

when added to the culture medium of vitamin B6. The use of TFL-active strains of *P. agglomerans* 123a and *P. agglomerans* 9668 that do not have tyrosinase activity, allows to solve the problem of eliminating diphenolic activity and addition of stabilizing agents to the synthetic reaction mixture in obtaining L-DOPA.

*Key words: Pantoea agglomerans, tyrosinase, tirozinfenolliaze, L-DOPA, Parkinson's disease, antiparkinsonian drug*

Рекомендує до друку

Надійшла 23.05.2016

В. В. Грубінко

УДК 581.1+535.346

А. І. ГЕРЦ, Н. В. ГЕРЦ

Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка  
вул. Кривоноса, 2, Тернопіль, 46027

## **ВИЯВЛЕННЯ ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ НЕОДНОРІДНОСТІ ФОТОСИНТЕТИЧНОГО АПАРАТУ РОСЛИН МЕТОДОМ ФОТОРЕЄСТРАЦІЇ СПЕКТРУ ВІДБИТТЯ СВІТЛА**

В роботі описано метод фото- та відеореєстрації відбиття світлового випромінювання поверхнею листка, який в комплексі з методом реєстрації індукції флуоресценції хлорофілу, може використовуватись для виявлення рослин, що перебувають в умовах стресу.

*Ключові слова: вегетаційний індекс, NDVI, відбиття світла, спектри відбиття листків, флуоресценція хлорофілу, індукція флуоресценції хлорофілу*

**Вступ.** Контроль стану рослин є важливим при вирішенні сільськогосподарських та екологічних завдань. Особливий інтерес становить використання спектрів відбиття в червоній та ближній інфрачервоній (БЧ) ділянках, як джерела інформації про стан фіто- та агроценозів [1].

Сьогодні продовжується розробка методів оцінки різноманітних показників стану рослин за їх спектрами відбиття. Розроблені індекси для тестування вмісту не лише пігментів, а й загального азоту, визначення біомаси, листового індексу, вмісту води тощо [1-3, 5].

Перевагою використання методів вимірювання відбиття світла для оцінки фізіологічних параметрів є те, що при цьому не руйнуються посіви, вимірювання здійснюється автоматично, швидко та легко, а сам метод має високий ступінь об'єктивності та є репрезентативним [5].

Водночас, залишається відкритим питання можливості використання вегетаційного індексу нормалізованої різниці в лабораторних умовах з метою забезпечення експрес-оцінки стану фізіологічних показників рослин закритого ґрунту та питання щодо можливості застосування для реєстрації спектрів відбиття побутових засобів фото- та відеореєстрації.

### **Матеріал і методи досліджень**

Для оцінки функціональної неоднорідності фотосинтетичного апарату листків використовували метод реєстрації спектрів відбиття світлових променів від листків та метод індукції флуоресценції хлорофілу (ІФХ).

Реєстрація спектрів відбиття рослин закритого ґрунту здійснювалась за допомогою модифікованої камери Mobius Action Cam з червоним фільтром типу Rosco #19 "Fire" (рис. 1) [10].



Рис. 1. Модифікована відеокамера для отримання БІЧ ділянок спектра Mobius Action Cam-Infragram [10]

Враховуючи те, що в модифікованій камері інфрачервоний (ІЧ) фільтр відсутній (зазвичай, встановлений на більшості цифрових камер) та замінений на червоний типу Rosco #19 "Fire" [10], БІЧ спектр розподіляється між червоним і синім каналами CCD-матриці (ПЗЗ-матриці) (рис. 2).

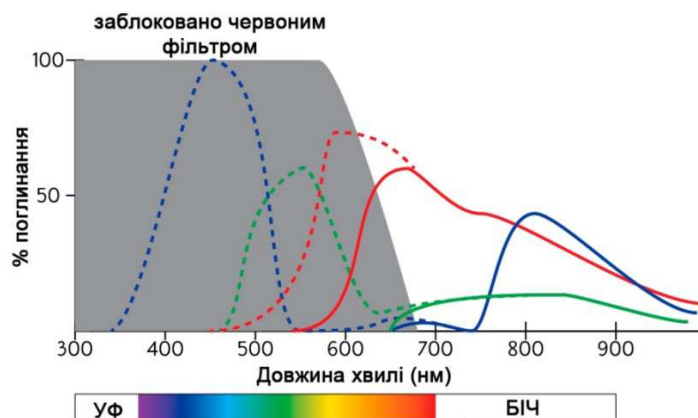


Рис. 2. Діапазон спектральної чутливості цифрової камери з червоним фільтром типу Rosco #19 "Fire"

Синій канал ПЗЗ-матриці камери отримує виключно БІЧ, а червоний-поєднує БІЧ і червону ділянку спектра світла.

Таким чином, камера дозволила отримати зображення типу RNN (Red, Near-Infrared, Near-Infrared) та RGN (Red, Green, Near- Infrared), що містять ближню інфрачервону ділянку спектру.

Маючи два зображення, одне у видимому діапазоні, інше – у БІЧ, засобами ПЗ Image-J здійснювали розрахунок індексу нормалізованої різниці (NDVI), що є одним з найпоширеніших та обґрунтованих вегетаційних індексів NDVI [2, 5].

У якості рослинного матеріалу, використовували листкові пластинки *фікуса еластичного* (*Ficus elastica Variegata*), *гібіскуса китайського* (*Hibiscus rosa-sinensis L.*) та *катальпи прекрасної* (*Catalpa syringaefolia Sims.*).

Вміст хлорофілу та флуоресценцію хлорофілу визначали за допомогою РАМ-флуориметра MultispeQ [9], що поєднує в собі портативний флуориметр і хлорофілометр, інтегрований у платформу Photosyn Q [9].

### Результати досліджень та їх обговорення

Ступінь поглинання, поширення чи відбиття електромагнітного випромінювання (ЕМВ) від рослин, значною мірою, визначається наявністю або відсутністю фотосинтетичних пігментів та структурою губчастого мезофілу листків. Хлороз, нестача поживних речовин збільшує частку відбитих червоних променів від рослин [8].

На відміну від видимого світла, коефіцієнт відбиття в ближній інфрачервоній ділянці випромінювання (яке не використовується рослинами) регулюється, в першу чергу, будовою та конфігурацією міжклітинних повітряних просторів губчастого мезофілу тканин листків рослин [4, 6-7]. Старіння, фізіологічний стрес та інші фактори, які змінюють конфігурацію рослинних клітин, як правило, впливають на відбиття у БЧ ділянці спектра. Тож, високі рівні відбиття ближніх інфрачервоних променів та низькі показники в ділянці червоного характерні для здорових рослин.

Розділивши кожен листкову пластинку на сектори (від 1 до 3), що помітно відрізнялись забарвленням (рис. 3) та опрацювавши зображення таким чином, щоб кожен його піксель являв собою співвідношення БЧ/червоної, виявлено значні відмінності у рівнях відбиття БЧ та червоних променів від останньої.

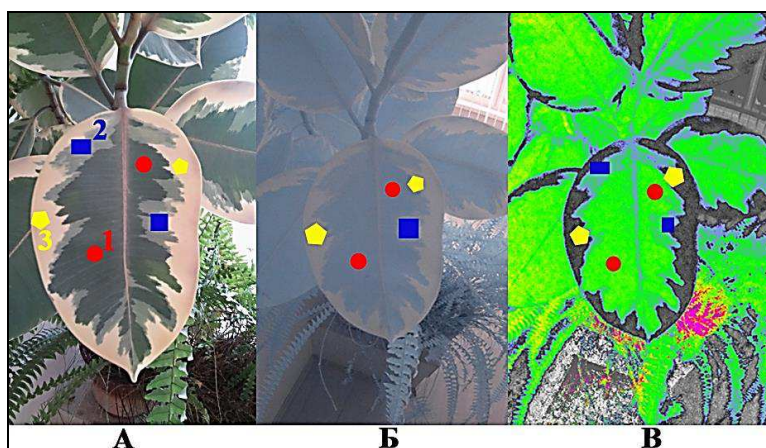


Рис. 3. Зображення листків *F. elastica Variegata* за умов природнього освітлення:  
 А – RGB, Б - інфрачервоне (ІЧ, RNN), В - NDVI (колірна мапа NDVI\_VGYRM [10])  
 (1. – ділянка темно-зеленого забарвлення; 2. - ділянка світло-зеленого забарвлення;  
 3. – ділянка світлого забарвлення)

Безхлорофільні ділянки листкової пластинки (рис. 3), мають найнижчі показники NDVI-індексу і забарвлені у сірий колір на NDVI зображенні (рис. 3. В) та у білий чи жовтий на RGB (рис. 3. А).

Це закономірно, адже при знебарвлюванні листків, що може бути обумовлено генетично, стресом, або захворюваннями збільшується кількість червоних променів відбитих листками. При цьому, частка відбиття у БЧ спектральній ділянці, може як змінюватись, так і залишатись без змін. Це залежить від стресового чинника який діє на рослину [8, 10].

Найбільш фотосинтетично активні ділянки листових пластинок представлені зеленими, жовтими, червоним пікселями на фотозображеннях, що відповідає значенню NDVI від 0,2 до 0,9. Фіолетові пікселі відповідають NDVI значенню від 0,1 до 0,2 - дуже низький рівень вмісту хлорофілів, можливо і фотосинтетичної активності. Сірі – значенню нуль.

Отже, за допомогою NDVI зображень легко виявити листки рослин з високим вмістом фотосинтетичних пігментів. Для підтвердження даного факту та з метою визначення фотосинтетичної активності згаданих ділянок листка, здійснено флуоресцентний аналіз кожного сектора листкової пластинки методом індукції флуоресценції хлорофілу (ІФХ). У табл. 1, наведено основні параметри флуоресценції хлорофілу кожного з секторів листкової пластинки.

Слід відмітити два ключових параметри флуоресценції хлорофілу, що мають, на нашу думку, суттєву кореляцію з NDVI індексом (табл. 1). Перш за все, це вміст хлорофілу, який суттєво різниться між досліджуваними ділянками листкової пластинки *F. elastica*. Найнижчий його рівень в 3-й ділянці (рис. 3, табл. 1). Зниження вмісту хлорофілу суттєво змінює спектральні властивості листка, особливо в ділянці поглинання червоних променів, і впливає на розрахунок та величину вегетаційного індексу. Ось чому ділянка № 3, маючи найнижчий сумарний вміст хлорофілу, характеризується дуже низьким значенням NDVI індексу.

Основні параметри флуоресценції хлорофілу листкової пластинки *F. elastica*.

Параметри флуоресценції	1 ділянка темно-зелене забарвлення листкової пластинки	2 ділянка світло-зелене забарвлення листкової пластинки	3 ділянка світле забарвлення листкової пластинки
$F_o'$	8886	8435 ↓	598 ↓
$F_m'$	21346	20565 ↓	999 ↓
$F_s'$	6954	8351 ↑	832 ↓
$\Phi_{PSII}$	0,64-0,7	0,57-0,6 ↓	0,14 ↓
$NPQ$	2,9	3,5 ↑	6,5 ↑
$Rdf$	1,78-2,07	0,9-1,46 ↓	0,2-0,5 ↓
Вміст хлорофілу	58-60	34-32 ↓	2 ↓

\*Примітка: 1 ділянка - темно-зелене забарвлення листкової пластинки; 2 ділянка - світло-зелене забарвлення листкової пластинки; 3 ділянка - світле забарвлення листкової пластинки (рис. 3)

Іншим параметром флуоресценції хлорофілу, що зазнає суттєвих змін при знебарвленні листка, є рівень нефотохімічного гасіння  $NPQ$ . Даний параметр розраховується за формулою  $NPQ = F_m/F_m' - 1$  і відображає реалізацію поглинутої фотосинтетичним апаратом енергії світла у вигляді тепла [9].

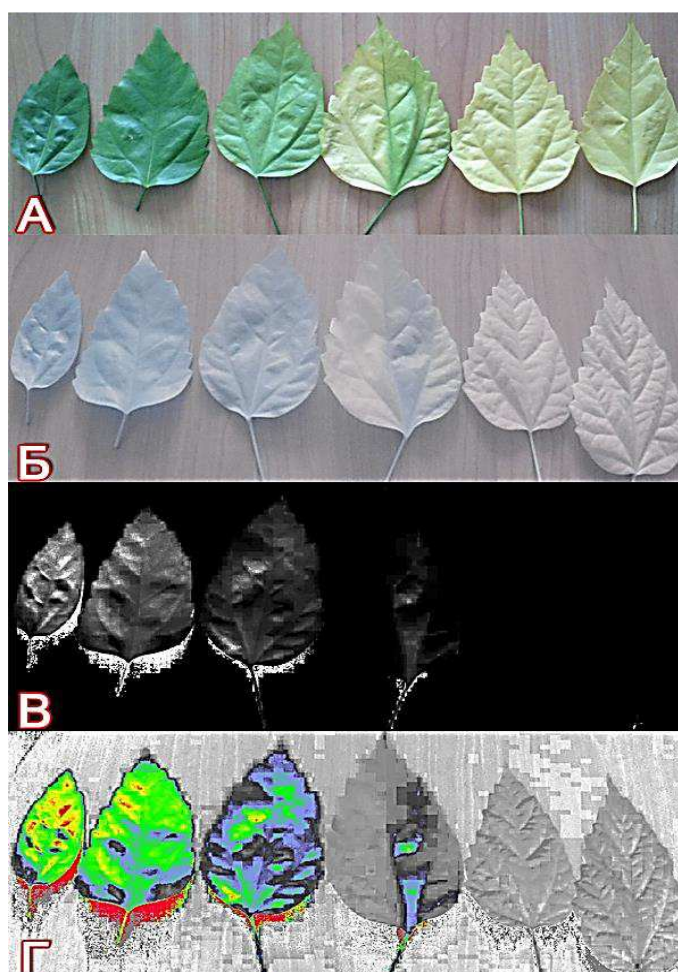


Рис. 4. Зображення листків *H. rosa-sinensis* L. :А – RGB, Б - інфрачервоне (ІЧ, RGN), В, Г - NDVI (колірна мапа NDVI\_VGYRM [10])

Аналогічні результати спостерігаються у рослин, що втратили хлорофіл у зв'язку з осіннім пожовтінням або впливом зовнішніх несприятливих чинників. Зокрема, вік рослин (рис. 4) впливає на співвідношення спектрів відбиття в ділянці БІЧ/червоний, що перш за все пов'язано із зміною кількості хлорофілу у листках рослин.

Так, листки *гібіскуса китайського* (рис. 4), що мали світло-зелене, жовте забарвлення (різний вміст хлорофілу), обумовлене віком рослин, показали значне зниження співвідношення БІЧ/червоний, порівняно з листками, що містять високий рівень хлорофілу та на RGB зображенні мають насичене зелене забарвлення. Безхлорофільні ділянки листків мають найнижчі показники NDVI-індексу і забарвлені у сірий колір на NDVI зображенні (рис. 4 Г) та у білий чи жовтий на RGB (рис. 4 А).

Згідно літературних даних, абіотичні фактори, зокрема зневоднення рослини, зумовлюють зміни у спектральних властивостях листків рослин. Так, зневоднення рослини протягом години спричиняє: зменшення рівнів максимальної флуоресценції Fm, флуоресценції у стаціонарному стані Fs; зменшення величини індексу Rfd; зменшення qQ і збільшення qE [1, 8].

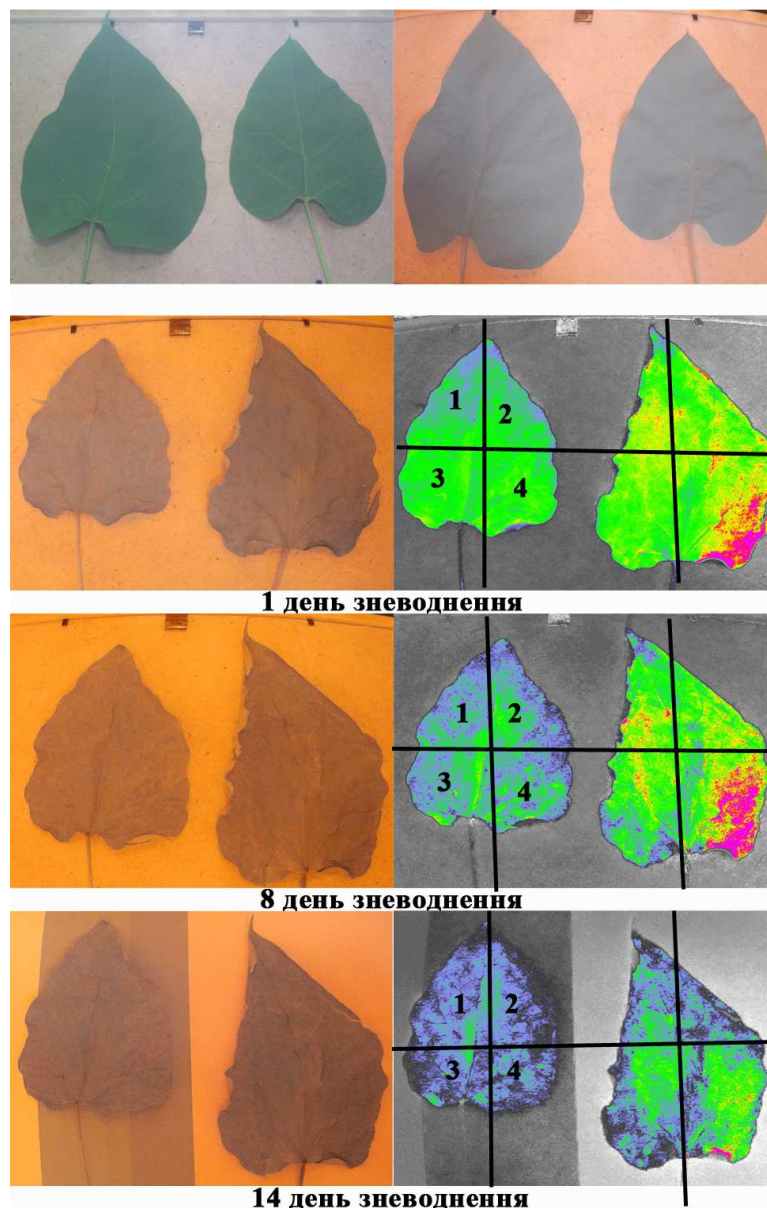


Рис. 5. Вплив зневоднення на NDVI-індекс різних ділянок (секторів) листкової пластинки *C. syringae-foia* (штучне освітлення)

Основні параметри флуоресценції хлорофілу листкової пластинки *катальпи прекрасної* (*C. syringaeifolia* Sims.) за умов зневоднення

Параметри флуоресценції	1 сектор		2 сектор		3 сектор		4 сектор	
	1 день	8 день	1 день	8 день	1 день	8 день	1 день	8 день
	зневоднення		зневоднення		зневоднення		зневоднення	
$F_o'$	9324	4647↓	9627	4012↓	9807	3992↓	8938	3665↓
$F_m'$	10266	4488↓	10374	3883↓	10561	3858↓	9536	3528↓
$F_s'$	9421	4715↓	9842	4076↓	9994	4066↓	9250	3730↓
$\Phi_{PSII}$	0,08	0↓	0,05	0↓	0,05	0↓	0,03	0↓
$\Phi_{NPQ}$	0,8	1↑	0,85	1↑	0,85	1↑	0,9	1↑
$Rdf$	0,1	0↓	0,05	0↓	0,06	0↓	0,03	0↓
Вміст хлорофілу	56	62↑	57	60↑	58	63↑	61	64↑

\*Примітка: 1 сектор; 2 сектор; 3 сектор; 4 сектор на рис. 5

Спостерігаючи зміни, обумовлені зневодненням, котрі відбуваються на рівні первинних процесів фотосинтезу (табл. 2), залишається з'ясувати, чи змінюватимуть вони спектральні характеристики листкової пластинки таким чином, щоб була можливість виявити їх за допомогою фотореєстрації на RNN чи RGN фотографіях.

Аналіз зображень (рис. 5) вказує на те, що NDVI-індекс для різних секторів листкових пластинок суттєво різняться. Спостерігається його поступове зниження протягом досліджуваного періоду. На 14-й день значення індексу у всіх секторах листків прямує до нуля.

Різке зниження індексу нормалізованої різниці (на 8 день зневоднення) супроводжується спадом ряду параметрів флуоресценції хлорофілу у листках *C. syringaeifolia*. Вже через першу добу, суттєво падає фотосинтетична ефективність ФСII, зростає рівень нефотохімічного гасіння (NPQ). Збільшення вмісту хлорофілу у листках (табл. 2), що спостерігається на 8 день зневоднення, може пояснюватись зменшенням розмірів клітин мезофілу та втратою води. Це, з одного боку, зумовлює збільшення кількості молекул пігменту на одиницю площі, з іншого, у зв'язку з дегідратацією, унеможлиблює роботу фотосинтетичного апарату. Як наслідок – нульові значення фотосинтетичної ефективності (рис. 6) та зростання рівня нефотохімічного гасіння (рис. 7).

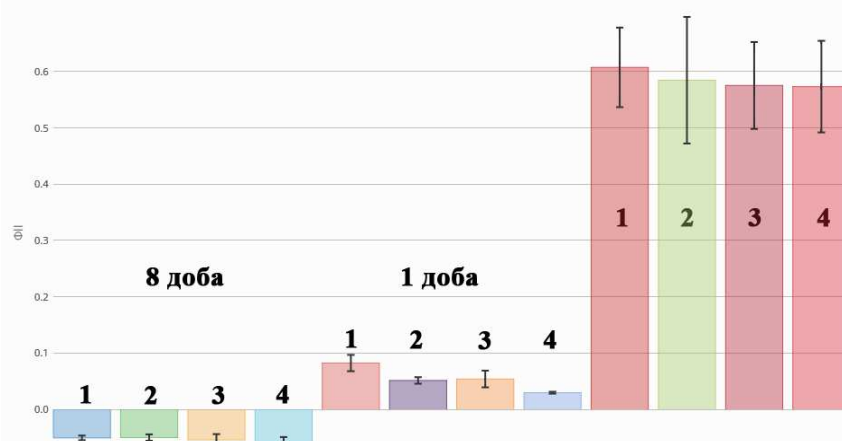


Рис. 6. Значення фотосинтетичної ефективності ФСII ( $\Phi_{PSII}$ ) в залежності від часу зневоднення листкової пластинки *C. syringaeifolia* (цифрами 1-4 позначені сектори листкової пластинки відповідно до рис. 5)

Отже, зневоднення суттєво впливає на спектральні властивості листків в ділянці відбиття від їх поверхні червоного та ближнього інфрачервоного спектру. Враховуючи те, що загальний рівень хлорофілу протягом досліджуваного періоду не суттєво змінювався, припускаємо, що дегідратація тканин листової пластинки впливає на частку БІЧ спектру світла, що відбивається від поверхні листової пластинки.

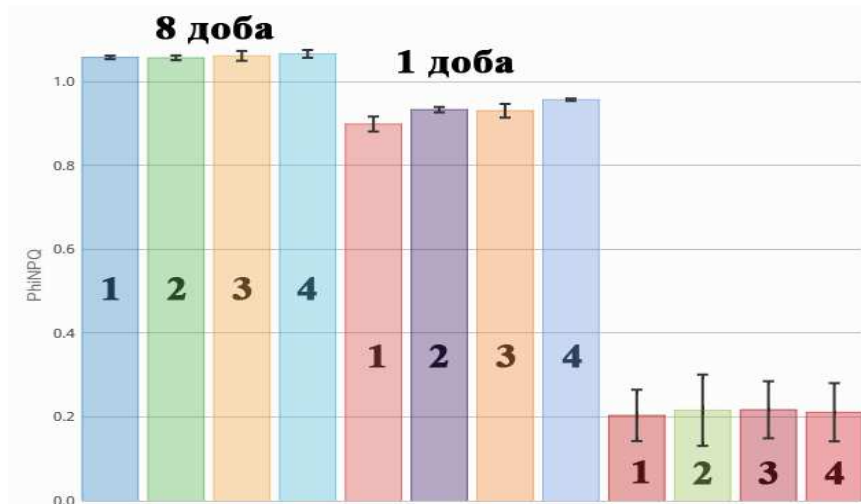


Рис. 7. Значення нефотохімічного гасіння хлорофілу (ФНРQ) в залежності від часу зневоднення листової пластинки *C. syringae folia* (цифрами 1-4 позначені сектори листової пластинки відповідно до рис. 5)

## Висновки

Запропонований спосіб отримання RNN (Red, Near-Infrared, Near-Infrared) або RGN (Red, Green, Near-Infrared) зображення, що містить червону та БІЧ ділянки спектра відбиття і спосіб розрахунку індексу нормалізованої різниці NDVI забезпечує механізм розпізнавання ділянок листової пластинки, де відбувається інтенсивний фотосинтез.

Фото- та відеореєстрація відбиття випромінювання поверхнею листка в комплексі з портативними хлорофілометрами, флуорометрами може використовуватись для визначення вмісту хлорофілу в інтактних листках рослин та виявлення локальних ділянок листової пластинки, що перебувають в умовах стресу.

Проведені дослідження показують, що багато з методів дистанційного зондування, які використовуються в звичайних польових умовах протягом останніх десятиліть, можна, з деякими змінами, легко адаптувати до лабораторних умов дослідження. Звичайно, ще необхідні подальші додаткові дослідження, щоб визначити спектральні властивості основних сільськогосподарських культур і встановити, коли саме стає помітний стрес від нестачі поживних речовин, шкідників, патогенів тощо.

Залишається відкритим питання, як дана технологія працюватиме у випадку аналізу цілих рослин, що зростають у тепличних та умовах *in vitro*. У випадку позитивних результатів, ми отримуємо ефективну, зручну і недорогу технологію, що здатна швидко оцінити фізіологічний стан рослин за різних умов зростання.

1. Використання спектральних характеристик листків рослин для визначення їх фізіологічних показників: автореф. дис... канд. біол. наук: 03.00.12 / Т. А. Казанцев ; НАН України. Ін-т фізіології рослин і генетики. — К., 2007. — 20 с. — укр.
2. Кочубей С. М. Связь спектральных характеристик отражения листьев с их состоянием / С. М. Кочубей, Т. М. Шадчина, Н. И. Кобец, В. В. Дмитриева // Физиология и биохимия культурных растений. — 1986. — Т. 18. — № 4. — С. 355—360.
3. Кочубей С. М. Спектральные свойства листьев как основа дистанционной диагностики / С. М. Кочубей, Н. И. Кобец, Т. М. Шадчина. — К.: Наукова думка, 1990. — 132 с.

4. Сидько А. Ф. Изучение сезонной зависимости спектральной яркости посевов сельскохозяйственных культур от содержания хлорофилла и физиологических параметров растений / А. Ф. Сидько А. П. Шевырнов // Исследование Земли из космоса. — 1998 — № 3. — С 96—105.
5. Шадчина Т. М. Наукові основи дистанційного моніторингу стану посівів зернових / Т. М. Шадчина. — К.: УФСЦ, 2001. — 219 с.
6. Lee K. Hyperspectral versus multispectral data for estimating leaf area index in four different biomes [Text] / K. Lee, W. Cohen, R. E. Kennedy [etal.] // Remote Sens. Environ. — 2004. — Vol. 91. — P. 508—520.
7. Mc Murtey J. E. Distinguish nitrogen fertilization levels in field corns (*Zea mays* L.) with actively induced fluorescence and passive reflectance measurements / J. E. McMurtey, Chappelle E. W., M. S. Kimetal. // RemoteSens. Environ. — 1994. — Vol. 47, № 1. — P. 36—44.
8. Summy K. R. Detecting stress in glasshouse plants using color infrared imagery: A potential new application for remote sensing / K. R. Summy, C. R. Little, R. A. Mazariegos, J. H. Everitt, M. R. Davis, J. V. French, A. W. Scott // Subtrop. PlantSci. — 2003 — N 55. — P. 51—58.
9. Web-site “PhotosynQ” : [Електронний ресурс] — Режим доступу : <http://photosynq.org>. Перевірено: дата 25.07.16
10. Web-site “Publiclab” : [Електронний ресурс] — Режим доступу : <http://publiclab.org>. Перевірено: дата 25.07.16

*А. И. Герц, Н. В. Герц*

Тернопольский национальный педагогический университет имени Владимира Гнатюка

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ НЕОДНОРОДНОСТИ  
ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА РАСТЕНИЙ МЕТОДОМ  
ФОТОРЕГИСТРАЦИИ СПЕКТРОВ ОТРАЖЕНИЯ СВЕТА**

В работе описана и обоснована возможность расчета вегетационного индекса нормализованной разницы (NDVI) на основе RGN, RGN изображений. Данный подход позволяет легко определить листья растений с различным содержанием фотосинтетических пигментов.

Показано, что после обработки изображений, которые содержат ближнюю инфракрасную область спектра, программными средствами наиболее фотосинтетически активные участки листовых пластинок представлены зелеными, желтыми и красными пикселями.

Предложенный способ фоторегистрации и расчета индекса нормализованной разницы NDVI, обеспечивает быстрый и дешевый способ распознавания не только здоровых растений, но и участков листовой пластинки, где происходит интенсивный фотосинтез.

*Ключевые слова:* вегетационный индекс, NDVI, отражение света, спектры отражения листьев, флуоресценция хлорофилла, индукция флуоресценции хлорофилла

*A. I. Herts, N. V. Herts*

Ternopil Volodymyr Hnatiuk National Pedagogical University, Ukraine

**DETECTION OF FUNCTIONAL HETEROGENEITY PHOTOSYNTHETIC APPARATUS  
OF PLANTS BY METHOD OF PHOTOGRAPHIC REGISTRATION OF SPECTRUM OF LIGHT  
REFLECTION**

In the article the possibility of calculating the normalized difference of vegetation index (NDVI) based on RGN, RGN images is described and demonstrated. This approach makes it easy to identify the leaves of plants with different content of photosynthetic pigments. It is shown, that after software processing of the image, which includes near infrared light (RNN, RGN), photosynthetically active sites of the leaf are represented by green, yellow and red pixels.

The proposed method of calculating the normalized difference vegetation index (NDVI), provides a quick and cheap way to recognize not only the healthy plants but also the photosynthetically active sites of the leaf.

Also, camera and video recording sheet surface reflection radiation in combination with portable fluorometers can be used to determine the content of chlorophyll in leaves of intact plants and identify local areas of leaf plates, which are under stress.

The research shows that many of the remote sensing methods used in the conventional field over the past decades, it is possible, with some modifications, easily adapted to laboratory conditions



of the study. Of course, still requires further additional studies to determine the spectral properties of major crops and determine when it becomes noticeable stress from lack of nutrients, pests, pathogens and more.

It remains an open question how the technology will work if the analysis of entire plants that grow in greenhouses and under in vitro. In the case of positive results, we get an effective, convenient and inexpensive technology that can quickly assess the physiological status of plants under different growth conditions.

*Key words: vegetation index, the NDVI, light reflection, leaves the reflection spectra, fluorescence of chlorophyll, chlorophyll fluorescence induction*

Рекомендує до друку

Надійшла 26.05.2016

В. В. Грубінко

УДК 579.843+577.21.004

О. В. ПЕТРЕНКО, В. В. АЛЕКСЕЄНКО

ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб імені Л. В. Громашевського НАМН України»  
вул. М. Амосова, 5, Київ, 03680

## **УДОСКОНАЛЕННЯ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ V. CHOLERAЕ O1/NON O1 НА ОСНОВІ МОЛЕКУЛЯРНО- ГЕНЕТИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ**

Швидка етіологічна діагностика гострих кишкових інфекцій (ГКІ) залишається серйозною проблемою в системі охорони здоров'я. Для підвищення ефективності лабораторної діагностики вібриозів людини та визначення етіологічного агента проведені молекулярно-генетичні дослідження методом полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР). Використання видоспецифічних праймерів під гени холерних вібріонів, які розкривають їх патогенний потенціал та видову приналежність, дало можливість за короткий термін часу розшифрувати їх біологічні властивості. Порівняння генома штамів *V. cholerae* O1/nonO1 за основними генами патогенності показало їх спорідненість та визначило відмінність у видовій складовій вібріонів. Застосування ПЛР методу у лабораторній практиці забезпечує швидку та надійну ідентифікацію холерного вібріона і насамперед у визначенні його вірулентності.

*Ключові слова: V. cholerae O1/nonO1, гени патогенності, вірулентність, ПЛР-діагностика*

Холерні вібріони розповсюджені в природі і є природними мешканцями водоймищ в різних географічних зонах, особливо з жарким та помірним кліматом. Вібріони можуть викликати у людей різні хвороби починаючи від ранових інфекцій, циститів, гострих кишкових інфекцій (ГКІ) і закінчуючи особливо небезпечною інфекцією – холерою. Найбільший інтерес прикутий до збудників діареєгенних вібриозів, якими є *Vibrio cholerae* O1, *V. cholerae* O139, *V. cholerae* non O1, які здатні викликати холеру та ГКІ з різними проявами клінічної картини [11, 12]. Основні біологічні властивості холерні вібріони проявляють більш стало, але зі змінами екологічних умов постійно зростає частота виділення атипових холерних вібріонів та все частіше реєструються діареї у людей з «тертою» клінічною картиною, що в свою чергу ускладнює визначення збудника інфекції [1].

Клінічний поліморфізм ГКІ обумовлює першочергове значення лабораторних методів діагностики у визначенні етіологічного агента. Найбільш поширений метод діагностики є бактеріологічний, проте його довгостроковість та ресурсоемність створюють передумови для впровадження нових та інформативних методів досліджень. На сучасному рівні перспективними виступають молекулярно-генетичні методи, серед яких більш швидким,