузан, веностазин, есфлазид, ескувазин, ескувіт, ескузан, есфлазид, репарил, ескувіт, руфаесцин та інші. Для лікування використовують такі препарати з каштана кінського як: ескузан, есфлазід, репарил.

Препарати з каштана використовують для профілактики і лікування післяопераційних тромбозів, посттравматичних набряків, запалень і тромбоемболій. Доведено, що використання есцину, ескузан та есфлазіда з профілактичною метою в післяопераційному періоді дозволяє зменшити число гострих тромбозів у хворих пацієнтів на 50%.

Галенові препарати каштану користується популярністю у багатьох країнах світу у сфері народної медицини. Наприклад, свіжовидавлений сік з квіток рекомендують приймати при варикозному розширенні вен, тромбофлебіті, атеросклерозі та геморої; заспиртований сік квіток, або ж, настойку з квітів, або плодів – при геморої; настій кори – при тривалій діареї, малярії, та при хронічних бронхітах у людей, що постійно курять; відвар шкірки плодів – при маткових кровотечах. Об’єднавши каштан з іншими лікарськими рослинами, ми можемо використовувати його при гемороїдальних кровотечах, варикозному дерматиті, подагрі, артриті, тощо.

Настоянки з кори каштану, плодів, шкірки плодів та свіже потерте листя із соком використовують для зовнішнього застосування. Використання відвару із шкірки плодів призначають місцево через ванночки, або спринцювання при маткових і гемороїдальних кровотечах. При простуді, або захворюванні дихальних шляхів доцільно застосовувати порошок з насіння каштана. Зазначимо, що відвари і настої кори каштана мають терпкі, кровоспинні, протизапальні, знеболюючі і протисудомні властивості. Їх використовують як ефективний внутрішній і зовнішній засіб при тривалій діареї, хронічному коліті, підвищеній кислотності шлункового соку, захворюваннях дихальних шляхів (хронічних бронхітах), малярії, та гемороїдальних і внутрішніх кровотечах, особливо маткових [26].

1.3. Ґрунтові гриби

Основний об'єкт ґрунтової мікології представляють гриби, що мешкають в ґрунті і беруть активну участь в процесах, що протікають в ньому. Ґрунтовими можна вважати гриби, які постійно і закономірно виділяються як з ґрунту, так і з різних субстратів, що знаходяться в ньому (опалого листя, підстилки, коренів, насіння рослин, інших рослинних залишків і тварин) [28].

Ґрунтові гриби не є єдиною таксономічною групою і представлені найрізноманітнішими в систематичному відношенні формами. Вони не являють собою також єдиної екологічної групи, так як включають різні еколого-трофічні

групи: сапротрофи, паразити рослин, мікоризоутворювачі, гриби-хижаки. Однак основну масу ґрунтових грибів все ж становить група сапротрофів, тобто організмів, що здійснюють розкладання відмерлих органічних субстратів, які можуть бути виділені як безпосередньо з ґрунту, так і з різних тварин і рослинних залишків [28].

Їх основна роль проявляється в розкладанні органічної речовини в різних його формах, в результаті чого відбувається новоутворення різних сполук, які надходять в ґрунт і залучаються безпосередньо в подальший обмін, таких, як різноманітні органічні кислоти, фізіологічні активні речовини, високомолекулярні полімерні сполуки, частина з яких властива метаболізму тільки грибів. Відомо, що ґрунтові гриби здатні продукувати різноманітні біологічно активні речовини: амінокислоти, антибіотики, алкалоїди, вітаміни, ферменти, флавоноїди, ліпіди, стимулятори росту для рослин, полісахариди, а також токсичні речовини.

Живлення ґрунтових грибів відбувається за адсорбційним типом, тому вони тісно пов’язані із субстратом і мають велику поверхню всмоктування. Гриби характеризуються міцеліальною будовою, швидким ростом верхівки міцелію у довжину, активним метаболізмом. Все це сприяє швидкій колонізації субстрату, а можливість продукування антибіотичних і токсичних речовин підвищує їхню конкурентоздатність за освоєння субстрату. В міру використання субстрату метаболізм грибів уповільнюється і відбувається утворення хламідоспор, склероціїв або інших форм, що знаходяться у стані спокою. Спори можуть легко переноситися з субстрату на субстрат, що обумовлює високу адаптивність грибів до умов навколишнього середовища [22].

Між грибами та іншими членами біотичного співтовариства (біоценозу) в екосистемі складаються різноманітні зв'язки як трофічні (харчові), так і метабіотичні (за допомогою продуктів обміну речовин, що виділяються в зовнішнє середовище). Такі зв'язки існують у грибів з вищими рослинами, тваринами та іншими мікроорганізмами.

Зв'язки грибів з вищими рослинами головним чином консортивні, тобто зв'язку, в яких рослина являє собою вид – едіфікатор, будучи автотрофним організмом. Воно утворює ядро консорції, від якого залежать пов'язані з ним

популяції грибів як гетеротрофних організмів. Функціональні групи грибів, пов'язані з рослинами консорційними зв'язками, можуть бути біотрофи і сапротрофи. До біотрофів відносяться патогенні гриби, що харчуються вмістом клітин живої рослини; екрісотрофи, що використовують виділення живої рослини, через листя, хвою і через коріння (гриби прикореневої зони), і симбіотрофи. До сапротрофів – гриби, що розкладають відмерлі тканини рослин.

Гриби поряд з іншими мікроорганізмами – постійні мешканці прикореневої зони рослин, являють собою або типових екрісотрофів коренів, що використовують кореневі виділення рослин, або патогенних і потенційно патогенних організмів.

Факультативні паразити, що проникли у корені рослин, продовжують існувати і певний час після відмирання коріння. Паразитизм у них знаходиться на межі сапрофітного існування, вони представлені, в основному, грибами родів *Fusarium, Pythium, Corticium*, а також деякими видами *Cladosporium*. Основна особливість сапрофітних грибів, які швидко засвоюють легкодоступні вуглеводи – активний ріст міцелію, швидке проростання спор і форм спокою за наявності підходящого субстрату. До таких грибів у першу чергу відносять гриби класу *Zygomycetes*, головним чином, мукорові гриби, а також деякі види незавершених грибів, зокрема родів *Penicillium, Aspergillus* та інші. Багато з них характеризуються здатністю утворювати антибіотики і токсичні речовини, що створює ще більше можливостей у боротьбі за поживні ресурси [22].

Целюлозоруйнучі гриби ростуть повільніше і не витримують конкуренції з грибами, що швидко засвоюють легкодоступні вуглеводи. До цієї групи належать багато представників сумчастих та незавершених грибів. Найактивнішими руйнівниками целюлози є аскоміцети та дейтероміцети. Серед останніх види родів *Fusarium, Aspergillus, Penicillium, Stachybotrys, Trichoderma, Cladosporium.* Гіфальний тип росту більшості грибів є одним із прикладів адаптації морфологічної структури до структури субстрату. До групи, що руйнує лігнін, належать головним чином базидіоміцети. Вони ростуть повільно, починають розвиватися тоді, коли всі легкодоступні вуглеводи вже використані. Є відомості про те, що невелика кількість видів дейтероміцетів також здатні розкладати лігнін. Це види родів *Trichoderma,*

Fusarium, Aspergillus, Penicillium. У міру розкладання рослинних решток починають розвиватися гриби, які здатні розкладати специфічні речовини гумусу і які не потребують великої кількості поживних речовин [29].

Поширення грибів на поверхні коренів (в ризоплані) є не тільки результатом специфічності субстрату, а залежить також від конкурентної здатності грибів. На поверхні коренів знаходяться як сапрофітні гриби, так і факультативні паразити. Останні швидко ростуть, активно утворюють екстрацелюлярні ферменти, руйнуючи клітини рослини-живителя, проникають у них, але при цьому можуть переходити і до сапрофітного типу живлення. Вони також розглядаються як ґрунтові гриби, хоча багато з них знаходяться у ґрунті в стані спокою і проростають тільки під впливом ексудатів коренів. У ризосфері рослин, де, завдяки екзосмосу, створюються сприятливі умови як для самих рослин, так і для мікроорганізмів, вміст грибів значно більший, ніж у ґрунті без рослин. Специфіка кореневих виділень визначає склад видів грибів у ризосфері. На склад грибних ценозів впливають фізіологічно активні речовини, які виділяються коренями рослин. Мікроорганізми ризосфери, в свою чергу, впливають на рослину через кореневу систему, продукуючи рістрегулювальні речовини [22].

1.4. Біологічно активні речовини грибів

В останні три десятиліття міждисциплінарні наукові дослідження грибів демонструють унікальні властивості речовин, виділених з ряду видів грибів. Препарати грибного походження використовуються в сучасній клінічній практиці Японії, Китаю, Кореї, Росії та деяких інших країн. Гриби зараз оцінюється не тільки по їх біологічній доступності, але і за фармакологічними властивостями. Вони являють собою величезне і в той же час нереалізоване джерело нових потужних фармацевтичних продуктів. Надзвичайно важливим для сучасної медицини є те, що гриби представляють собою невичерпне джерело полісахарів (особливо β-глюканів) і полісахарид-протеїнових комплексів, що володіють протиракoвими і імуностимулюючими властивостями. Більшість, якщо не всі, вищі базидіоміцети

містять багато різних біологічно активних високомолекулярних і низькомолекулярних сполук (трітерпени, лактони, алкалоїди та інші метаболіти) в плодових тілах, культуральному міцелії і культуральній рідини. Встановлено, що гриби мають близько 130 фармакологічних застосувань [30].

В даний час гриби використовуються як:

- дієтична їжа;
- харчові добавки;
- джерело нового класу ліків;
- природні засоби захисту рослин, володіють інсектицидною, фунгіцидною, бактеріцидною, гербіцидною активністю;
- косметичні засоби, з огляду на те, що косметичні компанії широко використовують різні речовини грибів, включаючи полісахариди, зокрема, водорозчинні β-глюкани, сахахітин, а також тірозіназу і інші ферменти для поліпшення плівкоутворюючих властивостей, активації епідермального фактора росту, антиоксидантної, антиалергічного, антибактеріальної і протизапальної дії, стимуляції коллагенної активності [30].

Відомо, що мікроскопічні (мікроміцети) гриби здатні продукувати різноманітні біологічно активні речовини: амінокислоти, антибіотики, алкалоїди, вітаміни, ферменти, флавоноїди, ліпіди, стимулятори росту для рослин, полісахариди, а також токсичні речовини.

Розглянемо більш детально алкалоїди та флавоноїди, оскільки їх визначення проводилось в експериментальній частині роботи.

Алкалоїди – складні органічні азотовмісні сполуки лужної реакції, переважно рослинного походження, також є продуктом життєдіяльності грибів та деяких нижчих тварин. Назва перекладається як «подібні до лугів» − отримали через лужну реакцію водних розчинів перших ізольованих представників. Алкалоїди мають високий фізіологічний вплив на організм людини і тварин. Молекули алкалоїдів складаються з атомів C, H, O, N і іноді ще S. З усіх природних БАР алкалоїди

вважаються однією з найважливіших груп, якої сучасна медицина отримує найбільшу кількість ЛЗ [31].

Майже всі алкалоїди утворюються з амінокислот, і лише деякі – іншим чином. Якщо алкалоїди утворюються не з амінокислот, їх називають псевдоалкалоїдами. Більшість алкалоїдів за хімічною будовою є похідними різноманітних нітрогеновмісних гетероциклів і належать до третинних амінів [32].

Алкалоїди накопичуються головним чином у тканинах чотирьох типів: у тих, що активно ростуть; в епідермальних та гіподермальних; в обкладці судинних пучків; у латексних судинах [33].

Зазвичай рослина містить суміш декількох алкалоїдів, інколи до 15-20, як правило, схожих за структурою. При сушінні та зберіганні рослинної сировини всіст алкалоїдів може змінюватись. Швидке або повільне висушування призводить до зменшення кількості алкалоїдів. Вологість приміщень негативно впливає на кількість алкалоїдів.

У рослинах алкалоїди зустрічаються розчиненими в клітинному соку у вигляді солей органічних кислот – щавлевої, оцтової, молочної, яблучної, винної, лимонної, янтарної; або специфічних для певної рослини – аконітової, хелідонової, хінної та ін., а також солей мінеральних кислот – хлороводневої, сірчаної, фосфорної, роданистоводневої. Солеутворення відбувається лише по одному атомі азоту в молекулі алкалоїду. Дуже рідко в рослинах алкалоїди зустрічаються у вигляді N-оксидів і вільних основ [34].

Доведено, що алкалоїди активно беруть участь у всіх обмінних процесах рослин в якості: рослинних гормонів та каталізаторів; регулятора обміну речовин та росту кореневої системи; захисних бар’єрів від ґрунтових бактерій; антифідантів; сенсибілізаторів.

В організмі людини алкалоїди діють на специфічні рецептори або впливають на активність ферментів. Рецептори отримали свою назву із-за чутливості до природних медіаторів чи їх антагоністів, наприклад н-холінорецептори чутливі до дії нікотину, м-холінорецептори – чутливі до мускарину. Стимуляція чи блокада рецепторів призводить до попередження та лікування патологічних станів [35].

Алкалоїди застосовуються в медицині в індивідуальному вигляді та в складі сумарних і комплексних препаратів. Фармакологічна дія алкалоїдів дуже різноманітна:

- седативна;
- знеболююча;
- збуджувальна для ЦНС;
- антихолінергічна;
- антиаритмічна;
- спазмолітична;
- гіпотензивна;
- жовчогінна;
- кровоспинна;
- відхаркувальна та ін.

Крім медицини алкалоїди застосовуються в харчовій (чай, кава, какао), тютюновій промисловості, сільському господарстві тощо.

При застосуванні деяких алкалоїдів розвивається звикання, медикаментозна залежність (наркоманія). Багато алкалоїдів є сильними отрутами, що здатні спричинити отруєння, навіть зі смертельним наслідком. Тому алкалоїдовмісну сировину застосовують дуже обережно [35].

Флавоноїди – це біологічно активні речовини, в основі яких лежить дифенілпропановий фрагмент, із загальною формулою $C_6 – C_3 – C_6$. Назва походить від латинського слова *flaviis* – жовтий, тому що перші виділені флавоноїди мали жовте забарвлення [34].

Молекула флавоноїда складається з двох фенольних залишків (кільця А і В), з'єднаних пропановою ланкою, тому їх можна розглядати як похідні фенілпропаноїдів [33].

Найчастіше флавоноїди представлені в рослинах у вигляді глікозидів (глікофлавоноїди), вуглеводний фрагмент яких може складатися з моно-, ди- та

трисахаридів лінійної або розгалуженої будови. Також зустрічаються диглікозиди, в яких вуглеводні фрагменти розташовані у різних положеннях молекули флавоноїду.

Флавоноїди виконують різноманітні функції в рослинах. Вони є каталізаторами окисно-відновних процесів, здатні інгібувати ріст патогенних грибів та знижувати швидкість розмноження вірусів, бактерій; стимулюють ріст рослин; пригнічують функцію деяких ферментів; захищають від УФ-променів; беруть участь у пігментації, стимуляції росту і розвитку нітроген-фіксуючих бактерій.

Завдяки високій реакційній здатності фенольних гідроксилів та карбонільної групи флавоноїди беруть участь у багатьох метаболічних процесах в організмі людини. Ізофлавоноїди мають естрогенну дію, катехіни – в'яжучу та протизапальну; флавони – спазмолітичну, гіпотензивну, бактерицидну; лейкоантоціанідини – протипухлинну. Халкони, флаванони, флавоноли та флавони також виявляють спазмолітичну дію. Флавоноїди утворюють комплекси з важкими металами, проявляючи радіопротекторну активність. Вважається, що кверцетин має захисні властивості відносно нервових клітин, пошкодження яких спричинене оксидативним стресом, при хворобі Альцгеймера.

Похідні флавонолу, катехіну та антоціанідину підвищують амплітуду серцевих скорочень, нормалізують серцевий ритм. Гіпотензивну активність проявляють глікозиди флавонів, флавонолів, флаванонів, а також димерні флавоноїди. Кверцетин, кемпферол, рутин, гесперидин, нобелітин, катехін та мірицетин мають антиагрегантну активність.

Багато флавоноїдів є жовчогінними (мірицетин, апігенін). Кемпферол, катехіни, кверцетин, софалкон проявляють противиразкову дію; кверцетин, авікулярин, наринген, гірустрин, онітин, лютеолін.

Антимікробна активність характерна для кверцетину відносно грампозитивних бактерій; для флавонів і халконів – відносно стафілококу. Також цей вид активності притаманний антоціанам та катехінам чаю. Протигерпетична активність залежить від ступеня окиснення сполуки, причому відновлення піронового кільця до флаванону призводить до зменшення її вираженості (апігенін –

нарингенін), а окиснення до флавонолу – до повної її втрати (апігенін – кемпферол). Максимальна активність характерна для сполук з гідроксильною групою при С7 .

1.5. Висновки до розділу

Встановлено, що в даний час організм рослин все частіше розглядають в сукупності з усіма асоційованими з ним мікроорганізмами, оскільки дані організми в процесі своєї життєдіяльності активно впливають один на одного. Активне виділення корінням рослин в навколишнє середовище різних органічних сполук забезпечує поживними речовинами ґрунтові мікроорганізми, що створює сприятливі умови для їх існування в зонах ризосфери. Для мікрофлори ризосфери характерна наявність мікроскопічних грибів родів *Penicillium, Gliocladium, Talaromyces, Humicola* і ін.

З'ясовано, що лікарська рослина *Aesculus hippocastanum* L. містять велику кількість біологічно активних речовин, які є джерелом флавоноїдів, дубильних речовин, вітамінів, алкалоїдів та амінокислот для фармацевтичної промисловості.

Виявлено, що мікроскопічні гриби здатні продукувати різноманітні біологічно активні речовини: амінокислоти, антибіотики, алкалоїди, вітаміни, ферменти, флавоноїди, ліпіди, стимулятори росту для рослин, полісахариди, а також токсичні речовини.

РОЗДІЛ 2
МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Виділення грибів із ґрунту

Ґрунтові гриби – велика і складна екологічна група організм. Серед них є представники, що вражають комах, нематод, коріння рослин; багато видів розвиваються на екскрементах тварин, рослинних рештках. Таким чином, більшості грибів, що мешкають в ґрунтах, властива приуроченість до певного субстрату. Цю особливість широко використовують мікологи при виділенні деяких видів і груп грибів в чисті культури на поживні середовища. Запропонована велика кількість поживних середовищ, що містять різні джерела вуглецю та азоту. Для виділення грибів з ґрунтів зазвичай використовують тверді (агаризованні) поживні середовища з легкодоступними джерелами вуглеводів – сахарозою, глюкозою, декстрозою. До таких середовищ відносяться Чапека, картопляно-декстрозний агар, агаризоване пивне сусло [36].

Поживне середовище для виділення та культивування грибів було обрано картопляно-глюкозний агар. Приготування поживного середовища: на 1 л холодної дистильованої води беруть 200 г очищеної та нарізаної картоплі і кип’ятять на слабкому вогні 20 хв. Не допускають, щоб картопля розварилася. Відвар відфільтровують через вакуумний фільтр (див. рис. 2.2), гарячою кип’яченою водою доводять вміст до 1 л.

Рис.2.1. Процес фільтрації картопляного відвару

У профільтрований відвар додають 15 г агар-агару та 20 г глюкози, кип’ятять на вогні до розчинення агару. Встановлюють pH, розливають по колбах і стерилізують в автоклаві за 1 атм. 30 хв.

У ґрунтах гриби знаходяться в асоціаціях з іншими організмами. Тому для придушення зростання деякої супутньої флори, наприклад, бактерій, поживні середовища слід підкислювати або додавати до них антибіотики. Для цих цілей використовують соляну, сірчану, лимонну, фосфорну кислоти. Кислоти до поживного середовища додають до тих пір, поки pH пробної порції не досягне значень 4,2-4,5. Більш висока кислотність може негативно діяти на зростання багатьох гриб. Середовища зазвичай підкисляють перед додаванням агар-агару. Деякі кислоти, наприклад лимонну, додають після стерилізації, причому на кожні 5 мл середовища додають 1 краплю 50% -го розчину кислоти. Кислоти можна замінити додаванням антибіотиків. Застосовують наступні дозування антибіотиків: 1 000 000 од. пеніциліну розчиняють в 10 мл стерильної дистильованої води і до кожного літру поживного середовища додають 2 мл отриманого розчину; 1 000 000 од. стрептоміцину розчиняють в 90 мл стерильної дистильованої води, після чого 4 мл розчину додають до 1 л поживного середовища Антибіотики додають до поживних середовищ після автоклавування [36].

До поживного середовища КГА, яке використовувалося для виділення грибів додавали антибіотик стрептоміцин для пригнічення не бажаної мікрофлори. Антибіотик вносився, безпосередньо, перед розливом поживного середовища на чашки Петрі.

Гриби ізолюють з ґрунтів на поживні середовища різними методами. Один з найбільш простих – метод серійних розведень Ваксмана, що полягає в посіві ґрунтової суспензії на поживні середовище. Цим методом користується більшість мікологів. Суть методу серійних розведень полягає в тому, що ґрунтова суспензія послідовно розводиться стерильною водою до такого ступеня, що в каплі, яка наноситься на поверхню поживного середовища, буде знаходитись порівняно невелике число (10-100) колонійутворюючих одиниць (КУО), в якості яких у грибів зазвичай виступають спори або розриви міцелію [37].

Аналіз мікофлори ґрунтів методом ґрунтових розведень здійснюють наступним чином, зразки ґрунтів, відібрані в зоні кореневої системи рослини (ризосфера) або на ділянках, позбавлених рослинності, просівають через сито з отворами діаметром не більше 4 мм між двома листами стерильного паперу. На рис.2.2. наведений зразок ґрунту, який використовувався для виділення грибів (зразок отриманий в м. Київ із ризосфери *A. hippocastanum*).

Рис.2.2. Зразок ґрунту ризосфери *A. hippocastanum*

Потім між цими ж аркушами паперу змішують зразки 2-3 проб і швидко готують середню пробу, забезпечуючи максимум стерильності, змішаний грунт зважують на технічних вагах, зазвичай по 10 г, в 3-4 повторностях, насипаючи її в стерильні чашки Петрі шпателем. Після кожного зразка шпатель обмивають водою, витирають насухо, далі занурюють в банку зі спиртом і обпалюють, проводячи через полум'я спиртівки. Загальна схема посіву наведена на рис.2.3.

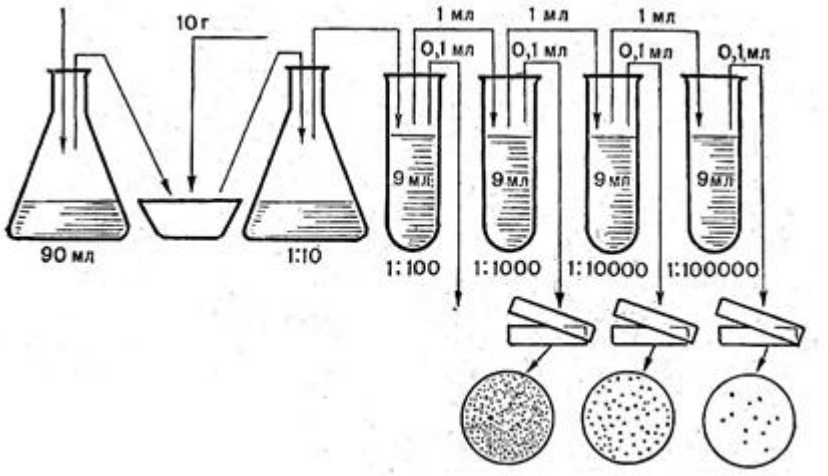


Рис.2.3. Схема виділення ґрунтових грибів методом серійних розведень

1. Перше розведення ґрунту водою

Зважуємо 10 г сухого ґрунту. У випадку використання не висушеного зразка, частину ґрунту висушуємо до постійної маси і результати посіву потім перераховуємо на суху масу. Фарфорову ступку необхідно протерти 70 % спиртом. Ґрунт необхідно зволожити стерильною водою (частина води залишається в колбі) і розтирають в фарфоровій ступці товкачем, який попередньо протертий спиртом.

Рис.2.4. Підготовка ґрунту для приготування суспензії

Суспензію декілька разів змивають із ступки або чашки в пусту стерильну колбу, поступово використовуючи всю підготовлену воду. Отримуємо 10 г ґрунту в 100 мл розчину, відповідно 1:10 (перше розведення). Кобу протягом 5-10 хв необхідно інтенсивно струшувати, можна на качалці.

2. Серійне розведення

Із колби стерильною піпеткою у полум'ї спиртівки набирають 1 мл суспензії і переносять в пробірку з 9 мл стерильної води – розводимо суспензію ще в 10 разів і отримуємо друге розведення 1:100 або $1:10^2$. Використовують як стерильні скляні піпетки (верхній кінець якої закритий ватою), так і автоматичні мікропіпетки (дозатори) з стерильними носиками. Скляну піпетку виймають і тримають правою рукою так, щоб носик піпетки не віддалявся від полум'я. Колбу з першим розведенням беруть лівою рукою, мізинцем правої руки відкривають пробку в полум'ї спиртівки, носик піпетки вводять в суспензію і набирають трохи більше 1 мл. Далі верх піпетки закривають вказівним пальцем правої руки. Колбу ставлять,

лівою рукою беруть пробірку з 9 мл стерильної води, мізинцем правою руки знімають пробку, носик піпетки вводять в пробірку, відпускають вказівний палець від отвору пробірки і зливають суспензію в пробірку [37].

Рис.2.5. Серія розведень ґрунтової суспензії

Далі пробірку струшують протягом 5 хв, при цьому пробірку не можна трясти вверх-вниз; її необхідно тримати лівою рукою за верхню частину, а вказівним пальцем правої руки несильно вдаряти по основі пробірки. При перенесенні 1 мл другого розведення в нову пробірку з стерильною водою, розводимо суспензію ще в 10 разів і т.д. Таким чином отримуємо серію розведень (див. рис.2.5.): друге ($1:10^2$), третє ($1:10^3$) і четверте ($1:10^4$). П'яте розведення ($1:10^5$) використовують досить рідко. Отримавши нове розведення необхідно робити підпис і ретельно перемішувати суспензію.

3. Посів суспензії

На агаризоване поживне середовище поміщують 0,1 мл (іноді 0,2 мл) суспензії і розтирають її шпателем Дригальського по всій поверхні. Засіяні водно-ґрунтовою суспензією чашки Петрі поміщали до термостату з температурою 25 ˚С. Через 3 дні інкубації спостерігається поява міцелію грибів. Окремі гіфальні наконечники різних грибів обережно відбираються з поверхні середовища за допомогою інокуляційної петлі; потім їх переносять на нове середовище КГА та інкубують за температури 25 °С упродовж 7–10 днів. Кожна культура гриба перевіряється на чистоту та пересівається на нове поживне середовище КГА для збереження та накопичення

біомаси. Ідентифікація грибів проводиться на основі морфології культури, механізмах продукування спор та морфологічних характеристиках спор. Остаточний облік проводять через 10-15 днів.

2.2. Методи визначення флавоноїдів

Для отримання попередньої інформації про структурні особливості виділених флавоноїдних з'єднаннях використовують хімічні методи аналізу. Флавоноїди виявляють за якісними реакцій. Екстракцію флавоноїдів проводять відповідним розчинником (етанолом, метанолом, гарячою водою або водно-спиртовою сумішшю).

1. Ціанідінова проба або проба Шинода. Заснована на відновленні флавоноїдів атомарним воднем у кислому середовищі у присутності металічного магнію (іноді використовують цинк). Реакція типова для флаванонів, флавонів, флавонолів, які дають червоне, рожеве, фіолетове або синє забарвлення залежно від кількості та положення гідроксильних груп. Реакцію не дають аурони та халкони, проте з концентрованою кислотою хлоридною дають червоне забарвлення за рахунок утворення оксонієвих солей. До 1 мл екстракту додають по 2 – 3 краплі хлороводневої кислоти і щіпку порошку металічного магнію.

2. З розчином лугу (NaOH, KOH) флавони, флавоноли, флаванони набувають жовтого забарвлення, полігідроксифлавоноли (6 і більше ОН-груп) — червоного або синього, халкони та аурони — жовто-оранжевого або оранжево-червоного. До 1 мл екстракту додають по 1 – 2 краплі 10 % - го спиртово-водного розчину калію або натрію гідроксиду.

3. Реакція із ферум (III) хлоридом. Флавоноїди з 1% спиртовим розчином $FeCl_3$ дають коричневе (флаванони, халкони, аурони), зелене (флавоноли), червоно-буре (флавони) забарвлення. До 1 мл екстракту додають по 1 – 2 краплі 10 % - го розчину заліза III хлориду [38].

4. Реакція з алюмінію (III) хлоридом. При використанні 1–3% розчину $AlCl_3$ у спирті етиловому утворюється жовте забарвлення з флавонами,

флавонолами, халконами та ауронами, в УФ-світлі при 254 нм флавони набувають жовто-коричневого, халкони – жовтого, флавоноли – жовто-зеленого та аурони – зеленого кольору.

5. Реакція Вільсона (кислоти борна та лимонна в безводному ацетоні при нагріванні) характерна для 5-гідрокси-, 5-метоксифлавонів та флавонолів, які утворюють яскравожовте забарвлення у видимому та жовто-зелене – в УФ світлі. Дигідрохалкони в УФ світлі набувають жовтого забарвлення [38].

Для кількісного визначення флавоноїдів використовують методи гравіметрії, спектрофотометрії, полярографії, флуориметрії, кислотно-основного титрування в неводних розчинниках. Спектрофотометричне визначення є одним з найбільш поширених методів аналізу флавоноїдних сполук. Спектрофотометричний метод аналізу базується на виборчому поглинанні монохроматичного світла розчином досліджуваних речовин.

Приготування екстракту з грибів. Розчин А: міцелій грибів 1 г знімають з поживного середовища переносять у фарфорову ступку і розтирають з 1 г піску, для того щоб зруйнувати клітинну стінку [36].

Далі додають 20 мл етилового спирту і проводять фільтрування (див. рис. 2.7). Отриманий фільтрат (розчин А) використовується в подальшому визначенні флавоноїдів.

Рис.2.7. Процес фільтрації екстракту з грибів

Далі готуються розчини для визначення оптичної густини для екстракту з грибів: 1,0 мл розчину А поміщають в мірну колбу місткістю 25 мл, додають 4 мл алюмінію хлориду спиртового розчину 5% і доводять розчин до мітки спиртом 70 % (розчин Б) і залишають на 30 хв. У випадку помутніння розчинів їх відфільтровують. Для приготування розчину для порівняння в іншу колбу на 25 мл вносять 1 мл розчину А. Після цього об'єм колби доводять до мітки 70 % спиртом і залишають на 30 хв. У випадку помутніння розчинів їх відфільтровують [39].

Оптичну густину визначають при 425 нм у кюветах товщиною 10 мм. В робочу кювету поміщають розчин з додаванням хлориду алюмінію (розчин Б), в кювету порівняння – розчин порівняння.

Вміст суми флавоноїдів в перерахунку на кверцетин (%) визначають за формулою:

$$X = \frac{D_1 \times a \times 25 \times 100}{D_0 \times 100 \times 25 \times 1},$$

де D_1 – оптична густина розчину Б; D_0 – оптична густина розчину кварцетину (становить 0,22); а – маса наважки випробовуваної сировини, у грамах.

2.3. Методи визначення алкалоїдів

Визначення алкалоїдів засноване на їх властивості давати прості або комплексні солі з кислотами, солями важких металів, йодидами і іншими речовинами. З деякими реактивами алкалоїди дають кольорові реакції або утворюють нерозчинні осади, що лягло в основу методів їх визначення.

Позитивна якісна реакція, є лише ознакою того, що досліджуваний розчин може містити алкалоїди, але не слугує абсолютним доказом його присутності. Загальні реакції на алкалоїди, або реакції осадження, дозволяють попередньо встановити наявність алкалоїдів навіть при незначному їх вміст. Однак через різну хімічну природу алкалоїдів і різної фізіологічну активності *in vivo* етап якісного осадження неминучий. Виняток можливий лише при пошуку алкалоїду (алкалоїдів)

відомої хімічної природи або похідного будь-якого з'єднання, для визначення якого існує надійна якісна реакція [36].

Групові осадові реактиви готують таким же чином, як і при аналізі рослинної сировини на вміст алкалоїдів. Рекомендуется застосовувати реактиви Вагнера, Майера, Зонненеейна, Драгендорфа, Шайблер, що утворюють комплекси з алкалоїдами. Про наявність алкалоїдів судять по появі осадів. Названі реактиви мають наступні межі чутливості по відношенню до відомих алкалоїдів (мкг/мл): реактив Майєра 2,5-10 000; Зонненшейна 1-2000; Вагнера 5-1400; Драгендорфа 3 250; Шайблера 1-1000. За ступенем чутливості до алкалоїдів грибів, реактиви можна розташувати в ряд: реактив Зонненшейна, реактиви Вагнера і Драгендорфа. Однак слід враховувати, що чутливість реактивів до різних алкалоїдів неоднакова. З цього не можна, особливо при роботі з невідомим сировиною, обмежуватися одним або двома реактивів і, звичайно реакції проводять з 5-6 реактивами [40].

Загальноосадові реакції проводять з реактивами:

1. Реактив Майєра K2[HgI_4] (розчин ртуті дихлориду $HgCl_2$ в розчині калію йодиду KJ) з більшістю алкалоїдів утворює кремові осади.

2. Реактиви Вагнера, Бушарда та Люголя K[I_3] (розчин йоду J_2 в розчині калію йодиду KJ) з розчинами солей алкалоїдів утворюють бурі осади, що являють собою сполуки гідройодидів алкалоїдів з йодом.

3. Реактив Драгендорфа K[BiI_4] (розчин вісмуту нітрату основного BiONO3, калію йодиду та оцтової кислоти) з більшістю солей алкалоїдів утворюють оранжево-червоні або цегляcто-червоні осади.

4. Реактив Марме K_2[CdI_4] (розчин кадмію йодиду CdJ_2 в розчині калію йодиду KJ) з алкалоїдами утворює білі або жовтуваті осади, часто розчинні в надлишку реактиву.

5. Реактив Зонненштейна (розчин фосфорномолібденової кислоти $H_3PO_4 \times 12MoO_3 \times 2H_2O$) з алкалоїдами утворює жовтуватий аморфний осад.

6. Реактив Шейблера (1%-ний водний розчин кислоти фосфорновольфрамової $H_3PO_4 \cdot 12WO_3 \cdot 2H_2O$) – утворює білі аморфні осади.

7. Реактив Хагера (насичений розчин пікринової кислоти) з алкалоїдами утворює жовтий осад [35].

Кількість алкалоїдів у сировині визначають фізичними (гравіметрія), фізико-хімічними (фотометрія, спектрофотометрія, фотонефелометрія, полярографія, поляриметрія) об’ємними методами. Найбільш поширені об’ємні методи визначення алкалоїдів: ацидиметрія в неводному середовищі (тропанові алкалоїди, пахікарпін, платифілін, морфін, резерпін, сферофізин, ефедрин та ін.) та методи кислотно-основного титрування [35].

Методика визначення вмісту алкалоїдів у перерахунку на гіосциамін. Близько 0,5 г (точна наважка) аналітичної проби поміщають в мірну колбу місткістю 50 мл, розчиняють в 10 мл 0,2 М фосфатного буферного розчину рН 7, 5; доводять об'єм розчину тим же розчинником до мітки, перемішують і дають відстоятися. Далі 2,0 мл отриманого розчину поміщають в ділильну воронку, додають 8 мл 0,2 М фосфатного буферного розчину з рН 7,5; додають 0,5 мл розчину бромтимолового синього, 10 мл хлороформу і збовтують протягом 3 хв. Хлороформний витяг фільтрують через паперовий фільтр з 10 г натрію сульфату безводного, змоченого хлороформом, в мірну колбу місткістю 50 мл. Фільтр промивають 3 мл хлороформу. Витяг повторюють ще 2 рази по 10 мл хлороформу. Отримані вилучення фільтрують через той же фільтр в ту ж мірну колбу. В ту ж мірну колбу додають 10 мл розчину борної кислоти, доводять об'єм розчину спиртом 95% до позначки і перемішують (досліджуваний розчин).

Вимірюють оптичну щільність досліджуваного розчину на спектрофотометрі при довжині хвилі 420 нм в кюветі з товщиною шару 10 мм відносно розчину порівняння. Як розчин порівняння використовують хлороформ.

Паралельно вимірюють оптичну щільність розчину стандартного зразка атропіну сульфату в аналогічних умовах.

Розчин стандартного зразка (СЗ) атропіну сульфату. Близько 0,1160 г (точна наважка) (СЗ) атропіну сульфату, попередньо висушеного при температурі 135 ° С до постійної маси, кількісно переносять 10 мл води в ділильну воронку, додають 0,5 мл концентрованого розчину аміаку і витягують послідовно 20 мл; 15 мл; 15 мл

хлороформу при збовтуванні протягом 3 хв. Хлороформні вилучення фільтрують через фільтр з 2 г натрію сульфату безводного, в мірну колбу місткістю 100 мл, доводять об'єм розчину хлороформом до мітки і перемішують [39].

Вміст суми алкалоїдів в перерахунку на гіосциамін у фармацевтичній субстанції у відсотках (Х) розраховують за формулою:

$$X = \frac{D \times a_1 \times 6{,}41}{D_1 \times a},$$

де D – оптична густина досліджуваного розчину;

D_1 – оптична щільність розчину СО атропіну сульфату;

а – наважка дослідної речовини, г;

$а_1$ – наважка атропіну сульфату, г.

2.4. Висновки до розділу

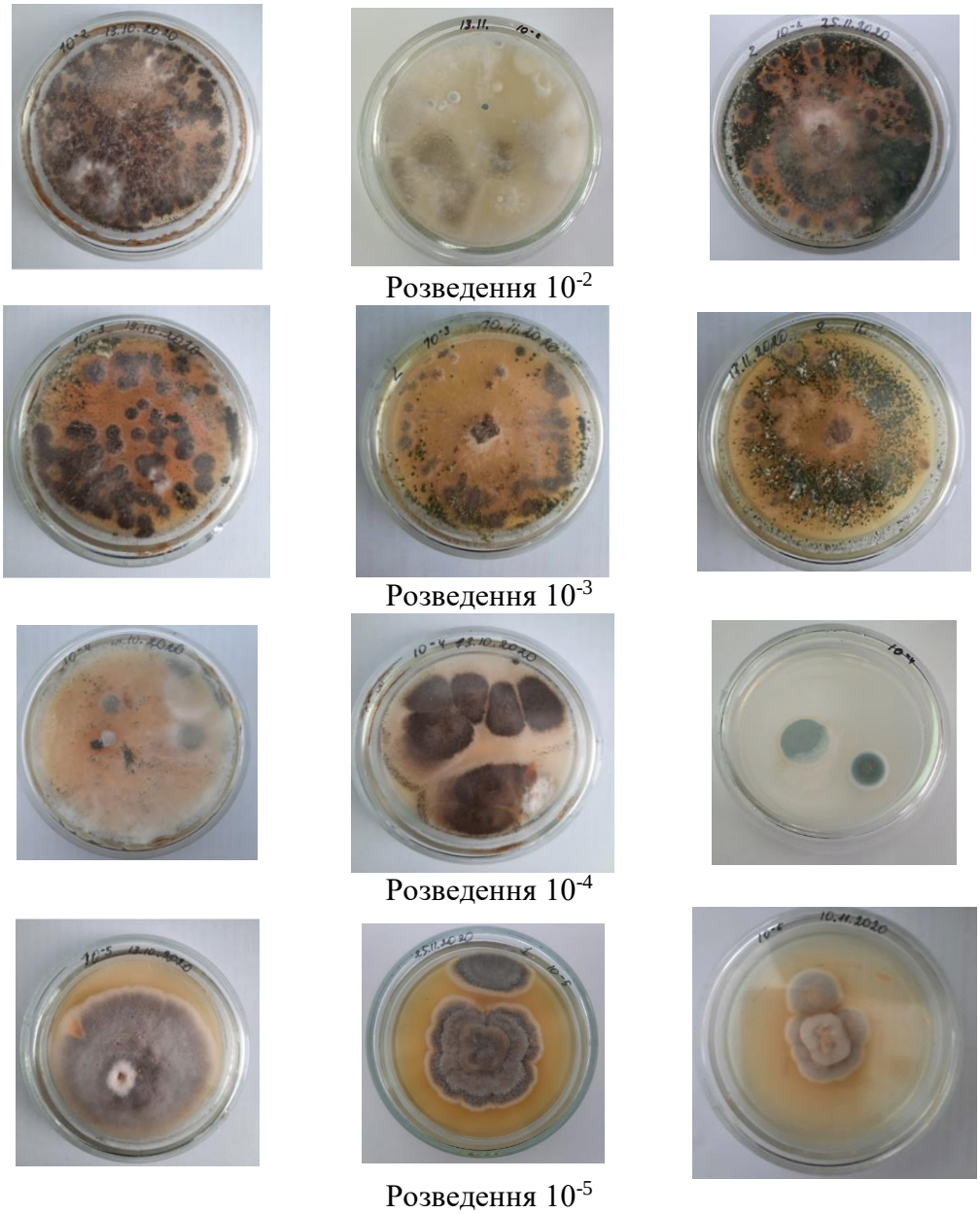
З ризосфери Кінського каштану (*Aesculus hippocastanum L.)* виділено гриби методом серійних розведень. Отримано чисті культури грибів шляхом багаторазових пересівів. Культивування та накопичення культур грибів здійснювалося на картопляно-глюкозному агарі при температурі 25 °С.

Проведено якісні реакції, які дозволяють попередньо встановити наявність алкалоїдів та флавоноїдів навіть при незначному їх вмісті. Для визначення кількісного вмісту алкалоїдів та флавоноїдів використано спектрофотометричний метод.

РОЗДІЛ 3
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Результати виділення грибів

Виділення грибів відбувалося методом серійних розведень із ризосфери Кінського каштану (*Aesculus hippocastanum* L.*).*



Розведення 10^{-2}

Розведення 10^{-3}

Розведення 10^{-4}

Розведення 10^{-5}

Рис. 3.1. Виділенні мікроміцети із ризосфери *A. hippocastanum* методом серійних розведень

Культивування грибів здійснювалось на картопляно-глюкозному агарі при температурі 25 °С упродовж 7 діб. Через 3 дні інкубації спостерігається поява міцелію грибів. Далі проводився багаторазовий пересів культур (див.рис.3.2).

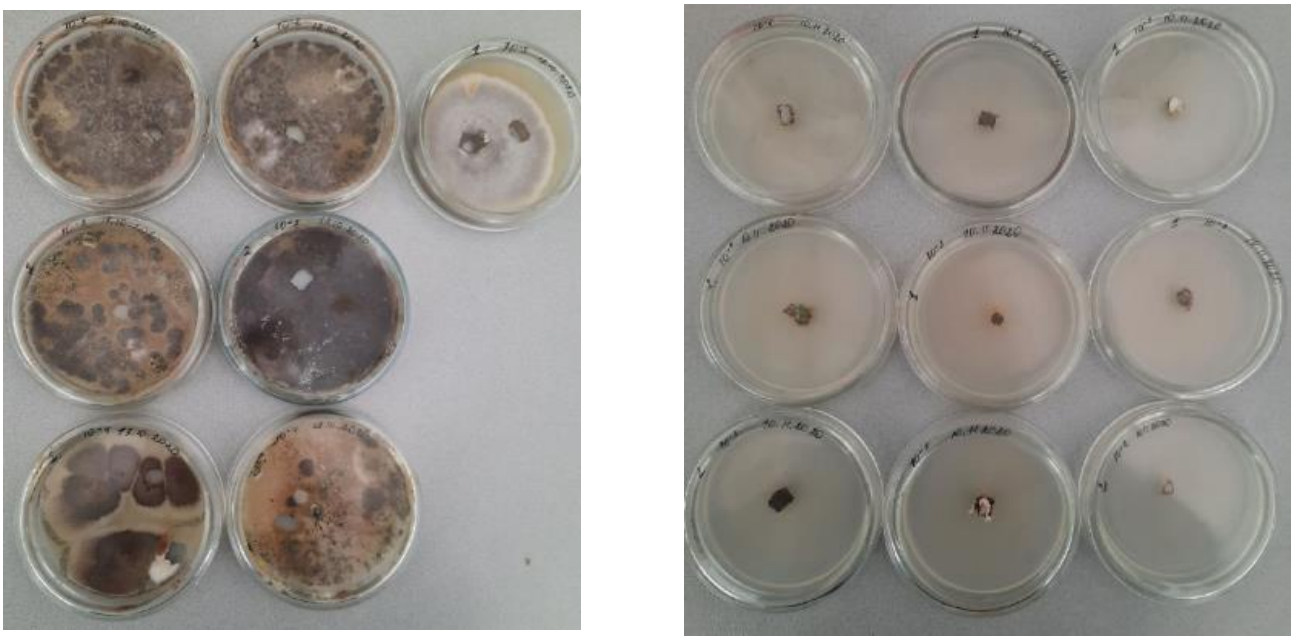


Рис.3.2. Процес пересіву культур грибів

Окремі гіфальні наконечники різних грибів обережно відбираються з поверхні середовища; потім їх переносили на нове середовище КГА та інкубували за температури 25 °С упродовж 7 діб для збереження та накопичення біомаси. Накопичення біомаси грибів необхідне для подальшого визначення біологічно активних речовин.

Для мікрофлори ризосфери характерна наявність грибів родів *Penicillium, Gliocladium, Talaromyces, Humicola* і ін. Серед типових видів переважають оліготрофні нетоксикогенні види *Penicillium thomi, Aspergillus niger*. Види, що розкладають целюлозовмісні рослинні залишки – *Chaetomium globosum*, *Trichoderma lignorum*. Гриби, що володіють фітопатогенні властивості: *Fusarium solani Appel., Fusarium oxysporum, Alternaria alternata., Botrydis, Cladosporim herbarum (Pers.) Link, Verticillum dahlia.*

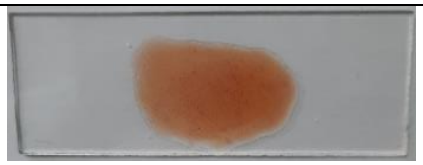
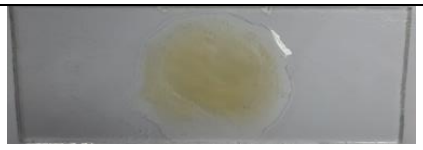
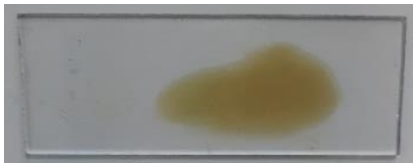
3.2. Вміст алкалоїдів та флавоноїдів

Визначення вмісту алкалоїдів та флавоноїдів здійснювалося в комплексі мікроміцетів, виділених з ризосфери кінського каштану (*A. hippocastanum).*

Для отримання попередньої інформації про наявність алкалоїдів було проведено якісні реакції з дослідними зразками (див. табл. 3.1). Алкалоїди дають з деякими реактивами кольорові реакції або утворюють нерозчинні осади, що лягло в основу методів їх визначення.

Таблиця 3.1

Результати якісних реакцій визначення алкалоїдів

Реактив	Опис	Результат
Реактив Драгендорфа	Цегляcто-червоний осад	
Реактив Зонненштейна	Жовтий осад	
Реактив Шейблера	Не відбулось зміни	
Реактив Хагера	Жовтий	
Реактиви Вагнера	Бурий осад (ледь помітний)	

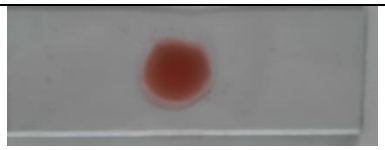
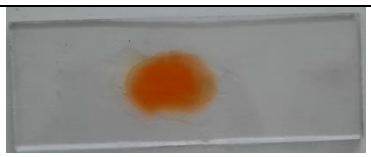
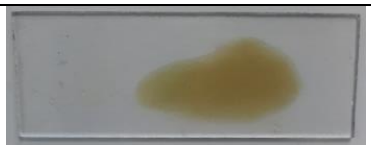
Проведені якісні реакції показують, що у виділених мікроміцетах з ризосфери *A. hippocastanum* можуть бути алкалоїди. З п’яти проведених кольорових реакцій, лише одна не дала результату (з реактивом Шейблера не відбулося зміни).

Позитивна кольорова реакція є лише показником того, що дослідний розчин може містити алкалоїди, але не слугує абсолютним доказом їх присутності. Однак через різну хімічну природу алкалоїдів і різну фізіологічну активність *in vivo* етап якісного осадження неминучий. Виключення можливе лише при пошуку алкалоїда (алкалоїдів) відомої хімічної природи або похідного будь-якого зєднання, для визначення якого існує надійна якісна проба.

Для отримання попередньої інформації про наявність флавоноїдних з'єднань використовувались хімічні методи аналізу. Флавоноїди виявляють за якісними реакцій. Результати проведення якісних реакцій в комплексі мікроміцетів, виділених з ризосфери *A. hippocastanum* наведені в таблиці 3.4.

Таблиця 3.4

Результати якісних реакцій визначення флавоноїдів

Реактиви	Опис	Результати
Проба Шинода	Темно червоний	
10 % - го спиртово-водний розчин NaOH	Оранжевий	
Ферум III хлорид	Світло коричневий	
Алюміній хлорид	Жовтий	
Реакція Вільсона	Світло жовтий	

Проведено п'ять кольорових реакцій, які підтверджують наявність флавоноїдів у виділених мікроміцетах з ризосфери *A. hippocastanum*.

Для кількісного визначення флавоноїдів запропоновано багато методів: флуорометричні, вагові, об'ємні (потенціометричне титрування в неводних середовищах, комплексометричне титрування), полярографічні, фотоколориметричні. Найбільшого поширення набув спектрофотометричний метод. Він базується на реакціях комплексоутворення з іонами різних металів, реакції азотсполучення, з борною кислотою з наступним визначенням оптичної густини в УФ-світлі при відповідній довжині хвилі.

Визначення суми алкалоїдів та флавоноїдів здійснювалося спектрофотометричним методом. Визначення оптичної густини розчину здійснювалось за допомогою фотоколориметру КФК-3-01. Фотометр фотоелектричний КФК-3-01-«ЗОМЗ» призначений для виміру спектрального коефіцієнта направленого пропускання, оптичної густини і швидкості зміни оптичної густини прозорих рідких розчинів, а також для визначення концентрації речовин в розчинах після попереднього градуювання фотометра споживачем. Діапазон довжин хвиль, 315 – 990 нм.

Для кількісного визначення алкалоїдів проведено вимір оптичної густини розчину з комплексу мікроміцетів (див. табл.3.2).

Таблиця 3.2

Значення оптичної густини дослідних зразків за довжини хвилі 420 нм

Комплекс мікроміцетів, виділених з ризосфери *A. hippocastanum*	Оптична густина
1 проба	0,098
2 проба	0,105
3 проба	0,112

Сумарний вміст алкалоїдів, у перерахунку на гіосциамін, у відсотках, обчислюють за формулою зазначеною в методах визначення.

Таблиця 3.3

Результати визначення сумарного вмісту алкалоїдів

Сумарний вміст алкалоїдів, %	Комплекс мікроміцетів, виділених з ризосфери *A. hippocastanum*
1 проба	0,63
2 проба	0,68
3 проба	0,72

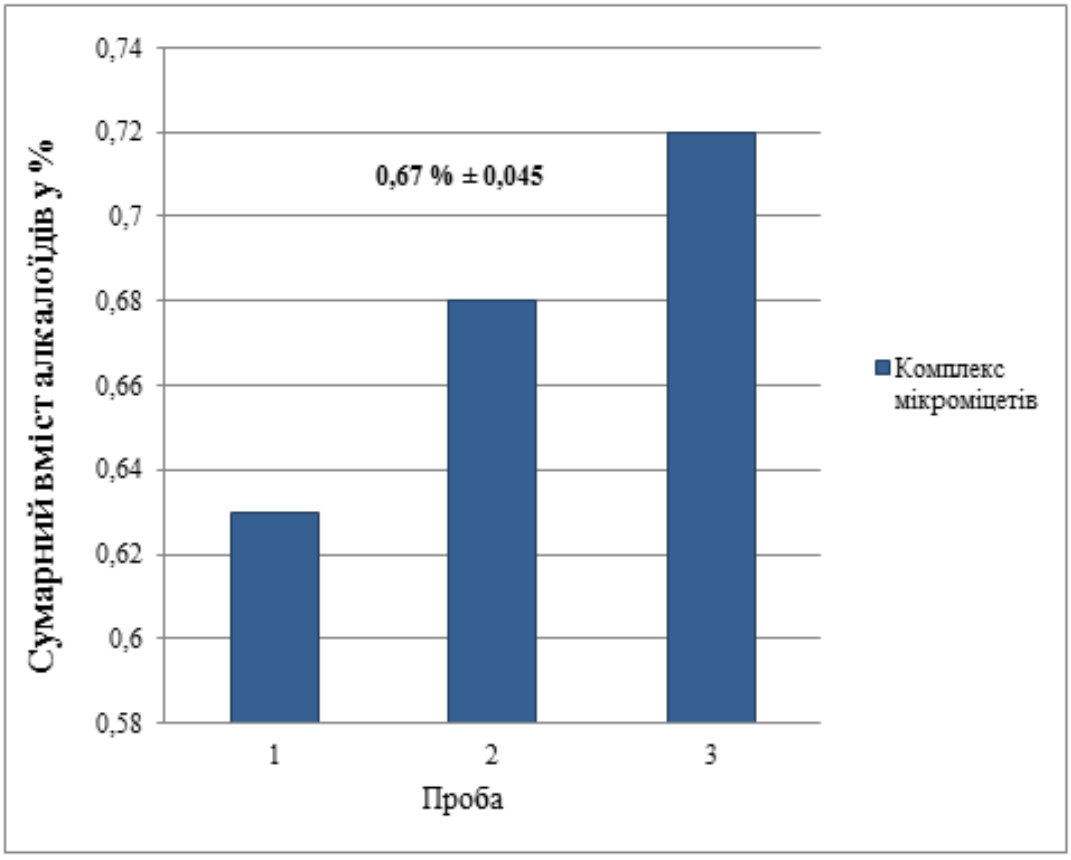


Рис.3.4. Сумарний вміст алкалоїдів у різних пробах

За даними з діаграми (див. рис. 3.8) можна зробити такі висновки: комплекс мікроміцетів, виділених з ризосфери *A. hippocastanum* містить алкалоїди. Сумарний вміст алкалоїдів складає 0,67 % ± 0,045.

Для кількісного визначення флавоноїдів проведено вимір оптичної густини розчину з комплексу мікроміцетів (див. табл.3.5).

Таблиця 3.5

Значення оптичної густини дослідних зразків за довжини хвилі 425 нм

Комплекс мікроміцетів, виділених з ризосфери *Aesculus hippocastanum L.*	Оптична густина
1 проба	0,290
2 проба	0,312
3 проба	0,302

Сумарний вміст флавоноїдів, у перерахунку на кверцетин, у відсотках, обчислюють за формулою зазначеною в методах визначення.

Таблиця 3.6

Результати визначення сумарного вмісту флавоноїдів

Сумарний вміст алкалоїдів, %	Комплекс мікроміцетів, виділених з ризосфери *Aesculus hippocastanum L.*
1 проба	1,32
2 проба	1,41
3 проба	1,37

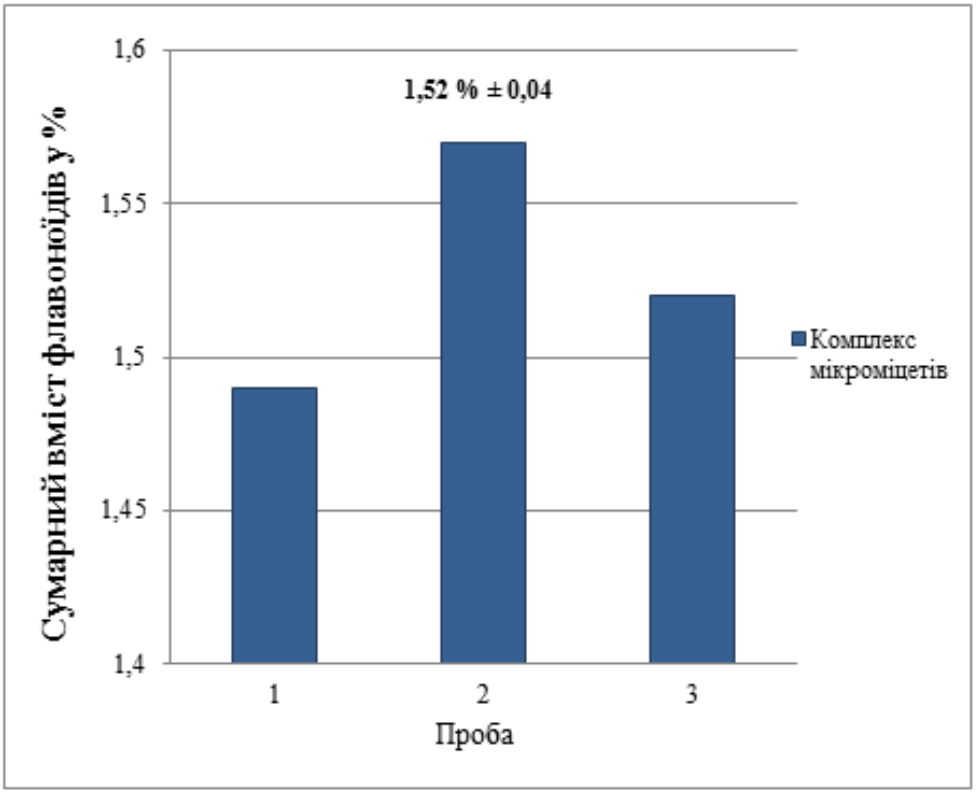


Рис.3.5. Сумарний вміст флавоноїдів у різних пробах

За даними з діаграми (див. рис. 3.5) можна зробити такі висновки: : комплекс мікроміцетів, виділених з ризосфери *A. hippocastanum* містить флавоноїди. Сумарний вміст флавоноїдів складає 1,52 % ± 0,04. Мікроміцети виділені з ризосфери *A. hippocastanum* можна використовувати як продуцент флавоноїдів і культивувати у промислових масштабах при підборі відповідних штамів, а ефективність виробництва біологічно активних речовин може бути підвищена експериментально на основі сучасних біотехнологій.

3.3. Висновки до розділу

Встановлено, що виділені мікроміцети з ризосфери Кінського каштану (*Aesculus hippocastanum* L.*)* містять в своєму складі флавоноїди та в незначній кількості алкалоїди. Визначення проводилось в комплексі мікроміцетів, сумарний вміст флавоноїдів складає 1,52 %, а алкалоїдів 0,67 %. Мікроміцети виділені з ризосфери *A. hippocastanum* можна використовувати як продуцент флавоноїдів і культивувати у промислових масштабах при підборі відповідних штамів, а ефективність виробництва біологічно активних речовин може бути підвищена експериментально на основі сучасних біотехнологій.

РОЗДІЛ 4
ОХОРОНА ПРАЦІ

4.1. Небезпечні та шкідливі виробничі фактори при дослідженні ґрунтових грибів

Експерементальна частина дипломної роботи проводилась на базі лабораторії кафедри біотехнології Національного авіаційного університету. В експерементальну частину роботи входило – виділення та культивування мікроміцетів ґрунтів, а також подальше визначення фармакологічно потенційних речовин в виділених грибах. При виконанні роботу було проаналізовано умови праці та виявлено ряд небезпечних та шкідливих виробничих факторів, які впливають на працездатність та здоров'я працівників лабораторії.

Відповідно до ГОСТ 12.0.003-74 на працівника у лабораторії діяли фізичні та хімічні небезпечні та шкідливі виробничі фактори. До фізичних НШВФ відносяться – підвищений рівень ультрафіолетової радіації; підвищена температура повітря робочої зони; підвищений рівень шуму на робочому місці; підвищена запиленість та загазованість повітря робочої зони. До хімічних НШВФ відносяться – токсичні речовини, які використовувались для проведення дослідів. Відповідно до ГОСТ 12.0.003-74 хімічні небезпечні та шкідливі виробничі фактори підрозділяються за характером впливу на організм людини. Під час роботи в лабораторії на працівника впливали токсичні хімічні небезпечні і шкідливі виробничі фактори [41].

Підвищений рівень ультрафіолетової радіації. Джерелом підвищення рівня ультрафіолетової радіації в лабораторії є бактерицидні кварцові лампи, спектр яких містить випромінювання діапазону довжин хвиль 205-315 нм. Бактерецидні лампи використовуються для створення стерильних умов в боксвому приміщенні лабораторії. Нормування УФ випромінювання у виробничих приміщеннях здійснюють згідно з санітарними нормами СН4557-88. Допустима інтенсивність

ультрафіолетового опромінення працюючих при наявності незахищених ділянок поверхні шкіри не більше 0,2 $м^2$ (обличчя, шия, кисті рук і ін.), Загальною тривалістю впливу випромінювання 50% робочої зміни і тривалість одноразового опромінення понад 5 хв і більше не повинна перевищувати: 10,0 $Вт/м^2$ с для області УФ-А; 0,01 $Вт/м^2$ – для області УФ-В. Випромінювання в області УФ-С при зазначенії тривалості не допускається [42].

Підвищена температура повітря робочої зони. Робота в лабораторії проводилась в теплий період року. Відповідно до ДСН 3.3.6.042-99 оптимальні величини температури – 20-22 °С; відносної вологості повітря 60-40 %; швидкості руху повітря в робочій зоні 0,3 м/с. Джерелом підвищення температури в лабораторії були – спиртівка, електрична плитка, термостати, автоклав, сушильна шафа для стерилізації. В результаті впливу даних факторів температура в робочій зоні підвищувалась, досягала 32 °С, що не відповідає нормам [43].

Підвищений рівень шуму на робочому місці. Джерелом шуму в лабораторії є сушильна шафа для стерилізації, автоклав, вентиляційна шафа, шейкери тощо. Часткова або повна втрата слуху можлива при тривалій дії шуму інтенсивністю більше 80 дБА. Скрізь волокна слухових нервів роздратування шумом передається в центральну і вегетативну нервові системи, а через них впливає на внутрішні органи, приводячи до значних змін у функціональному стані організму, впливає на психічний стан людини. Причому вплив шуму на нервову систему виявляється навіть при невеликих рівнях звуку (30..70 дБА). Нормування рівні звукового тиску (дБ) та рівнів шуму (дБА) робочих місцях здійснюється відповідно до ДСН 3.3.6.037-99 [44].

Підвищена запиленість та загазованість повітря робочої зони. Відповідно до санітарних норм усі виробничі і допоміжні приміщення повинні вентилюватися. Рівень повітрообміну в лабораторії є недостатній, оскільки він не може забезпечити дотримання норм температури повітря (°С); відносної вологість повітря (%); швидкість руху повітря (м/с); ГДК шкідливих газоподібних речовин ($мг/м^3$). В лабораторії є витяжна шафа, яка не може забезпечити повне дотримання норм мікроклімату в приміщенні, тому необхідне встановлення додаткової вентиляції, яка

буде забезпечувати лабораторію чистим повітрям і заданими метеорологічними умовами. Оптимальним є встановлення в лабораторії системи припливно-витяжної вентиляції, оскільки це забезпечить повітрообмін з одночасною подачею і видаленням повітря.

Токсичні хімічні небезпечні і шкідливі виробничі фактори. Для дезінфекції інструментів був використаний етиловий спирт. Етиловий спирт за ступенем впливу на організм людини відноситься до 4-го класу небезпеки, гранично допустима концентрація (ГДК) парів етилового спирту в повітрі робочої зони виробничих приміщень – 1000 мг/м^3 згідно ГОСТ 12.1.005-88 [45].

Для проведення дослідів використовувався гідроксид натрію. Відповідно до ГОСТ 12.1.005-88 гідроксид натрію відноситься до шкідливих речовин 2-го класу небезпеки. ГДК аерозолю гідроксиду натрію в повітрі робочої зони складає 0,5 мг/м³. Для визначення біологічно активних речовин використовувалась оцтова кислота, яка належить до 3-го класу небезпеки, ГДК парів оцтової кислоти у повітрі робочої зони 5 мг/м^3 [45].

4.2. Технічні та організаційні заходи для зменшення рівня впливу небезпечних та шкідливих виробничих факторів при дослідженні ґрунтових грибів

Зменшення рівня ультрафіолетової радіації. Згубний вплив ультрафіолетових випромінювань полягає в тому, що біологічні тканини поглинають випромінювання нуклеїновою кислотою і зведеними білками клітин, внаслідок чого виникають світло хімічні реакції у цих з’єднаннях. Розпочинається часткова загибель клітин шкіри, збільшується швидкість їх проліферації, зміни форми та розміру.

Потрібно також зазначити, що УФ випромінювання діє як подразник на нервові закінчення шкіри, спричиняє необоротні зміни в організмі та викликає дерматити, екземи, набряклість. Однак, це далеко не всі побічні ефекти впливу ультрафіолетової радіації, найбільшого впливу зазнає центральна нервова система, і

як наслідок виникають супутні побічні прояви: порушення нервової системи, головний біль, підвищення температури тіла, втома, млявість, тощо.

Захиститись від впливу УФ випромінювань або принаймні зменшити кількість радіації, яку ми отримуємо, можемо за допомоги використання наступних заходів:

- захист відстанню – досягнути цього можна через визначення захисної відстані завдяки здійсненню реальних вимірів у конкретних умовах;
- захист через екранування робочих місць – є найбільш раціональним та ефективним методом захисту. Екрани використовуються у вигляді щитів, ширм, кабін. Скло, яке містить оксид свинцю і має назву флінтглас повністю захищає від УФ випромінювання у всіх областях;
- захист засобами індивідуального захисту – це спеціальний одяг, який пошитий із матеріалів, які не пропускають УФ випромінювання, переважно льняні, бавовняні тканини та поплін; захисні окуляри та щитки із світлофільтрами. Для забезпечення захисту рук використовують мазі із речовинами, що є світофільтрами, а саме салол та саліциловометиловий ефір;
- захист за допомоги спеціального фарбування приміщень і раціонального розташування робочих місць – досягається через фарбування стін, ширм у світлі кольори, переважно це сірий, жовтий та блакитний колір, додатково використовуючи цинкове чи титанове білило для поглинання УФ випромінювань [46].

Зменшення впливу підвищення температури повітря робочої зони.

Підвищення температури повітря біля робочого місця працівника може спричинити погіршення його самопочуття, а тривалий вплив підвищеної температури - до перегріву та втоми, що в кінцевому результаті може призвести до втрати свідомості, тому необхідно відповідально ставить до дотримання температурного режиму повітря в робочій зоні.

Для забезпечення визначеного температурного режиму в лабораторії необхідне встановлення кондиціонера. Система кондиціонування повітря повинна забезпечувати нормовані метеорологічні параметри та чистоту повітря в приміщенні

при розрахункових параметрах зовнішнього повітря для теплого і холодного періодів року згідно ДСН 3.3.6.042-99 та ГОСТ 12.1.005-88. Здійснення кондиціонування повітря в приміщенні виконується комплексом технічних засобів – системою кондиціонування повітря (СКП). До складу СКП належать: прилади приготування, переміщення та розподілу повітря, засоби автоматики, дистанційного керування та контролю. Технічні засоби СКП повністю або частково агрегатуються в кондиціонері.

При наявності в приміщенні джерел тепловипромінювання, необхідно застосовувати комплекс заходів із теплоізоляції устаткування та поверхонь, що нагріваються, за допомоги теплозахисного обладнання згідно з ДСН 3.3.6.042-99. Варто пам'ятати, що в залежності від принципу дії теплозахисні засоби поділяються на: тепловідбивні - металеві листи із таких матеріалів як: сталь, залізо, алюміній, цинк, поліровані або покриті білою фарбою, тощо); одинарні або подвійні; загартоване скло з плівковим покриттям; металізовані тканини; склотканини; плівковий матеріал та інші; теплопоглинаючі – сталеві або алюмінієві листи, або коробки з теплоізоляцією з азбестового картону, шамотної цегли, повсті, вермикулітових плит та іншими теплоізоляторами; сталева сітка (одинарна або подвійна з загартованим силікатним склом); загартоване силікатне органічне скло та ін.; тепловідвідні – екрани водоохолоджувальні (з металевого листа або сітки з водою, що стікає), водяні завіси та ін.; комбіновані. В залежності від особливостей технологічних процесів застосовують прозорі, напівпрозорі екрани. Вибір тих чи інших теплозахисних засобів визначається інтенсивністю та спектральним складом випромінювання, а також умовами технологічного процесу [43].

Якщо підприємство не може забезпечити гідними технічними засобами допустимі гігієнічні норми опромінення робітників на робочих місцях, допускається використання засобів індивідуального захисту (ЗІЗ) – спецодяг, спецвзуття, ЗІЗ для захисту голови, очей, обличчя, рук, тощо [43].

В профілактичних цілях уникнення перегрівання працівників в робочій зоні в умовах змінного мікроклімату необхідно організовувати раціональний режим праці та відпочинку.

Зменшення впливу підвищення рівня шуму на робочому місці. Працюючі в умовах тривалого шумового впливу може виникнути зниження пам'яті, запаморочення, підвищену стомлюваність, дратівливість і ін. До об'єктивних симптомів шумової хвороби відносяться: зниження слухової чутливості, зміна функцій травлення, що виражається в порушенні кислотно-лужного балансу у шлунку, серцево-судинна недостатність. Відмічаються порушення зорового та у вестибулярному апараті [46].

Захист від шуму повинен здійснюватися розробкою шумобезпечної техніки, використанням методів та засобів колективного захисту та засобами індивідуального захисту. Питання боротьби з шумом слід починати вирішувати ще при проектуванні підприємства, робочого місця, устаткування.

До організаційних заходів відносяться раціональне розташування виробничих ділянок, устаткування та робочих місць, постійний контроль режиму праці і відпочинку працівників, обмеження застосування обладнання та використання робочих місць, що не відповідають санітарно-гігієнічним вимогам [46].

Технічні заходи дають змогу значно зменшити вплив шуму на працівників і поділяються на заходи, що використовуються: в джерелі виникнення (конструктивні та технологічні), на шляху розповсюдження (звукоізоляція, звукопоглинання, глушники шуму, звукоізоляційні укриття) в зоні сприйняття (засоби колективного та індивідуального захисту).

Для зниження шуму необхідно насамперед використовувати конструктивні та технологічні методі, які в свою чергу залежать від походження звуку, конструктивних особливостей обладнання. Якщо рівень шуму у джерелі все таки високий, то застосовуються методи зниження шуму на шляху розповсюдження і насамперед такій метод, як ізоляція джерела чи робочого місця. Звукова ізоляція від повітряного шуму здійснюється за допомогою кожухів, екранів, перетинок. Звукоізолюючі перепони відбивають звукову хвилю і тим самим перешкоджають розповсюдженню шуму [46].

Збільшення рівня повітрообміну в робочій зоні. Підвищена запиленість повітря робочої зони може привести до виникнення захворювань органів дихання і

зору при вдиханні повітря, насиченого частинками виробничого пилу, і при попаданні на слизову оболонку очей частинок пилу. Для того, щоб в приміщенні був оптимальний стан повітря, зменшення ступеню запиленості та загазованості повітря, а також видалення небезпечних та шкідливих речовин необхідно дотримуватись наступних вимог:

1. При будівництві приміщення необхідно встановлювати відповідну систему вентиляції, дотримуючись норм і правил, що забезпечують безпечний і ефективний повітрообмін. Крім загальної вентиляції необхідно встановлювати місцеву, над робочими зонами які цього потребують. Використовувати в системі вентиляції додаткові фільтри необхідних потужностей.

2. Для покращення ефективності роботи вентиляції необхідно дотримуватися наступного: об'єм повітря яке надходить (припливного) $L_п$ у виробничі приміщення має відповідати обсягу витяжки $L_в$. Різниця між ними не повинна перевищувати 10…15%. Також, є можливість створення обміну повітря, коли об'єм повітря, яке надходить, більше об'єму повітря, що видаляється. В такому випадку в приміщенні створюється надлишковий тиск порівняно з атмосферним, що виключає інфільтрацію забруднювальних речовин у це приміщення. Для мінімізації витоків із приміщень з підвищеним рівнем забруднення об'єм повітря, що видаляється з них, має бути більшим об'єму повітря, що надходить. У таких зонах утворюється незначне пониження тиску в порівняно з тиском у навколишньому середовищі [46].

3. Розробляючи план обміну повітря потрібно подавати свіже повітря в зони приміщення, де найменша кількість шкідливих речовин. Забір повітря необхідно проводити із частин приміщення, які найбільш забруднені. Якщо густина шкідливих газів менше густини повітря, то видалення забрудненого повітря виконується з верхньої частини приміщення, при видаленні шкідливих речовин із густиною більшою – з нижньої зони.

4. Вентиляція повітря та їх системи не мають створювати додаткових несприятливих факторів (наприклад, підвищений шум в приміщенні, вібрація).

5. Головна характеристика встановлення систем вентиляції – це є її надійність (тривалий термін служби).

Захист від несприятливого вплину токсичних речовин. Для захисту працівників від шкідливої дії хімічних речовин при роботі необхідно дотримуватися правил техніки безпеки. Ефективним захистом працівників в лабораторії є встановлення відповідних систем вентиляції – загальні та місцеві, у відповідних робочих зонах. Також як захист від токсичних речовин можна використовувати засоби індивідуального захисту (спецодяг, рукавиці, маски, окуляри). Всі хімічні речовини необхідно зберігати за відповідних умов у спеціально відведених для них місця, тара для зберігання має бути щільно зачинена для уникнення летючості відповідних речовин.

Хімічні речовини при попаданні на тіло можуть викликати хімічні опіки, а проникнення в організм людини через легені, шкіру і рот – отруєння, глибоку токсикацію. Досліди з концентрованими кислотами, лугами та іншими небезпечними речовинами слід проводити з використанням засобів індивідуального захисту у витяжній шафі при працюючій загальнообмінній вентиляції. Відповідно до ГОСТ 12.1.016-79 в лабораторії необхідно постійно проводити вимірювання концентрацій шкідливих речовин в повітрі робочих зон.

Розрахунок системи кондиціонування лабораторії кафедри біотехнології НАУ. Одним з основних заходів щодо забезпечення працівників лабораторії оптимальними метеорологічними параметрами та чистим повітрям в приміщенні – є встановлення системи кондиціонування повітря. Головна мета кондиціонування повітря – це створення автоматичного підтримування в приміщенні, незалежно від зовнішніх умов, по визначеній програмі температури, вологості, чистоти і швидкості руху повітря. Оптимальні параметри мікроклімату приміщення забезпечують відчуття теплового комфорту та створюють передумови для високого рівня працездатності [46].

Системи кондиціонування повітря (СКП) мають створювати визначені метеорологічні показники та чистоту повітря в приміщенні лабораторії при

розрахункових параметрах зовнішнього повітря для теплого і холодного періодів року згідно ДСН 3.3.6.042-99 та ГОСТ 12.1.005-88.

Вибір кондиціонера типу «спліт» – система здійснюють за їх продуктивністю (охолодження/обігрів) з урахуванням усіх теплоприпливів – зовнішнього, від обладнання та працівників.

Надлишкове тепло в приміщенні лабораторії можна визначити за формулою:

$$Q_{надл} = Q_л + Q_{зов} + Q_{осв} + Q_{уст}, Вт,$$

де $Q_л$ – надходження тепла від людей (обслуговуючого персоналу), Вт;

$Q_{зов}$ – кількість тепла, що надходить в приміщення зовні (зовнішній приплив тепла), Вт;

$Q_{осв}$ – кількість тепла, що надходить в приміщення від електричного освітлення, Вт;

$Q_{уст}$ – кількість тепла, що надходить в приміщення від обладнання та устаткування, що споживає електроенергію, Вт.

Кількість тепла, що надходить в приміщення від працівників лабораторії можна визначити за формулою:

$$Q_л = 0,6 \times n \times q, Вт,$$

де n – кількість працівників в лабораторії, чол.;

q – кількість повного тепла, що виділяється однією людиною, Вт.

Зазвичай в лабораторії одночасно працюють п’ять працівників. При спокійній роботі одного працівника q = 0,15 кВт.

$$Q_л = 0,6 \times 5 \times 0,15 = 0,45 \text{ кВт}$$

Зовнішній приплив тепла, що надходить в приміщення лабораторії визначається за формулою:

$$Q_{зов} = q_1 \times V, Вт,$$

де q_1 – коефіцієнт інсоляції, приймається (30…40 Вт/м^3), для вікон південної орієнтації – q_1 = 40 Вт/м^3, для північної – q_1 = 30 Вт/м^3, середнє значення q_1 = 35 Вт/м^3;

V – об’єм приміщення, м^3.

Площа лабораторії 36 м^2, висота – 3 м, відповідно визначаємо об'єм приміщення:

$$V = S \times h = 36 \times 3 = 108 \text{ м}^3$$

$$Q_{зов} = 35 \times 108 = 3{,}78 \text{ кВт}$$

Кількість тепла, що надходить в приміщення лабораторії від електричного освітлення визначається за формулою:

$$Q_{осв} = q_2 \times S \times E, Вт,$$

де q_2 – питоме тепловиділення (q_2 = 0,05);

S – площа приміщення, м^2;

E – рівень освітленості 1 м^2, лк.

$$Q_{осв} = 0{,}05 \times 36 \times 500 = 0{,}9 \text{ кВт}$$

Кількість тепла, що находить в приміщення лабораторії від обладнання та устаткування, що споживає електроенергію можна визначити за формулою:

$$Q_{уст} = 0{,}55 \times P, Вт,$$

де P – паспортна потужність, кВт.

В лабораторії знаходиться наступне обладнання: 3 термостати (P = 0,6 кВт), сушильна шафа для стерилізації (P = 1,2 кВт), автоклав (P = 1,4 кВт).

$$Q_{уст} = 0{,}55 \ (3 \times 0{,}6 + 1{,}2 + 1{,}4) = 2{,}42 \text{ кВт}$$

$$Q_{надл} = 0{,}45 + 3{,}78 + 0{,}9 + 2{,}42 = 7{,}55 \text{ кВт}$$

Продуктивність СКП при наявності в приміщенні надлишкового явного тепла визначають за формулою:

$$L = \frac{Q_{\text{надл}}}{C \times \gamma \times (t_в - t_п)}, \text{м}^3/\text{год.},$$

де $Q_{надл}$ – надлишкове тепло в приміщенні, ккал/год;

C – питома теплоємність повітря, ккал/(кг ·˚С), (C = 0,24 ккал/(кг ·˚С));

$t_В$ – температура повітря в приміщенні, ˚С;

$t_п$ – температура припливного повітря, ˚С;

γ – питома густина припливного повітря, кг/м^3.

$$\gamma = \frac{353}{273 + t_п} = \frac{353}{273 + 20} = 1{,}2 \text{ кг/м}^3$$

Надлишкове тепло в приміщенні становить 7,55 кВт відповідно це 6491,83 ккал/год.

$$L = \frac{6491{,}83}{0{,}24 \times 1{,}2 \times (25 - 20)} = 4508{,}2 \text{ м}^3/\text{год}$$

Отже, для забезпечення оптимальних параметрів мікроклімату та забезпечення чистим повітрям в лабораторії необхідне встановлення системи кондиціонування повітря продуктивність від 4508 м^3/год. Наприклад, можна встановити кондиціонер MIDEA MOU-36 H, продуктивність якого 5000 м^3/год.

4.3. Забезпечення пожежної та вибухової безпеки при дослідженні ґрунтових грибів

Причинами виникнення пожежі у лабораторії можуть бути:

- Необережне поводження з відкритим вогнем (спиртівка);
- Не справність електричного обладнання або порушення правил монтажу та експлуатації даного обладнання;
- Коротке замикання;
- Перевантаження освітлювальних мереж;
- Порушення правил застосування та збереження легкозаймистих речовин та матеріалів;
- Невиконання вимог нормативних документів з питань пожежної безпеки.

В приміщенні лабораторії має бути належна пожежна безпека для запобігання пожежі і протипожежного захисту. Пожежна безпека забезпечується організаційно-технічними заходами.

Згідно ДСП 9.9.5.-080-02 в приміщенні лабораторії має бути автоматична пожежна сигналізація, засоби гасіння пожежі (вогнегасники), їх необхідно

розміщувати в доступних для всіх місцях. Боксові приміщення лабораторії мають бути обладнані вогнегасниками та ковдрою для гасіння пожежі (азбестовою чи вовняною). Прохід до засобів, що використовують для пожежогасіння має бути вільним [47].

Забороняється здійснювати наступні дії, для попередження виникнення пожежі:

- палити у приміщенні лабораторії;
- не дотримуючись правил безпеки зберігати вогненебезпечні (етиловий спирт, бензин), вибухонебезпечні та легко займисті речовини;
- розміщувати або зберігати біля відкритих палаючих пальників, радіаторів опалення, електричних проводів спирт, вату, папір та інші легкозаймисті матеріали. Їх необхідно зберігати в у відповідних місцях;
- на відкритому вогні або електроплитах забороняється нагрівати легкозаймисті матеріали;
- електроприлади, пальники та освітлення не можна залишати ввімкненим без нагляду;
- якщо в приміщенні відчувається запах газу забороняється вмикати електроприлади та використовувати пальники з відкритим вогнем (спиртівки);
- видаляти випадково пролиті легкозаймисті речовини при запалених пальниках і ввімкнених електроприладах;
- використовувати несправні електроприлади або саморобні, з відкритими спіралями нагрівання;
- загромаджувати прохід до засобів пожежогасіння, коридори, переходи, запасні виходи та сходи [47].

Приміщення лабораторії або виробничі приміщення мають бути забезпечені інструкцією з пожежної безпеки, схемою евакуації на випадок виникнення пожежі. Працівники повинні проходити регулярні навчання з питань пожежної безпеки у зазначених термінах.

Якщо виникла пожежа або вибух працівники лабораторії мають, перш за все, викликати пожежну службу. Далі проводити евакуацію персоналу згідно діючої схеми, якщо це необхідно.

Наступний етап: працівники самостійно здійснюють заходи для ліквідації пожежі: вимикають електроприлади і пальники; закривають усі вікна; виносять легко займисті матеріали та речовини, балони із газом; використовують засоби пожежогасіння (вогнегасники, ковдри, пісок, вода) [47]. Засоби, якими потрібно гасити полум'я:

- сухий пісок використовують для знешкодження лужних металів та фосфору;
- засоби пожежогасіння (вогнегасники, вовняна ковдра, пісок, вода) гасять речовини, що змішуються з водою та легко займисті рідини та матеріали;
- вуглекислотні вогнегасники, пісок використовують при загоранні речовин, що не змішуються з водою. В таких заборонено використовувати воду, гасити полум'я починають з периферії;
- всі засоби при виникненні пожежі дерев'яних матеріалів [47].

4.4. Висновки до розділу

В лабораторії кафедри біотехнології НАУ виявлено ряд небезпечних та шкідливих виробничих факторів, які впливають на працездатність та здоров'я працівників лабораторії. Відповідно до ГОСТ 12.0.003-74 на працівника у лабораторії діяли фізичні та хімічні небезпечні та шкідливі виробничі фактори. В лабораторії здійснюються технічні та організаційні заходи для зменшення рівня впливу небезпечних та шкідливих виробничих факторів, а також здійснюється забезпечення пожежної та вибухової безпеки.

РОЗДІЛ 5
ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА

5.1. Ґрунт, ґрунтова флора та фауна, їх значення та функції

В даний час існує глобальна проблема взаємодії людини з природою, яка набуває особливої гостроти в останні десятиліття. Стан земельних ресурсів викликає велику тривогу. Деградація грунтів в даний час є однією з найважливіших соціально-економічних проблем, яка створює загрозу екологічної, економічної і національної безпеки.

Стає зрозумілим, що вирішення цієї проблеми неможливе без осмислення нинішніх екологічних проблем: збереження генофонду фауни і флори, збереження частоти і продуктивності природних середовищ, екологічне нормування впливу людини на природні екосистеми, виснаження та забруднення морів, океанів, збереження озонового шару, харчових ланцюгів природи, забруднення ґрунтів, ерозія, дефляція, вторинне засолення, заболочування та інші.

Ґрунт – це один із голових компонентів біосфери, в ньому вдбуваються найважливіші процеси. В складі ґрунту є мінеральні та органічні речовини. Ґрунт є продуктом декількох факторів: впливу клімату, рельєфу (висота, орієнтація та ухил рельєфу), організмів та вихідних матеріалів ґрунту, що взаємодіють з часом. Він постійно зазнає розвитку в результаті численних фізичних, хімічних та біологічних процесів. Екологи розглядають ґрунт як екосистему, в якій важливе місце посідають живі отранізми – рослини, тварин та велика кількість мікрооганізмів. Узагальнюючи інформацію яка зазначена вище, можна сказати, що ґрунт – це багатофазна система. [48].

Ґрунт – це природний, трифазний, біологічно активний, поверхневий шар Земної кори, який утворюється в процесі ґрунтоутворення із гірських порід (материнської породи) в результаті взаємодії живих організмів та кліматичних умов, взаємодія відбувається із спецефічним рельєфом та триває первний проміжок часу.

Ґрунт виконує різні функції в біосфері, у табл. 5.1 виділено дві основних групи функцій: глобільні та біогеоцентичні.

Таблиця 5.1

Функції, що виконують ґрунти у біосфері

Глобальні функції	Біогеоценотичні функції
Середовищем для розвитку життя на Землі	Життєвий простір, механічна опора, місце зберігання насіння, джерело елементів живлення
Ґрунт забезпечує великий геологічний і малий біологічний кругообіг речовини	Регулятор чисельності, складу і структури біоценозів
Ґрунт регулює хімічний склад атмосфери і гідросфери	Ґрунт є буфером і захисним біогеоценотичним екраном
Ґрунт є фактором біопродуктивності наземних екосистем	Сорбент речовин із атмосфери і ґрунтових вод
Ґрунт є акумулятором неживої речовини - гумусу і зв'язаної з ним хімічної енергії	Стимулятор та інгібітор біохімічних та інших процесів

Основаю для створення ґрунту є ґрунтотвірні породи (материнські породи). Вони відіграють важливу роль в утворенні ґрунту, але важливе значення також посідає жива фаза ґрунту. Жива фаза ґрунту – це рослини, тварини та мікроогранізми, які внаслідок своєї взаємодії з материнськими породами у відповідних кліматичних умовах утворюють ґрунт.

В ґрунті є велика кількість органічних речовин, які утворюються в результаті життєдіяльності рослин. Після відмирання рослин утворюється рослинний опад, який після мінералізації потрапляє в ґрунт та збагачує його органічними речовинами. З рослинного опаду також утворюється прегній (гумус), якій надає ґрунту темного кольору. Відомо, що рослини синтизують спецефічні хімічні елементи, які необхідні для їх росту та розвитку. Відмерлі рослини розкладаються, але спецефічні хімічні елементи залишаются в ґрунті, чим збагачують його. Рослини – це головна матеріальна база для утворення первинної органічної речовини в ґрунті [48].

Мікроорганізми ґрунту (ґрунтова мікрофлора), відповідно до даних Є.М. Мішустіна [49], сягає мільярдів клітин в 1 г ґрунту і близько 4000 видів мікроорганізмів. Мікрооргвнізми – це важливий чинник в процесі утворення ґрунту та його функціонування. Процес розкладання рослинних залишків у ґрунті здійснюють мікрооганізми, також вони приймають учать в процесі синтузу органічних та мінеральних речовин, оскільки утворюють широкий спектр вторинних метаболітів, які збагачують ґрунт. Вторинні метаболіти мікроорганізмів також мають важливе значення і для рослин, оскільки вони можуть стимулювати або пригнічувати їх ріст та розвиток.

Один із голоних факторів родючості ґрунту є мікроорганізми. Відомо, що в ґрунті є велика різноманітність мікроорганізмів, які різняться між собою, за морфологічними та біохімічними ознаками – це і є причиною їх важливаго значення в процесах, що відбуваються у ґрунті. До функцій, чкі виконують мікрооргвнізми в ґрунті належать: моболізація фосфору, накопичення та колообіг азоту (особливо важливо для рослин), забезпечення рослин поживними мінералами (натрій, калій).

В сучасній мікробіології ґрунтів є актуальним дослідження мікроорганізмів, оскільки вони можуть виступати як індикатори забруднення ґрунтів. Внаслідок постійного вплинву людини на ґрунт, мікроорганізми, які в ньому знаходяться зазнають постійних змін. Зміни впливають на активність мікробіоти та синтез вторинних метаболітів, що безпосередньо впливає на рослини та ґрунт вцілому.

Утворення різних типів ґрунтів пояснюється постійною взаємодією рослин та мікроорганізмів, які в процесі своєї житєдіяльності утворюють спецефічні комплекси (угрупування рослина-мікроорганізми). Хоча, в свою чергу, ґрунт виконує функцію географічного поширення рослин та їх формування (едафічні умови).

Наявність, активність та видова різноманітність мікроорганізмів залежить від кількості та якості органічних сполук, що містяться і ґрунті. Даний фактор безпосередньо впливає на життєдіяльність мікоорганізмів. Сприятливі умови для мікроорганізмів забезпечують високу інтенсивність розкладання органічних решток

та створення гумусу. Мікоробіота також впливає на біохімічне руйнування мінеральних сполук.

Ще один представник живої фази ґрунту – тварини. Ґрунт містить в собі велику кількість та видову різноманітність тварин, що впливають на процеси ґрунтоутворення та вцілому його функціонування. Тварини забезпечують ґрунт органічними речовинами – мікоелементи, вітаміни та ферменти. Головна функція тварин в ґрунті це створення зернистої структури внаслідок перемішування різних шарів. При перемішуванні шарів ґрунту покращується його аерація, що чинить вплив на швидкість процесів ґрунтоутворення. Тварини внаслідок своєї життєдіяльності утворюють оганічні рештки, які потрапляють в ґрунт і покращують його якість [51].

5.2. Фактори впливу антропогенної діяльності на стан ґрунтів та ґрунтової флори і фауни

Теперішній етап розвитку ґрунтознавства в результаті прогресуючої екологічної кризи, обумовлений антропогенним впливом людини на біосферу загалом і ґрунт зокрема, потребує детального аналізу та чіткого розуміння значення ґрунту у збереженні біологічного різноманіття Землі, розвику людської цивілізації та екологічно стабільного співмешкання [52].

В наш час збільшення масштабів ерозії, виснаження та деградації ґрунтів, катастрофічний стан з водопостачанням (особливо питною водою), зменшення видового різноманіття фауни і флори, знищення агроландшафтів, забруднення пестицидами, нітратами, важкими металами та іншими забруднювачами, що обумовлено сільськогосподарською діяльністю, досягло свого апогею.

Існує велика кількість факторів, які впливають на ґрунт та ґрунтову флору і фауну. Негативний вплив на ґрунт проявляється в його деградації – погіршення якості ґрунту в результаті зниження родючості і повному руйнуванні. Порушення ґрунту є результатом складного комплексу антропогенних і природних впливів на процеси зміни фізико-хімічних і механічних характеристик ґрунту.

Незмірно зросла інтенсивність впливу людини на ґрунт в наші дні. Це пов'язано із здійсненням великої програми хімізації сільського господарства, осушення і зрошення земель на великих територіях, створенням ставків і водойм, полезахисних лісових насаджень, всезростаючого техногенного навантаження на ґрунт. Під впливом обробки, добрив, зрошення, осушення та інших видів меліорації ґрунтів природний процес ґрунтоутворення зазнає великі зміни. Ґрунти набувають якісно нові властивості: внесення органічних і мінеральних добрив, вапнування і гіпсування ґрунту усувають несприятливі для розвитку рослин і мікроорганізмів фізико-хімічні властивості, змінюють хімічний склад ґрунтів.

Однак виробнича діяльність людини може привести і до небажаних явищ: заболочування ґрунтів, їх засолення, ущільнення і руйнування ґрунту від «антропогенного тиску», забруднення різними шкідливими відходами, розвитку процесів водної та вітрової ерозії та інших негативних наслідків. Тому вплив людини на ґрунт має бути направлено на планомірне поліпшення якості ґрунту і підвищення її продуктивності.

Умови ґрунтоутврення змінюються внаслідок впливу антропогенних факторів. Вплив антропогенних чинників змінює фактори ґрунтоутворення, що впливає на стан та якість ґрунтів. Стан ґрунтів, в свою чергу, чинить безпосередній вплив на рослини, тварини та мікроорганізми [48].

Форми зміни факторів утворення ґрунтів під впливам антропогених чинників:

- зміни структури материнських порід – надмірне видобування торфу, рекультивація ґрунту тощо;
- зміни рельєфу – надмірний видуботок кам’яного вугілля, внаслідок чого утворюються терекони, кар'єри, штучні дамби;
- зміни сталої сокупності живих організмів в ґрунті (тварин, рослин та мікоорганізмів) – це може відбуватися в результаті сільськогосподарської діяльності людини, а саме зкмлеробства та вирубовання лісі;
- зміни кліматичних умов на різних рівнях – зміни в наслідок глобального потепління.

Вплив діяльності людини на ґрунтовий покрив:

- Забруднення хімічними речовинами: важкі метали, пестециди, продукти радіоактивного розкладу;
- Штучний вплив на режим та рівень річок і ґрунтових вод;
- Вирубування лісів.

Господарська діяльність людини потребує ґрунту відповідної якості, щоб він міг задовільнити потреби для отримання максимальних врожаїв. Для досягнення цієї мети – людина здійснює цілеспрямований вплив на ґрунт для задоволення своїх потреб. В сільськогосподарсьій діяльність людини використовує різну техніку, проводить меліораці, вносить добрива та змінює кислотність чим здійснює безпосередній вплив на стан ґрунтів. Використання мінеральних добрив та хімічних речовин для захисту рослин впливає на хімічний склад ґрунту, також це може призвести до зміни видового різноманіття живих організмів, рослин та тварин [48].

Антропогенний вплив людини на ґрунт проявляється в наступному:

- Хімічне забруднення;
- Ерозія ґрунтів;
- Відходи комунальних та промислових комплексів;
- Зболочування ґрунтів;
- Утворення пустель;
- Засолення (вторинне).

Ерозія ґрунтів – знищення (знесення та деградація) верхнього найбільш родючого шару ґрунту і підстилаючих порід вітром (вітрова ерозія) або потоками води (водна ерозією), вона може відбуватися повільно або з досить високою швидкістю. Негативний вплив ерозії проявляється у погіршенні стану ґрунту або повній його руйнації. До головних причин виникнення ерозії відносять: зменшення кількості та видової різноманітності рослин, нераціональне використання агротехнічних методів, нерегульований випас худоби. Зазвичай, ерозія розпочинається від впливу антропогенної діяльності людини, але далі вона посилюється внаслідок природних сил [52].

Вторинне засолення ґрунтів виникає внаслідок надмірного поливу або порушення наукових норм поливу ґрунту. Також це явище може бути викликане збільшенням кількості легкорозчинних солей (Na_2CO_3, солі хлоридної і сульфатної кислоти). Засоленим є ґрунт, в якому вмісті більше ніж 0,1% ваги токсичних для рослин солей або 0,25% солей у густому осаді [52].

Негативний вплив вторинного засовленян прявляеться в погіршення кругообігу речовин в ґрунті. Внаслідок погіршення ґрунті він стає не предатним для життя тварин, рослин та мікоорганізмів, зменшується іх видова різноманітність.

В теперішній час проблема ущільнення ґрунту стає більш актуальною чим раніше, екологи все частіше її обговорюють. Внаслідок антропогенного впливу, а саме використання в сільськогосподарсікій діяльності важкої техніки та не дотримання правил сівозміни призводить до руйнування структури ґрунту (його ущільнення), порушення водного режиму, що в кінцевому підсумку впливає на його родючість. Іноді, ущільнення ґрунту розглядають як початкову стадію процесц ерозії, оскільки вони між собою ссожі.

До незворотніх змін в ґрунті відносять утвореня пустель. Їх утворення відбувається за разунок взаємодії природи та діяльності людини. Опустелювання призводить до втрати біорізноманітності та пігшення властивостей ґрунтів, його родючості та біопродуктивності. Причиною утворення пустельє є нераціональне використання земель, нехватка води, довготривала посуха, надмірне вирубування лісів та чагарників, не раціональний випас худоби, збільшення їх поголів'я. Часто в господарській діяльності проводять зрошування земель, якщо для цього використовувати невеликі водойми – це може призвести осушення земель, в подальшрму до утворення пустель. Вони можуть виникати не залежно від кліматичних умов.

Під введенням та виникненням в ґрунті нових, не характерних для нього фізичних, хімічних або біологічних сполук розуміють забруднення ґрунтів. Переважними джерелами забруднення ґрунту вважаються забруднювачі, які осідають з атмосферного повітря; вносяться в ґрунт через мінеральні добрива, надмірну кількість органічних добрив, пестицидів, інших хімічних речовин; важких

металів (Cd, Cu, Cr, Ni, Co, Hg, As, Mn); речовини, що додані у воду для зрошення; речовини, які потрапляють в ґрунт через неуважність людей (паливо і мастильні матеріали), неочікувані витоки або розливи під час роботи машин, транспортних засобів, при аваріях, тощо, а також втрати поживних речовин, які виникають вході неналежного зберігання на складах; промислові та побутові відходи.

Виходячи із вище викладеного, доцільно навести класифікацію ґрунтових забруднень та більш детально їх розглянути. Так, науковці класифікують різні ґрунтові забруднення за джерелом надходженнь цих забруднень в ґрунт, при цьому потрібно зазначити, що більшість з них має антропогенний характер:

- З атмосферними опадами. В процесі роботи підприємств в атмосферу виділяється велика кількість хімічних сполук, які згодом розчиняються в краплях атмосферної вологи і тоді в процесів опадів потрапляють в ґрунт. Передусім це сполуки газів - оксиди сірки, азоту та інші. Загроза полягає в тому, що вони не просто розциняються в краплинках атмосферної вологи, а й утворють хімічні сполуки з водою, які мають кислотний характер.
- При осіданні у вигляді пилу і аерозолів. Для трердих та рідких з’єднань характерна здастність в суху погоду осідати на ґрунт у вигляді пилі та аерозолів і таким чином забруднюти його.
- При поглинанні ґрунтом газоподібних з'єднань. Аналогічно до твердих та рідких з’єднань газоподібні мають здатність забруднювати ґрунт в суху погоду, однак це відбувається шляхом безпосереднього поглинання газів ґрунтом, особливо шкідливим є поглиння газоподібних з’єднань вологим ґрунтом.
- З рослинними опадами. Суть цього джерела забруднення ґрунтів полягає в тому, що в процесів життєвого циклу рослин на них осідає значна кількість різних шкідливих сполук, або вони самостійно їх поглинають через продухи листя. Після закінчення життєдіяльності рослини листя оппадає і відповідно разом із ним потрапляють у ґрунт всі шкідливі сполуки.

Таким чином, є зрозумілим, що поверхневі шари ґрунтів мають здатність швидко забруднюватись. При цьому збільшення концентрації в ґрунті різних хімічних сполук – токсикантів негативно впливає на життєдіяльність ґрунтових

організмів, змінюється хід ґрунтоутворення, сповільнює його. Як наслідок, відбувається втрата здатності ґрунту до самоочищення від хвороботворних та інших небажаних мікроорганізмів, а це напряму загрожує вже життєдіяльності людини, оскільки накопичення хімічнх речовин в рослинах та тваринах прямо або побічно здійснює влив на організм людини [52].

Вплив на рослинний та тваринний світ здійснюється в результаті діяльності людини шляхом прямої або опосередкованої взаємодії із біологічними об'єктами (рослинами, тваринами, мікроорганізмами). Це призводить до їх знищення або до погіршення репродуктивних або інших функцій, тому виходячи з аналізу негативних наслідків впливу на флору та фауну, пріоритетним стає визначення екологічного аспекту. Сутність його полягає у виділення згубних екологічних наслідках, проявами яких є погіршення екологічних функцій біоценозів, порушення їх динамічної рівноваги, деградації екосистем через пошкодження і видалення частини біологічних об'єктів, порушення умов їх життєдіяльності, блокування встановлених взаємин між організмами [52].

Так як екосистеми ґрунтів є складними, поліфункціональними, відкритими і динамічними системами, то вони мають певну витримку до техногенних і антропогенних впливів. Однак, на думку багатьох українських вчених деякі ґрунтові екосистеми в Україні вже перебувають на межі безповоротних змін. Найбільш помітні зміни прослідковуються у зміні флори та фауни ґрунту. Відновити можливості ґрунтів складно, навіть інколи неможливо внаслідок діяльності людини. До того ж найбільш ефективні методи рекультивації ґрунтів не в змозі відновити ресурси ґрунту повністю, навіть при їх використанні ґрунти втарчають від 40 до 60% від їх природної родючості.

Отже, пріоритетним завданням для ґрунтознавців і екологів на короткостроковий термін є захист ґрунтового покриву від прояву різних видів деградації та негативного вливу людини, оскільки площа ґрунтів з кожним роком зменшується. Особливої актуальності набуде забезпечення сприятливого екологічного середовища для існуючого біорізноманіття і, насамперед, для людини.

5.3. Висновки до розділу

Проаналізувавши фактори антропогенного впиву на стан ґрунтів та ґрунтової флори і фауни можна сказати, що деградація грунтів в даний час є однією з найважливіших соціально-економічних проблем, яка створює загрозу екологічної, економічної і національної безпеки. Людина в процесі своєї господарської діяльності цілеспрямовано діє на ґрунт, що може призвести до небажаних явищ: заболочування ґрунтів, їх засолення, ущільнення і руйнування ґрунту від «антропогенного тиску», забруднення різними шкідливими відходами, розвитку процесів водної та вітрової ерозії та інших негативних наслідків. Тому вплив людини на ґрунт має бути направлено на планомірне поліпшення якості ґрунту і підвищення її продуктивності, збереження грунтової флори та фауни.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що в даний час організм рослин все частіше розглядають в сукупності з усіма асоційованими з ним мікроорганізмами, оскільки дані організми в процесі своєї життєдіяльності активно впливають один на одного. Для мікрофлори ризосфери характерна наявність мікроскопічних грибів родів *Penicillium, Gliocladium, Talaromyces, Humicola* і ін. З'ясовано, що лікарська рослина *Aesculus hippocastanum L.* містять велику кількість біологічно активних речовин, які є джерелом флавоноїдів, дубильних речовин, вітамінів, алкалоїдів та амінокислот для фармацевтичної промисловості. Виявлено, що мікроскопічні гриби здатні продукувати різноманітні біологічно активні речовини: амінокислоти, антибіотики, алкалоїди, вітаміни, ферменти, флавоноїди. Мікроміцети можуть стати потенційними об`єктами фармацевтичної промисловості, як більш економічно вигідні продуценти аналогічних рослинним метаболітів.

2. З ризосфери кінського каштану (*Aesculus hippocastanum* L.*)* виділено гриби методом серійних розведень. Отримано чисті культури грибів шляхом багаторазових пересівів. Культивування та накопичення культур грибів здійснювалося на картопляно-глюкозному агарі при температурі 25 °С. Проведено якісні реакції, які дозволяють попередньо встановити наявність алкалоїдів та флавоноїдів навіть при незначному їх вмісті. Для визначення кількісного вмісту алкалоїдів та флавоноїдів використано спектрофотометричний метод.

3. Встановлено, що виділені мікроміцети з ризосфери кінського каштану (*Aesculus hippocastanum* L.*)* містять в своєму складі флавоноїди та в незначній кількості алкалоїди. Визначення проводилось в комплексі мікроміцетів, сумарний вміст флавоноїдів складає 1,52 %, а алкалоїдів 0,67 %. Мікроміцети виділені з ризосфери *Aesculus hippocastanum* можна використовувати як продуцент флавоноїдів і культивувати у промислових масштабах при підборі відповідних штамів, а ефективність виробництва біологічно активних речовин може бути підвищена експериментально на основі сучасних біотехнологій.

СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Добровольская К.Г. Структура бактериальных сообществ почвы. –М.: ИКЦ «Акад-книга», 2003. – 284 с.
2. Умарова М.М., Степанов А.Л. Микробиологическая трансформация нитрогена в почвах. М.: ГЕОС, 2008. – 137 с.
3. Звягинцева Д.Л., Зенова Г.М. Биология почвы. М.: Издаво Москв. Ун-та, 2006. – 445 с.
4. Иванов К.П. Корневые выделения и их значение в жизни фитоценоза. – М.: Наука, 1974. – 193 с.
5. Умарова К.М. Ассоциативная азотфиксация. М.: Издатво Москв. Ун-та, 1987. – 133с.
6. Павлова М. Маленькие стражи подземной галактики (рус.// Наука и жизнь. – 2018. – № 8. – С. 97-102.
7. Gir, B.; Giangg, P. H.; Prased, R.; (2004). "Microbial Diversity in Soil". Microorganisms in Soil: Role in Genesis and Function. Soil Biol. 4. pp. 37.
8. Биорегуляция микробно-растительных систем: Монография / Под ред. Г. А. Иутинской, С. П. Пономаренко. – К.: «НІЧЛАВА», 2010. – 472 с.
9. Звягинцева К.Г., Добровольская Т.Г., Растения как центр формирования бактериальных сообществ почвы // Журнал общ. Биолог. – 1995. – Т. 54, No 2. – С. 183-199.
10. Bulgareli D., Schlaepi K., Ver Loren van Themaat E., Schullze Lefert T. Structures and functions of bacterial microbiot of the plants // Annu. Review. Plant Biolog. – 2014. –.V. 65. – pp. 807-838.
11. Berg G., Rybakova R., Koberll N. The plants microbiom explored: implication for experimental botany // J. Exp. Botan. –2015. –V. 67, No6. – pp. 995-1002.
12. McNear J. D.H. The rhizosphere –root, soils and everything between// Nature Educ. Knowlg. – 2014. – V. 4, No3. – pp. 1.

13. Иванов В.П. Корневые выделения и их значение в жизни фитоценозов. – М.: Наука, 1973. – 193 с.

14. Беззубенкова О.Е., Юхлимова М.Н., Нестерова Н.И. Микрофлора ризосферы и ри-зопланы и её влияние на растительный организм // Естественные и технические науки. – 2012. – Т. 4. – С. 99-102.

15. Balandreu J. Microbiology of the asssociation // Can. J. Microbiology. – 1984. –V.29, No8. – pp. 856-859.

16. Каменева С.В., Муромец Е.М. Генетический контроль процессов взаимодействия бактерий с растениями в ассоциациях // Генетика. – 1999. – Т. 35, № 11. – С. 1480–1494.

17. Бухарин О.В., Лобакова Е.С., Немцева Н.В., Черкасов С.В. Ассоциативный симбиоз.–Екатеринбург: Изд-во УрО РАН, 2006. – 264 с.

18. Zillber-Rosenberg I., Rosenberg R. Roles of microorganism in the evolution of animals and plants: the hologenomes theory of evolution. FEMS Microbiolpgy. Rev., 2007, vol. 32, no. 5, pp. 723-736.

19. Schlaepi K., Bulgareli D. The plants microbiome at works. Molecular Plant-Microbe Interaction., 2016, vol. 28, no. 3, pp. 212-217.

20. Berg G., Rybakov D., Grube M. The plant microbiome explored: implication for experimental botany. J. Expert Bot., 2017, vol. 67, no. 5, pp. 995–1002.

21. Rajkummar M., Vara Prassad M.N., A N. Biotech applications of serpentin soil microorganisms for phytoremediation of the trace metal // Crit. Rev. Biotech. – 2008. – V. 28, No 2. – P. 120-131.

22. Ґрунтові гриби як біотичний чинник впливу на рослини / Є. П. Копилов// Сільськогосподарська мікробіологія. - 2012. - Вип. 15-16. 7-28 с.

23. Chowdhhury S.K., Hartmann A., Boriss H. Biocontrol mechanisms by root associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 – a review // Front. Microbiology. – 2016. – V. 6. – Art. 790, P. 1-11.

24. Makssimov I.V., Abizgill'dina R.J., Plants growth promoting rhizobacterias as alternative to chemicall crop protectiors from the pathogens // Appl. Biochemistry Microbiology – 2012. – V. 47, No 4. – P. 334-345.

25. Атлас медоносних рослин України / Боднарчук Л. І., Соломаха Т. Д., Ілляш А. М. та ін. – К.:Урожай, 1993. – 212 с.

26. Лікарські рослини: Енциклопедичний довідник / Л-56 Відп. ред. А. М. Гродзінський, – К.: Голов, ред. УРЕ, 1991, – 544 с.

27. Виділення, ідентифікація біологічно активних речовин гіркокаштану звичайного *Aesculus hippocastanum* L., створення і стандартизація на їх основі препарату "Ескувіт" [Текст]: автореф. дис...канд. фармац. наук: 15.00.03/ Комісаренко Сергій Миколайович ; Держ. наук. центр лікар. засобів. – Х., 2002. – 18 с.

28. Мирчинк Т.Г. Почвенная микология /Т.Г. Мирчинк. – М. : Изд-во МГУ, 1976. – 206 с.

29. Мирчинк Т.Г. Почвенные грибы как компоненты биогеоценоза /Т.Г. Мирчинк //Почвенные организмы как компоненты биогеоценоза. 24 – М., 1984. – 114-130 с.

30. Макромицеты: лекарствиние свойства и биологтческие особености. Т.2. / Под. ред. проф. И. Габриэля. – К.: Наш формат, 2016. – 261 с.

31. Фармакогнозия : учеб. пособие / В. В. Карпук. – Минск: БГУ, 2011. – 340 с.

32. Фармацевтична хімія: Підруч для студ. вищ. фармац. навч. закл. та фармац. ф-тів вищ. мед. навч. закл. III – IV рівнів акредитації/ За заг. ред. П.О. Безуглого – Вінниця, НОВА КНИГА. 2008. – 560 с.

33. Ковальов В.М., Павлій О.І., Ісакова Т.І. Фармакогнозія з основами біохімії рослин: Підруч для студ. вищ. фармац. навч. закл. та фармац. ф-тів вищ. мед. навч. закл. III – IV рівнів акредитації (2-ге вид) – Х Вид-во НФаУ, МТК-книга. 2004 – 704 с.

34. Солодовниченко Н. М., Журавльов М. С., Ковальов В. М. Лікарська рослинна сировина та фітопрепарати: Посіб. з фармакогноз ії з основами біохімії лікар. рослин. – Х.: Вид-во НФАУ: Золоті сторінки, 2001. – 408 с.

35. Качур І.І., Качур О.І., Крч Х.Л. Діагностичні ознаки лікарської рослинної сировини (субстанції). Методичні рекомендації до проведення лабораторних робіт з фармакогнозії, частина 4, для студентів медичного факультету спеціальності «Фармація». Ужгород, 2019. – 55 с.

36. Билай В. И. Методы экспериментальной микологии: Справочник/ Отв. ред. В. И. Билай. – Киев: Наукова думка, 1982. – 550 с.

37. Благовещенская Е. Ю. Микологические исследования: Основы лабораторной техники. – Ленанд М, 2017. – 96 с.

38. Фітохімічний аналіз рослинної сировини, що містить флавоноїди: Федосєєва Г.М .; Мирович В. М .; Горячкіна Е. Г., Переломова М. В. Іркутськ 2008. – 67 с.

39. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 2-е вид. – Доповнення 3. – Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2018. – 416 с.

40. Лікарські рослини та лікарська рослинна сировина, що містять алкалоїди: навчально-методичний посібник за спеціальністю 060108 (04050) – Фармація (частинаI)/сост. Коренський І.М., Іванівська Н.П. - Воронеж: Воронежзький державний університет, 2007. - 72 с.

41. 41. ГОСТ 12.0.003-74. Система стандартів безпеки праці (ССБТ). «Небезпечні та шкідливі виробничі фактори. Класифікація ».

42. СН 4557-88. «Санитарные нормы ультрафиолетового излучения в производственных помещениях».

43. ДСН 3.3.6.042-99. «Санітарні норми мікроклімату виробничих приміщень». – К.: МОЗ України, 1999 – 23 с.

44. ДСН 3.3.6.037-99. «Державні санітарні норми виробничого шуму, ультразвуку та інфразвуку».– К.: МОЗ України, 2000 – 29 с.

45. ГОСТ 12.1.005-88. Система стандартів безпеки праці (СБТ). «Загальні санітарно-гігієнічні вимоги до повітря робочої зони».

46. Основи охорони праці: Підручник. 2-ге видання / К.Н.Ткачук, М.О.Халімовський, В.В.Зацарний та ін. – К.: Основа, 2006 – 448 с.

47. ДСП 9.9.5.-080-02. «Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю». – К.: МОЗ України, 2000 – 36

48. Географія ґрунтів з основами ґрунтознавства: Навчально-методичний посібник/О.В.Аріон, Т.Г.Купач, С.О.Дем’яненко . – К., 2017. – 226 с.

49. Мишустин Е.Н. Ассоциации почвенных микроорганизмов/ Е.Н. Мишустин. – М. : «Наука», 1975. – 105 с.

50. Каплін В. Г. Биоиндикация і стан екосистем / В. Г. Каплін. Самара: Самарська ГСХА, 2002. - 144 с. 51.

51. Мінєєв В.П. Агрохімія, біологія та екологія ґрунту / В. П. Мінєєв, Е.Х. Ремпе. – М .: Росагропромиздат, 1991. - 205 с.

52. Аверченко В.І. Ґрунтознавство: навч. пос. / В. І. Аверченко, Н. М. Самойленко. – Харків : Мачулін, 2018. – 118 с.